Die *tramtrack*-Gengruppe-
Negative Regulatoren zellulärer Differenzierung?

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Kay Giesen

aus Schleiden

Köln, 2000

Berichterstatter:	Prof. Dr. José Campos-Ortega
	Prof. Dr. Christan Klämbt
Tag der mündlichen Prüfung:	08.06.2000

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung **1**

1.1 Aktivierende und reprimierende Funktionen während der Entwicklung 1

1.2 Die POZ-Domäne vermittelt Protein-Protein-Wechselwirkung 3

1.3 Das Gen *tramtrack* 3

1.4 Die extrazelluläre Matrix beeinflußt Entwicklungsprozesse 4

1.5 Die organisierende Funktion der Mittellinie bei der Entwicklung des ZNS 5

1.6 Ziel der Arbeit 7

2. Material und Methoden **8**

2.1 Puffer, Medien und Lösungen 8

2.2 Verwendete Antikörper 14

2.3 Verwendete cDNAs 15

2.4 Fliegenstämme 16

2.5 Genetische Methoden 21

2.6 Histologische Methoden 22

2.7 Molekularbiologische Methoden 27

2.8.1 Herstellung des PEP-Konstruktes 35

2.8.2 Herstellung des UAS*mas*-Konstruktes 35

2.9 Verwendete Primer 36

3. Ergebnisse **37**

3.1 Die Funktion von *tramtrack* bei der Nervensystementwicklung 37

3.1.1 Das Expressionsmuster von *tramtrack* 37

3.1.2 Der *tramtrack*-Ausfallphänotyp 37

3.1.3 Auswirkungen der Überexpression von *tramtrack* auf das Nervensystem 40

3.1.4 Interaktion von *tramtrack* und *pointed* 41

3.1.5 Die Wirkung von *tramtrack* im Auge 42

3.2 Struktur-Funktionsanalyse von TRAMTRACK 44

3.2.1 Rettungsversuche mit verschiedenen *tramtrack*-Konstrukten 45

3.2.2 Funktion der POZ-Domäne in einem chimären POZ-ETS-Protein 46

3.3 Klonierung von *tramtrack*-Homologen 47

3.4 Die *tramtrack*-Gengruppe 48

3.4.1 Genetische Kartierung der Gene der *tramtrack*-Gruppe 49
3.4.2 Kutikula-Phänotypen 51
3.4.3 Defekte in der Gesamtmorphologie 53
3.4.4 Nervensystemdefekte in Mutanten der *tramtrack*-Gengruppe 57
3.4.4.1 Die ZNS-Phänotypen 57
3.4.4.2 Die Mittelliniengliazellen 60
3.4.4.3 Die Mittellinienneurone 61
3.4.4.4 Die lateralen Gliazellen 62
3.4.4.5 Defekte und Zellzahlen im PNS 64
3.4.5 Defekte im Tracheensystem 67
3.4.6 Muskeldefekte in der *ttk*-Gengruppe 68
3.4.7 Funktion der *ttk*-Gene im Auge 70
3.4.8 Einflüsse maternaler Komponenten 71
3.4.9 Die Untersuchung von Interaktionen der *ttk*-Gruppengene 72
3.4.9.1 Genetische Interaktionen innerhalb der *ttk*-Gruppe 72
3.4.9.2 Interaktion mit TTK 75
3.4.9.3 Interaktion mit dem EGF-Rezeptorsignalweg 76
3.4.9.4 DECAPENTAPLEGIC-Expression in Mutanten der *ttk*-Gruppe 78
3.4.9.5 Einfluß auf die Positions-Effekt-Variegation 78
3.5 Suche nach letalen P-Element-Insertionen 80
3.6 Generierung neuer P-Element-Insertionen 80
3.7 Charakterisierung der P-Element-Insertion in *haunted* 81
3.8 Analyse der *disembodied*-P-Element-Insertionen 82
3.8.1 A72 ist eine P-Element-Insertion bei *scratch* 82
3.8.2 Klonierung der *disembodied*-Region 82
3.8.3 Lokalisation und Orientierung der P-Elemente 84
3.9 *masquerade* ist allelisch zu *disembodied* 85
3.10 Phänotypische Analyse von *masquerade* 86
3.11 Rettung des *dib*-mutanten Phänotyps durch *mas*-Expression 89
3.12 Überexpression von MAS 90

4. Diskussion 92
4.1 Die Funktion von *tramtrack* bei der Gliazellentwicklung 92
4.2 Der Funktionsmechanismus von *tramtrack* 94

4.3 Die *tramtrack*-Gengruppe: Corepressoren von TRAMTRACK? 95
4.4 Ist *masquerade* allelisch zu *disembodied?* 97
4.5 Zusammenfassung 100

5. Literaturverzeichnis **101**

6. Anhang **110**
6.1 Abkürzungsverzeichnis 110
6.2 Sequenzvergleich *tramtrack* 111
6.3 genomische Karten 113
6.4 genomische Sequenzen 115
6.5 Danksagung 116
6.6 Erklärung 117
6.7 Lebenslauf 118

1. Einleitung

Die Entwicklung von Geweben verlangt von Zellen, sich zu differenzieren. Dies bedeutet, daß sie sich von einem allgemeinen, pluripotenten Zustand auf einen spezialisierten umstellen müssen. Dazu ist es notwendig, daß das Expressionsmuster der in der Zelle aktiven Gene diesem neuen Zustand angepaßt wird.

1.1 Aktivierende und reprimierende Funktionen während der Entwicklung

Eine Zelle erfährt in der Regel durch extrinsische Signale (Zell-Zell-Interaktionen oder diffusible Faktoren) eine Determination zu einem bestimmten Entwicklungsschicksal. Dieses extrazelluläre Signal wird durch verschiedene Signaltransduktionswege (z.B. Notch-, Rezeptortyrosinkinasen-Signaltransduktionskaskade) in den Zellkern geleitet. Dort führt es zur Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren, die die Realisierung des festgelegten Entwicklungsschicksals durch Aktivierung nachgeschalteter Gene einleiten. Solche Faktoren sind z.B. MyoD, Myf-5 oder Myogenin bei der Muskelentwicklung, die proneuralen Gene für die neuronale oder *glial cells missing* und *pointed* für die gliale Entwicklung (Tajbakhsh *et al*., 1997; Yun und World, 1996; Rawls und Olson, 1997; Jan und Jan, 1994; Brunet und Ghysen, 1999; Jones *et al*., 1995; Hosoya *et al*., 1995; Klämbt, 1993; Klaes *et al*., 1994; Scholz *et al*., 1997).

Gene, die in einer gemeinsamen Signalkette oder einem Stoffwechselprozeß wirken, zeigen oft einen gemeinsamen Ausfallphänotyp. Umgekehrt läßt sich durch das Auftreten identischer oder ähnlicher Phänotypen häufig auf eine gemeinsame Wirkkette schließen.

Die *spitz*-Gruppe umfaßt die *Drosophila*-Gene *single minded, sichel, rhomboid, spitz, Star* und *pointed*. Diese wurden aufgrund ihrer Defekte im ventralen Bereich der Kutikula identifiziert und gruppiert (Mayer und Nüsslein-Volhard, 1988). Mutationen in diesen Genen führen zu Störungen bei der Mittellinienentwicklung (Klämbt *et al*., 1991; Sonnenfeld und Jacobs, 1994). Die molekulare Analyse zeigte, daß die Gene *spitz, Star*, *rhomboid* und *pointed* innerhalb eines gemeinsamen Signalweges wirken, der EGF-Rezeptorsignaltransduktionskaskade (Freeman, 1994; Golembo *et al*., 1996; Kolodkin *et al.*, 1994; Scholz *et al*., 1997; Sturtevant *et al.*, 1993; Sturtevant *et al.*, 1996). Diese ist unter anderem für die korrekte Entwicklung der Mittelliniengliazellen in *Drosophila* verantwortlich.

Eine ganze Reihe von Mutationen führt dazu, daß in *Drosophila*-Embryonen der dorsale Schluß der Epidermis unterbleibt. Dieser Phänotyp tritt z.B. bei Mutationen der Gene *hemipterous*,

basket, Djun oder *decapentaplegic* auf. Die beteiligten Gene ließen sich in einen gemeinsamen Signalweg, den JNK-Signalweg einordnen (Glise *et al.,* 1995; Riesgo-Escovar *et al*., 1996; Sluss *et al*., 1996; Kockel *et al*., 1997; Hou *et al*., 1997).

Neben der Aktivierung von Genen ist es notwendig, andere Gene, deren Aktivität nicht mehr benötigt wird oder deren Expression der Realisierung eines bestimmten Zellschicksals entgegensteht, abzuschalten. Dabei handelt es sich nicht um einen passiven Vorgang, der durch fehlende Aktivierung der Gene vollzogen wird. Vielmehr findet eine aktive Repression dieser Gene statt, die oft auch am Ende verschiedener Signalwege steht. Die zunehmende Anzahl der bekannten, reprimierend wirkenden Transkriptionsfaktoren zeigt, daß dies eine wichtige Funktion während der Entwicklung ist.

Transkriptionelle Repression kann durch verschiedene molekulare Mechanismen realisiert werden: Durch Kompetition kann der Repressor anstelle eines Aktivators entsprechende Bindungsstellen der DNA besetzen und so eine Aktivierung verhindern, oder der aktivierende Faktor wird durch Bindung eines Cofaktors inaktiviert.

Ein weiterer Mechanismus ist die Bindung des Repressors an spezielle DNA-Sequenzen und die aktive Unterdrückung der Transkription durch Protein-Protein-Wechselwirkungen mit dem Transkriptionskomplex oder mit chromatinbindenden Proteinen. Viele dieser Repressoren benötigen Cofaktoren, so ist z.B. GROUCHO für die Funktion der Repressoren HAIRY oder ENGRAILDED notwendig (Paroush *et al.*, 1994; Jimenez *et al.,* 1997). Die Corepressoren NcoR (*nuclear receptor corepressor*) und SMRT (*silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor*) binden in der Abwesenheit entsprechender Liganden viele Hormonrezeptoren und führen durch Wechselwirkung mit SIN3 und Histon-Deacetylasen zu einer Hypoacetylierung der Histon-Proteine. Dies führt zu einer verstärkten Histon-DNA-Wechselwirkung und damit zur Repression von Genaktivität (Horlein *et al*., 1995; Chen und Evans, 1995; Heinzel *et al*., 1997; Nagy *et al*., 1997).

Am Ende dieses Prozesses wird der erreichte Differenzierungszustand oft durch eine entsprechende Veränderung des Methylierungsmusters der DNA oder des Chromatinzustandes (Umwandlung von Eu- in Heterochromatin) manifestiert (Struhl, 1998; Kadonaga, 1998).

1.2 Die POZ-Domäne vermittelt Protein-Protein-Wechselwirkung

Die BTB- oder POZ- Domäne (für **B**rick-a-brack, **T**ramtrack, **B**road-complex, Zollman *et al*., 1994 bzw. **Po**xvirus und **Z**inkfinger, Bardwell und Treisman, 1994) ist eine konservierte Proteindomäne von ca. 115 Aminosäuren, die zuerst in Poxvirus-Proteinen identifiziert worden ist (Upton und McFadden, 1986). Entsprechende Proteine wurden mittlerweile in einer Vielzahl von Organismen wie Hefe, *C. elegans* oder Vertebraten entdeckt. Es gibt in *Drosophila* etwa 40 POZ-Domänenproteine (Zollman *et al*., 1994). Die POZ-Domäne vermittelt Protein-Protein-Interaktion und ist zur Homo- und Heterodimerisierung fähig (Bardwell und Treisman, 1994).
Sie tritt im N-terminalen Bereich von Proteinen fast immer in Kombination mit dem Zink-Finger als DNA-bindendem Motiv auf. Dabei handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die eine Vielzahl von Prozessen regulieren (Horowitz und Berg, 1996; DiBello *et al*., 1991). Viele dieser Proteine wirken direkt als Repressoren diverser Zielgene, z.B. ZF5 (Numoto *et al*., 1993), ZNF145 (Chen *et al*., 1993) oder LAZ3/BCL6 (Dhordain *et al.*, 1997). Einige POZ-Proteine haben einen direkten Einfluß auf die Chromatinstruktur, wie z.B. E(Var)3-93D (Dorn *et al*., 1993) oder GAGA (Croston *et al.*, 1991; Tsukiyama *et al*., 1994).
Ein gut charakterisiertes POZ-Protein ist TRAMTRACK aus *Drosophila melanogaster*.

1.3 Das Gen *tramtrack*

tramtrack (ttk) codiert zwei Transkripte, *ttkp69* und *ttkp88*, die durch alternatives Spleißen entstehen. Die Proteine besitzen im gemeinsamen N-termialen Bereich eine BTB- oder POZ-Domäne und eine PEST-Sequenz und im unterschiedlichen C-terminalen Bereich je zwei Zink-Finger vom C_2H_2-Typ als DNA-bindendes Motiv (Harrison und Travers, 1990; Brown *et al*., 1991; Read und Manley, 1992; Zollman *et al.*, 1994). Die PEST-Domäne kommt bei Proteinen mit geringer Halbwertszeit vor, sie beträgt für TTKp69 etwa 90 Minuten (Brown und Wu, 1993). Phosphorylierung an dieser Sequenz sorgt dafür, daß die Proteine über den Ubiquitinisierungsweg abgebaut werden (Rogers *et al*., 1986).
TRAMTRACK wirkt während der Entwicklung als transkripioneller Repressor. Es reprimiert z.B. die Expression der Segmentierungsgene *fushi tarazu, even skipped, engrailed, hairy* und *runt* (Harrison und Travers, 1990; Brown *et al*., 1991; Read und Manley, 1992; Brown und Wu, 1993). Auch bei der Nervensystementwicklung spielt *tramtrack* eine wichtige Rolle: Es ist im PNS in den nicht-neuronalen Zellen exprimiert und an der Schicksalsentscheidung innerhalb von Zellstammbäumen beteiligt (Guo *et al.*, 1995). Im ZNS dient es der Repression neuronaler

Genaktivität in den Gliazellen (Giesen *et al*., 1997). Ähnliche Funktionen von *tramtrack* als Repressor wurden auch während der Augenentwicklung beschrieben (Xiong und Montell, 1993; Yamamoto *et al*., 1996; Lai *et al*., 1996; Li et al., 1997; Lai *et al.*, 1997).

1.4 Die extrazelluläre Matrix beeinflußt Entwicklungsprozesse

Die extrazelluläre Matrix (ECM) wurde lange Zeit als passives Substrat für Zellen oder als „Klebstoff“ zwischen verschiedenen Geweben angesehen. In den letzten Jahren wurde aber deutlich, daß sie auch in der Entwicklung eine wichtige Rolle spielt und intensive Wechselwirkungen zwischen der Matrix und Zellen stattfinden (z.B. Streuli, 1999).

Die ECM besteht im wesentlichen aus zwei Komponenten: Proteoglykanen und fibrillären Proteinen wie Collagen, Fibrinonectin und Laminin. Diese bilden kein starres Netzwerk. Die ECM wird durch Proteinasen, Serin- und Matrix-Metalloproteinasen, moduliert, besonders in Regionen, in denen zelluläre Differenzierung stattfindet (Mohan *et al.*, 1998; Munaut *et al*., 1999). Die meisten Proteinasen werden als Zymogene sezerniert und erst durch Spaltung aktiv (Rudolph-Owen *et al.*, 1998; Stetler-Stevenson, 1999). Ihre Expression wird durch verschiedene Signalwege wie z.B. Wnt- oder ß-Catenin-Signalwege kontrolliert (Morin *et al.*, 1997; Crawford *et al.*, 1999).

Zellen besitzen eine Vielzahl von ECM-Rezeptoren, die Integrine. Diese beeinflussen durch direkte Signale oder Wechselwirkung mit anderen Signaltransduktionswegen zelluläres Verhalten wie Motilität oder Differenzierung (Schwartz und Baron, 1999; Howe *et al*., 1998; Edwards *et al.*, 1998; Farelly *et al*., 1999; Lee und Streuli, 1999). So führen z.B. Verletzungen zur Aktivierung des Keratinozyten-Integrins, und dessen Wechselwirkung mit dem EGF-Rezeptor sorgt für Expression der Metalloproteinase *collagenase-1*. Die Spaltung von Collagen-Fibrillen durch COLLAGENASE-1 ermöglicht die Migration von Keratinozyten zum Ort der Verletzung (Pilcher *et al.*, 1997; Pilcher *et al.*, 1999).

Die ECM dient auch als Reservoir für Wachstumsfaktoren. Die Faktoren TGFß1 und BMP2 sind an CollagenIIA gebunden (Zhu *et al.*, 1999). Die Freisetzung erfolgt nach Spaltung durch die Procollagen-N-Proteinase und ermöglicht deren Aktivität (Prockop *et al*., 1998).

Wechselwirkungen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix beeinflussen also eine Vielzahl von Entwicklungsprozessen.

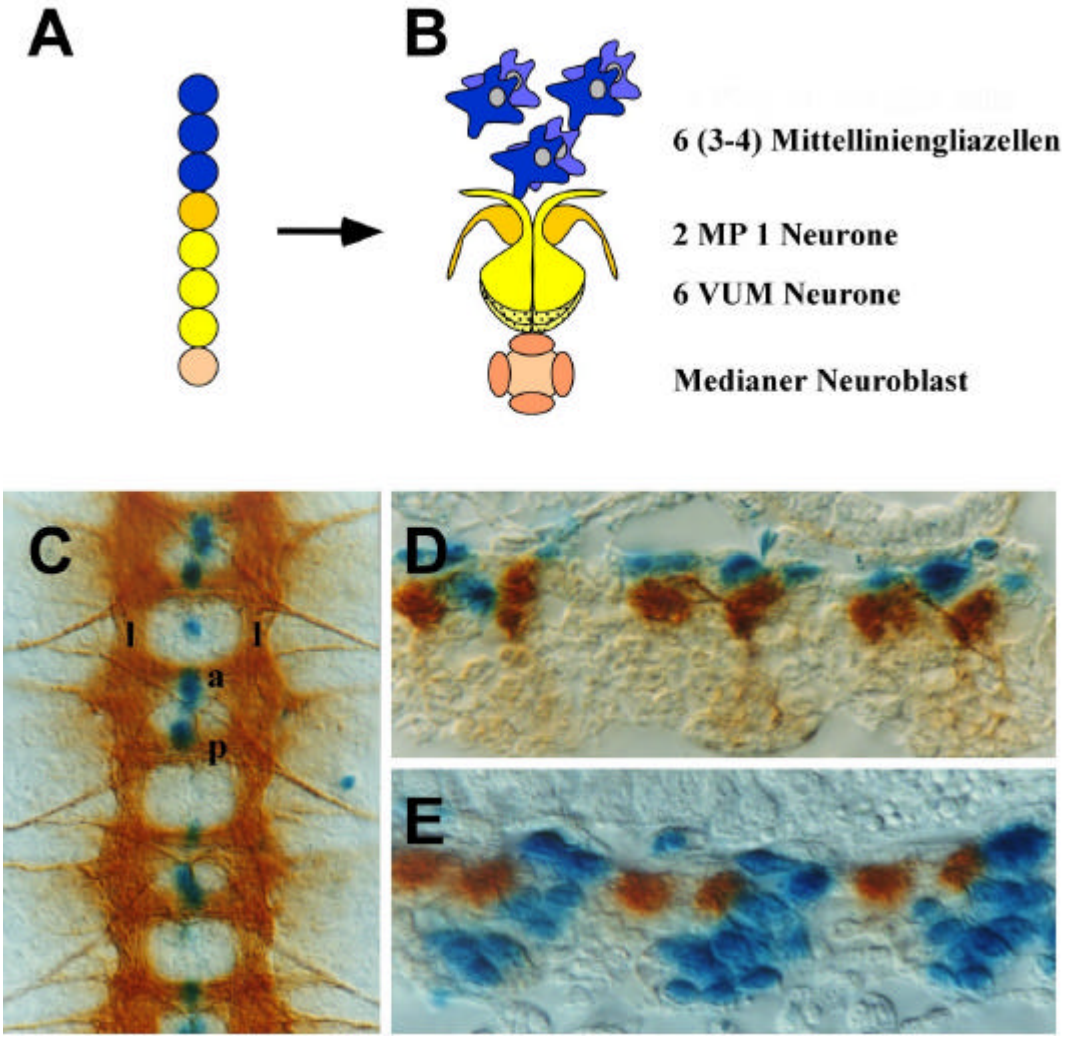


Abb. 1 Das embryonale ZNS von *Drosophila*. A) schematische Darstellung der Mittellinie eines Segmentes und B) der Zelltypen, die sich daraus entwickeln. C) Das Axonmuster des ZNS, mit mAb BP102 dargestellt. a anteriore, p posteriore Kommissur, l longitudinale Konnektive. Die Mittelliniengliazellen (blau) liegen z.T. zwischen den Kommissuren. D,E) Sagittalschnitte des ZNS. In D) sind die Mittelliniengliazellen, in E) die Mittellinienneurone in blau dargestellt. Darstellung nach Klämbt *et al*., 1997.

1.5 Die organisierende Funktion der Mittellinie bei der Entwicklung des ZNS

Das embryonale Bauchmark in *Drosophila*, das zusammen mit dem Oberschlundganglion (dem Gehirn) das ZNS bildet, zeigt einen sehr regelmäßigen, sich segmental wiederholenden Aufbau. Die neuronalen Axone bilden ein strickleiterartiges Muster. Es besteht aus zwei von anterior nach posterior verlaufenden Konnektiven. Diese sind durch zwei Kommissuren pro Segment, der anterioren und der posterioren, verbunden (Abb. 1C).

Bei der Entwicklung dieses Musters spielen die Zellen der Mittellinie eine entscheidende

organisierende Rolle. Sie besteht aus zwei verschiedenen Zelltypen, den Mittellinienneuronen und den Mittelliniengliazellen (Abb. 1).

Die Mittellinie entsteht aus dem Mesektoderm, je einer Zellreihe, die lateral zwischen dem Mesoderm und dem Neuroektoderm liegt (Crews *et al*., 1988; Thomas *et al*., 1988). Durch die Invagination des Mesoderms kommen die beiden Zellreihen des Mesektoderms im ventralen Bereich des Embryos zu liegen und bilden dort die Mittellinie. Diese zeichnet sich durch die Expression des Gens *single-minded (sim)* als Hauptregulatorgen aus (Nambu *et al*., 1991). Durch die Wirkung verschiedener Segmentierungsgene wie *hedgehog* oder *patched* werden die beiden Zelltypen innerhalb eines Segmentes spezifiziert (Dong und Jacobs, 1997; Hummel *et al*., 1999): Im anterioren Bereich entstehen die Mittelliniengliazellen (MLG) und im posterioren die Mittellinienneurone (Abb. 1A, B).

Die Entwicklung der Mittellinienneurone steht unter Kontrolle des Gens *orthodenticle* (Finkelstein *et al.*, 1990). Für die Mittelliniengliazellen ist die Aktivierung des EGF-Rezeptors notwendig (Zak *et al*., 1990; Scholz *et al*., 1997). Die nachgeschaltete Signalkaskade führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors POINTEDP2, der die Differenzierung der MLG einleitet (Brunner *et al*., 1994; O´Neill *et al*., 1994).

Die Zellen der Mittellinie exprimieren zu Beginn der ZNS-Entwicklung NETRIN-Proteine. Diese stellen ein diffusibles attraktives Signal dar und sorgen dafür, daß erste kommissurale Axone zur Mittellinie hinwachsen (Kennedy *et al*., 1994; Serafini *et al*., 1994; Serafini *et al*., 1996; Harris *et al.*, 1996; Mitchell *et al.*, 1996). Für diesen Prozeß scheint die NETRIN-Expression in den Mittellinienneuronen ausreichend zu sein, da die Ablation der MLG nicht zu einer Reduktion der kommissuralen Axone führt (Zhou *et al.*, 1995).

Die lateralen Neurone exprimieren das Gen *roundabout* (*robo*, Seeger *et al*., 1993). ROBO ist normalerweise dafür verantwortlich, daß die Neurone ipsilateral projizieren und die Mittellinie nicht kreuzen (Kidd *et al*., 1998a). Die MLG exprimieren COMMISSURELESS. Dieses Protein wird über einen unbekannten Mechanismus auf die kommissuralen Axone übertragen und sorgt für eine Herunterregulation der *robo*-Expression. Dies erlaubt den kommissuralen Axonen, die Mittellinie zu kreuzen (Tear *et al*., 1996; Kidd *et al*., 1998b). Erneute Expression von ROBO in den Neuronen sorgt für ein Verbleiben auf der kontralateralen Seite und verhindert ein erneutes Kreuzen der Mittellinie.

Die MLG haben später bei der Etablierung des Axonmusters eine weitere entscheidende Funktion: Sie interkalieren zwischen die beiden Kommissuren, die sich in enger Nachbarschaft

entwickelt haben, und sorgen so für ihre räumliche Trennung. Defekte in den Mittelliniengliazellen verhindern diese Trennung und resultieren in einem „fusionierten Kommissuren“-Phänotyp (Abb. 12, 27B). Dieser Phänotyp ist charakteristisch für Differenzierungdefekte der Mittelliniengliazellen.

1.6 Ziel der Arbeit

Die *tramtrack*-Gruppe umfaßt die Gene *disembodied, rippchen, phantom, shade, shadow, spook, shroud* und *tramtrack*, die aufgrund ähnlicher Ausfallphänotypen zu einer Gruppe zusammengefaßt wurden. Das Ziel der Arbeit bestand in einer Charakterisierung dieser Gengruppe hinsichtlich ihrer Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems.

Zunächst sollte die Funktion des Gens *tramtrack* für die Nervensystementwicklung, speziell für die der ZNS-Gliazellen untersucht werden.

Die weitere Aufgabe bestand in der Charakterisierung der übrigen Gengruppenmitglieder. Dies beinhaltete die genaue Kartierung und eine detaillierte Beschreibung der Ausfallphänotypen, besonders in Hinblick auf das Nervensystem. Mögliche Interaktionen untereinander und mit verschiedenen anderen Signalwegen sollten untersucht werden. Schließlich sollte ein Mitglied der Gengruppe molekular isoliert und charakterisiert werden, um eine Vorstellung der molekularen Zusammenhänge zu bekommen.

2. Material und Methoden

2.1 Puffer, Medien und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von folgenden Firmen bezogen: Aldrich (Steinheim), Biomol (Groß-Gerau), Boehringer (Mannheim), Fluka (NeuUlm), BIBCO/BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Pharmacia/LKB (Freiburg), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Deishofen).

Agarablageplatten	18 g Agar werden in 500 ml Leitungswasser gelöst und autoklaviert. 8 g Saccharose und 1 ml Eisessig werden in 150 ml Leitungswasser gegeben und mit dem ca. 50 °C warmen Agar vermischt.
Araldit	52 ml Araldit Cy 212 48 ml Araldit Hy 964 (Härter) 1 h langsam rühren 2 ml Araldit Dy 964 (Beschleuniger) hinzutropfen
BCIP-Lösung	50 mg/ml BCIP in 70 % Dimethylformamid
Church Hybridisierlösung	0,5 M Church Stammlösung 7 % SDS
Church Stammlösung	1 M Na_2HPO_4, mit H_3PO_4 auf pH 7,2 eingestellt
Church Waschlösung	40 mM Church Stammlösung 1 % SDS
DAB-Lösung	0,5 mg/ml Diaminobenzidin in PBS
DEPC-H_2O	0,1 % Diethylpyrocarbonat in H_2O, ca. 2 h stehen lassen, anschließend autoklavieren

Drosophila-Standardmedium	8,5 g Agar	18 g Trockenhefe
	10 g Sojamehl	77 g Maismehl
	41 g Rübensirup	82 g Malzextrakt
	1/5 Eßlöffel Nipagin	4,5 ml Propionsäure
	in 1 l Leitungswasser lösen	
EDTA	0,5 M EDTA, mit 0,5 N NaOH auf pH 8 einstellen	
Ethidiumbromid	10 mg/ml, 4 µl/100 ml Agarose	
Fixativ (für Chromosomen)	Essigsäure/Wasser/Milchsäure 3:2:1	
Formaldehydfix	3,7 % Formaldehyd in PBS, 1:1 mit Heptan überschichtet	
Heptanfix	100 ml 2,5 % Glutaraldehyd in PBS, 1:1 mit Heptan auffüllen und zum Gebrauch kräftig schütteln; die Heptanphase zum Fixieren verwenden	
Heptankleber	Von Klebeband (Tesapack; Beiersdorf, Hamburg) wird der Kleber mit n-Heptan über mehrere Stunden vom Band gelöst. Der Überstand wird abgegossen, zentrifugiert und stellt das Klebergemisch dar.	
Hoyers Medium	30 g Gummi arabicum 50 ml H_2O, über Nacht rühren 200 g Chloralhydrat langsam unter Rühren hinzugeben 20 g Glycerin, zentrifugieren	
Hybridisierungspuffer	50 % Formamid 5 x SSC 50 µg/ml Heparin 0,1 % Tween 20	

Hybridisierlösung	Hybridisierungspuffer 100 µg/ml denaturierte Lachssperma-DNA
Injektionsansatz	ca. 5 µg DNA 1,5 µg Helper-DNA (pUChsΔ2-3, Laski *et al.*,1986) 1 µl Phenolrot 1,5 µl 10 x Injektionspuffer ad 15 µl H_2O
10 x Injektionspuffer	1 mM Phosphatpuffer pH 7,4 50 mM KCl
LB-Medium	10 g Bacto Trypton 140 5 g Bacto Yeast Extract 10 g NaCl ad 1 l H_2O ggf. pH 7 mit NaOH einstellen und autoklavieren für LB-Agar 12 g Agar pro 500 ml Medium zusetzen
Lysispuffer	0,1 M Tris/HCl, pH 9,0 0,1 M EDTA 1 % SDS
Natriumhypochloritlösung	10-15 % aktives Chlor (Chlorbleichlauge, Schindler & Co.), 1:1 mit Leitungswasser verdünnen
NBT-Lösung	75 mg/ml NBT in 70 % Dimethylformamid
NBT-Puffer	100 mM NaCl 150 mM $MgCl_2$ 100 mM Tris/HCl, pH 9,5

NZY-Medium	10 g Bacto Trypton 140 1 g Bacto Trypton 5 5 g Bacto Yeast Extract 5 g NaCl 2 g $MgSO_4$ ad 1 l H_2O, autoklavieren für NZY-Agar 12 g Agar pro 500 ml Medium zusetzen (für Top-Agar 6 g Agar pro 500 ml Medium)
PBS	130 mM NaCl 7 mM Na_2HPO_4 3 mM KH_2PO_4 2,7 mM KCl pH 7,6
PBT	0,3 % Triton X-100 in PBS
Phosphat-Puffer pH 7,0	577 ml 1 M Na_2HPO_4 423 ml 1 M NaH_2PO_4
Phosphat-Puffer pH 7,2	684 ml 1 M Na_2HPO_4 316 ml 1 M NaH_2PO_4
Phosphat-Puffer pH 7,4	774 ml 1 M Na_2HPO_4 226 ml 1 M NaH_2PO_4
RNA-Formaldehydgel	Agarose in H_2O aufkochen (3,5 Teile) auf ca. 60 °C abkühlen lassen Zugabe 2,2 M Formaldehyd (1 Teil) 1 x Formaldehydgel-Laufpuffer (1,1 Teile) Gel vor Probenauftrag 5 min vorlaufen lassen

5 x RNA-Formaldehydgel-Laufpuffer	0,1 M MOPS pH 7,0 40 mM NaAc 5 mM EDTA pH 8,0
RNA-Formaldehydgel (Probenvorbereitung)	4,5 µl RNA 2 µl 5 x RNA-Formaldehydgel-Laufpuffer 3,5 µl Formaldehyd 10 µl Formamid 15 min auf 65 °C aufheizen, anschließend auf Eis stellen
RNA-Homo-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 7,5 60 mM NaCl 20 mM EDTA 1 % SDS 50 µl Proteinase K (20 mg/ml) direkt vor Gebrauch
RNase-Stocklösung	100 mg/ml RNase (TypA) in 0,01 M Natriumacetat, pH 5,2 lösen, 15 min kochen und mit 0,1 Vol Tris/HCl, pH 7,5 auf pH 7 einstellen. Lagerung bei -20 °C
RNase-Wasser	RNase-Stocklösung (0,2 µg/ml) in Millipore-Wasser
SB-Medium	35 g Bacto Trypton 140 20 g Bacto Yeast Extract 5 g NaCl ad 1 l H_2O ggf. pH 7 mit NaOH einstellen und autoklavieren
SM-Puffer	10 mM NaCl 10 mM $MgSO_4$ 10 mM Tris/HCl, pH 7,5

SOC-Medium	2 % Bacto Trypton 140 0,5 % Bacto Yeast Extract 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM $MgCl_2$ 10 mM $MgSO_4$ autoklavieren, dann auf 20 mM Glukose einstellen
20 x SSC	3 M NaCl 300 mM Na-Citrat
STET	8 % Saccharose 5 % Triton X-100 50 mM EDTA 50 mM Tris/HCl pH 8,0
10 x TBE	500 mM Tris/HCl pH 8,2 500 mM Borsäure 50 mM EDTA
Tris/HCl	1 M Trisbase, pH mit HCl einstellen
TE	10 mM Tris/HCl, pH 8 1 mM EDTA
2 x YT-Medium	17 g Bacto Trypton 140 10 g Bacto Yeast Extract 5 g NaCl ad 1 l H_2O ggf. pH 7 mit NaOH einstellen und autoklavieren

2.2 Verwendete Antikörper

2.2.1 Primäre Antikörper

(Die Zahlen in Klammern geben die Verdünnungen an)

BP102 (1:10)	Maus, monoklonal	(Bieber, Patel, Goodman, unveröffentlicht)
22C10 (1:200)	Maus, monoklonal	(Fujita *et al.*, 1982)
44C11 (anti-elav) (1:10)	Maus, monoklonal	(Bier *et al.*, 1988)
1D4 (anti-Fasciclin II) (1:10)	Maus, monoklonal	(Helt und Goodman, unveröffentlicht)
MR1A (anti-prospero) (1:5)	Maus, monoklonal	(Spana und Doe, 1995)
anti-*hindsight* (1:50)	Maus, monoklonal	(Yip *et al.*,1997)
2A12 (1:5)	Maus, monoklonal	(Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa)
anti-*engrailed* (1:10)	Maus, monoklonal	(Patel *et al.*, 1989)
anti-*even skipped* (1:10)	Maus, monoklonal	(Patel *et al.*, 1994)
anti-β-Galaktosidase (1:5000)	Kaninchen, polyklonal	(Cappel)

anti-repo (1:1000)	Kaninchen, polyklonal	(Halter *et al.*, 1995)
anti-tramtrackp69 (1:1000)	Ratte, polyklonal	(Giesen *et al*., 1997)
anti-tramtrackp88 (1:1000)	Meerschweinchen, polyklonal	(Giesen *et al*., 1997)
anti-snail (1:1000)	Kaninchen, polyklonal	(Reuter)

2.2.2 Sekundäre Antikörper

(alle Verdünnungen 1:1000; Dianova GmbH)

AP-gekoppelte Ziege-anti-Kaninchen-F(ab)-2-Fragmente
HRP-gekoppelte Ziege-anti-Maus-F(ab)-2-Fragmente
HRP-gekoppelte Ziege-anti-Kaninchen-F(ab)-2-Fragmente
HRP-gekoppelte Ziege-anti-Meerschweinchen-F(ab)-Fragmente
HRP-gekoppelte Ziege-anti-Ratte-F(ab)-2-Fragmente
Cy3-gekoppelte Ziege-anti-Maus-F(ab)-2-Fragmente (1:200)
Cy3-gekoppelte Ziege-anti-Ratte-F(ab)-2-Fragmente (1:200)
Cy5-gekoppelte Ziege-anti-Ratte-F(ab)-2-Fragmente (1:200)
Cy5-gekoppelte Ziege-anti-Kaninchen-F(ab)-2-Fragmente (1:200)

2.3 Verwendete cDNAs

tramtrackp69	Harrison und Travers, 1990
tramtrackp88	Harrison und Travers, 1990
pointedP2	Klämbt, 1993
masquerade	Murugasu-Oei *et al*., 1995

2.4 Fliegenstämme

Fliegenstämme wurden, wenn nicht anders vermerkt, aus den Stock Centern in Bloomington oder Umea bezogen.

Stamm	*Merkmale*	*Literatur/Herkunft*
w^{1118}	Wildtyp, *white*$^-$	Stammsammlung Labor C. Klämbt
$\Delta 2\text{-}3,Ki,p^p$	konstitutiv aktives Transposase-Gen auf dem 3. Chromosom	Robertson *et al.*, 1988
UAS-lacZ	UAS-Sequenz vor lacZ-Gen	Brand und Perrimon, 1993
gcm^{DP1}	*glial cells missing*-Allel	Jones *et al.*, 1995
$mas^{64B;154;\ xs76;\ x124}$	*masquerade*-Allele	Murugasu-Oei *et al.*, 1995
w^{m4h}	variegierte Augen	Dorn *et al.*, 1993b
w^{m4h}; E512	variegierte Augen, mit einem *Enhancer of Variegation* kombiniert	Dorn *et al.*, 1993b
w^{m4h}; T(2;3) apXa Su(var)101	variegierte Augen, mit einem *Supressor of Variegation* kombiniert	Dorn *et al.*, 1993b
Ovo[D1]-FRT-3L bzw. Ovo[D1]-FRT-3R	weibliche Sterilität bzw. FRT-Sequenzen auf 3. Chromosom	Chou *et al.*, 1993
spi^{IIA14}	*spitz*-Allel	Nüsslein-Volhard *et al.*, 1984

2.4.1 P-Elementlinien

A72	P[w^+,lacZ]-Insertion bei 64A1-3	C. Klämbt
D30	P[w^+,lacZ]-Insertion bei 100A	C. Klämbt
E(var)181	P[hsneory^+]-Insertion bei 75A5-10	Dorn *et al*., 1993b
K110	P[w^+,lacZ]-Insertion bei 70E	C. Klämbt
Q114	P[w^+,lacZ]-Insertion bei 64C12-14	C. Klämbt
R135	P[w^+,lacZ]-Insertion bei 85D1-2	C. Klämbt
S87	P[w^+,lacZ]-Insertion in *prospero* (86E1-2)	C. Klämbt

2.4.2 *Enhancer trap*-Linien

AA142	ß-Gal-Expression in ML-Glia	Klämbt *et al.*, 1991
rA87	ß-Gal-Expression in longitudinalen Glia	Klämbt and Goodman, 1991
rI50	ß-Gal-Expression in longitudinalen Glia	Klaes *et al.*, 1994
X55	ß-Gal-Expression in ML-Neuronen	Klämbt *et al.*, 1991
MHC-lacZ	ß-Gal-Expression in somatischer Muskulatur	Hess *et al*, 1989
btl-Gal4, UAS τ-GFP	GFP-*Enhancer trap* Linie (Tracheen)	B. Shilo

2.4.3 Allele der *tramtrack*-Gruppengene

disembodied-Allele

dib^{3}	Stammsammlung Tübingen
$dib^{B17;\ D3}$	Harrison *et al*., 1995
$dib^{D4\text{-}42;\ D2\text{-}65*;\ E2\text{-}70;\ J3\text{-}124}$	Stammsammlung Labor C. Klämbt

haunted-Allele

$hau^{11;\ 1M;\ 9G}$	Stammsammlung Tübingen

phantom-Allele

phm^{EX}	Stammsammlung Tübingen

rippchen-Allele

$rpc^{D1\text{-}42*;\ O2\text{-}54}$	Stammsammlung Labor C. Klämbt

shade-Allele

$shd^{1;\ 2;\ 3}$	Stammsammlung Tübingen
$shd^{B1\text{-}53*;\ J1\text{-}28;\ N2\text{-}175}$	Stammsammlung Labor C. Klämbt

shadow-Allele

$sad^{1;\ 2}$	Stammsammlung Tübingen
$sad^{C1\text{-}25;\ C3\text{-}9*;\ G1\text{-}19;\ J1\text{-}35}$	Stammsammlung Labor C. Klämbt

spook-Allele

$spo^{1;\ 2}$	Stammsammlung Tübingen
$spo^{D3\text{-}110*;\ D4\text{-}25;\ E2\text{-}13;\ E2\text{-}68}$	Stammsammlung Labor C. Klämbt

shroud-Allele

$sro^{1;\ 2}$	Stammsammlung Tübingen
$sro^{T35;\ O4\text{-}105}$	Stammsammlung Labor C. Klämbt

tramtrack-Allele

ttk^{B330}	amorphes EMS-Allel, Salzberg *et al*., 1994

Die mit * versehenen Stämme tragen eine *AA142* P[w^{+},lac Z] Insertion.

2.4.4 Verwendete *tramtrack*-Konstrukte

UAS*ttk* p69	*tramtrack* p69 in pUAST	Giesen *et al.*,1997
UAS*ttk* p88	*tramtrack* p88 in pUAST	Giesen *et al.*,1997
UAS*ttk* 130C	*tramtrack* p69 ohne POZ/BTB-Domäne (Δ 130)	P. Badenhorst, unveröffentlicht
UAS*ttk* 130	*tramtrack* p69, nur POZ/BTB Domäne	P. Badenhorst, unveröffentlicht
UAS*ttk* m2, m13, m19	*tramtrack* p69, verschiedene Punktmutationen in der POZ-Domäne (m2: S53A; m13: D32A; m19: D32N)	P. Badenhorst, unveröffentlicht

2.4.5 Gal4-Aktivatorlinien

511	*rhomboid*-Gal4, 2. Chromosom	Ip & Levine, unveröffentlicht
512	*rhomboid*-Gal4, 3. Chromosom	Ip & Levine, unveröffentlicht
537	*scabrous*-Gal4	U. Hinz
sli-Gal III	*slit*-Gal4, 3. Chromosom	Klämbt *et al*., 1996
neu *sli* Gal 2+ XIV	*slit*-Gal4, 2. Chromosom	Klämbt *et al*., 1996
Kr-Gal4	*krüppel*-Gal4	M. Leptin
sim-Gal4	*single-minded*-Gal4	Scholz *et al.*, 1997
K24	*sevenless*-Gal4	K. Basler, unveröffentlicht

2.4.6 Balancerchromosomen

CyO	zweitchromosomaler Balancer, *Curly*-markiert	Stammsammlung Labor C. Klämbt
Sp	*Sternopleural*-markiertes zweites Chromosom	Stammsammlung Labor C. Klämbt
TM2	drittchromosomaler Balancer, *Ultrabithorax*-markiert	Stammsammlung Labor C. Klämbt
TM3	drittchromosomaler Balancer, *Stubbled*-markiert, auch mit P[*elav*-lacZ] als *blue balancer*	Stammsammlung Labor C. Klämbt
TM6	drittchromosomaler Balancer, diverse Varianten, auch mit P[*Ubx*-lacZ] als *blue balancer*	Stammsammlung Labor C. Klämbt
MKRS	drittchromosomaler Balancer, *Stubbled*-markiert	Stammsammlung Labor C. Klämbt

2.5 Genetische Methoden

2.5.1 Fliegenzucht

Die Fliegenstämme werden in der Regel auf *Drosophila*-Standardmedium in Plastikröhrchen bei 25 °C gehalten. Für Kreuzungen werden jungfräuliche Weibchen und Männchen verschiedener Altersstufen verwendet.

2.5.2 Sammeln von Embryonen

Für Eiablagen werden gut gefütterte Fliegen in ein mit Luftlöchern versehenes Plastikgefäß überführt. Dieses Gefäß wird mit einer Ablageagarplatte (mit etwas frischer Bäckerhefe) verschlossen. Die Platten werden im allgemeinen alle 12 Stunden gewechselt.

2.5.3 Herstellung von Augenklonen/ Keimbahnklonen

Larven werden bei 120 kV unter Verwendung eines 0,3 mm Alufilters mit 10 Gray bestrahlt. Bei Verwendung geeigneter genetischer Marker (Augenfarbe) findet man bei den schlüpfenden Fliegen entsprechende Augenklone. Für Keimbahnklone werden vorher Kreuzungen gegen OvoD-FRT-Chromosomen angesetzt.

2.5.4 Mobilisierung von P-Elementen („Jump Out")

Das Einkreuzen einer Transposase in eine P-Element-Linie dient der Erzeugung von Revertanten und/oder Exzisionsmutanten. Dabei wird auf Verlust des w^+- oder ry^+-markierten P-Elementes selektiert.

P: $\frac{\Delta 2\text{–}3,Ki,p^p}{\Delta 2\text{–}3,Ki,p^P}$ x $P[w^+]$

F_1: $w^- \frac{TM2}{TM6}$ x $\frac{P[w^+]}{\Delta 2\text{–}3,Ki,p^p}$

In der F_2-Generation werden weißäugige Männchen (ohne P-Element) erneut gegen Balancer-Weibchen gekreuzt und daraus Stämme etabliert.

2.5.5 Erzeugung P-Element induzierter Mutationen („Local Hop")

Erfolgt ebenfalls durch Mobilisierung des P-Elementes, allerdings werden in der F_2-Generation P-Element-tragende Männchen (w^+ bzw ry^+) auf Letalität über entsprechende Mutationen getestet. Im Falle der Nicht-Komplementation (allelisches Verhalten) werden Stämme etabliert.

2.6 Histologische Methoden

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

Embryonen werden mit PBT von Ablageagarplatten in *multiwell*-Plexiglasplatten (kurz: MWP) überführt

Dechorionisierung mit 5 % NaOCl für 3-5 min

mit H_2O waschen, auf Papierhandtüchern trocknen

Überführen der MWP in Heptanfix, Fixierung für 6-10 min

[sollen kernständige Proteine nachgewiesen werden, so empfiehlt sich Formaldehydfixierung:

Überführen der MWP in Heptan

Überführen der Embryonen in ein verschließbares Reagenzglas mit 2 ml Heptan

2 ml 3,7 % Formaldehyd/PBS

Fixierung auf dem Taumler für 15 min

Absaugen der wäßrigen Phase]

Zugabe von 2 ml MeOH, zur Devitellinisierung kräftig schütteln, Embryonen absinken lassen

Heptan und MeOH entfernen

je einmal kurz mit MeOH und 80 % EtOH waschen

3 x kurz mit PBT waschen, 3 x 20 min mit PBT auf Taumler waschen

Präinkubation in 10 % GS/PBT für 1 Stunde

Inkubation des ersten Antikörpers in geeigneter Verdünnung in 1 ml 10 % GS/PBT ü.N. bei 4°C auf Taumler

3 x 20 min mit PBT waschen

Inkubation des zweiten Antikörpers in 10 % GS/PBT für 2 h bei RT

3 x 20 min PBT waschen

2.6.2 Antikörperspezifische Nachweisreaktionen

Alkalische Phosphatase (AP)-Färbung

Embryonen mit NBT-Puffer waschen

Embryonen in 1 ml NBT-Puffer aufnehmen

4,5 µl NBT-Lösung und 3,5 µl BCIP-Lösung zugeben

Stoppen der Reaktion mit PBT, wenn Färbung erreicht ist

3 x waschen mit PBT

Meerrettich-Peroxidase (HRP)-Färbung

Inkubation der Embryonen in 0,5 ml DAB-Lösung (0,5 mg/ml PBS) + 1 µl H_2O_2

Abstoppen der Reaktion mit PBT, wenn gewünschte Farbstärke erreicht ist

3x waschen mit PBT

Aufbewahrung der Embryonen in 70 % Glycerin, ggf. Filetierung

2.6.3 *whole mount-in situ*-Hybridisierung

(Alle Lösungen werden mit DEPC-H_2O angesetzt; PBT mit 0,1 % Tween 20 in PBS)

Überführen der Embryonen mit PBT von Ablageagarplatten in MWP

Waschen mit PBT

Dechorionisierung mit 5 % NaOCl für 3-5 min

mit H_2O waschen, auf Papierhandtüchern trocknen

Waschen mit H_2O

Überführen der MWP in Heptan

Überführen der Embryonen in ein verschließbares Reagenzglas mit 2 ml Heptan

Fixierung mit 2 ml 10 % Formaldehyd in PBS für 30 min

zur Devitellinisierung wäßrige Phase abnehmen

Zugabe von 2 ml MeOH, kräftig schütteln, Embryonen absinken lassen

Heptan und MeOH entfernen

Waschen mit MeOH (und mehrmals mit 100 % EtOH, falls die Embryonen bei -20 °C gelagert werden sollen)

Waschen mit MeOH/PBT 1:1

zweites Fixieren mit 5 % Formaldehyd in PBT für 20 min
3 x 2 min mit PBT waschen
Proteinase-Verdau: 3 min mit 50 µg/ml nicht vorverdauter Proteinase K (Boehringer) in PBT inkubieren
Abstoppen durch Waschen mit 2 µg/ml Glycin in PBT (1 x kurz, 1 x 5 min)
2 x kurz mit PBT waschen
Postfixierung mit 5 % Formaldehyd in PBT für 15 min
5 x 2 min mit PBT waschen
Waschen mit PBT/Hybridisierlösung 1:1
Waschen mit Hybridisierlösung
Vorhybridisierung in Hybridisierlösung bei 50 °C für mind. 1 h
Hybridisierung in kleinem Volumen mit ca. 10 ng DIG-Probe bei 50 °C über Nacht
Waschen der Embryonen bei 50 °C:
1 x Hybridisierlösung für 10 min, 1 x Hybridisierlösung/PBT 1:1 für 10 min,
5 x PBT für 20 min
1 x 10 min mit PBT bei RT waschen
Inkubation mit präabsorbiertem anti-DIG-Antikörper (1:2000) 1 h bei RT oder ü. N. bei 4 °C
4 x 20 min mit PBT waschen
5 min in NBT-Puffer waschen
Nachweisreaktion:
Embryonen in 1ml NBT-Puffer aufnehmen
4,5 µl NBT-Lösung und 3,5 µl BCIP-Lösung zugeben, im Dunkeln inkubieren
Abstoppen durch Waschen mit PBT
Embryonen durch Alkoholreihe (50%, 70%, 90%, 95%, 2 x 100%) entwässern und in Kanadabalsam (Roth, Karlsruhe) einbetten

2.6.4 Hybridisierung an polytänen Speicheldrüsenchromosomen

Siliconisieren von Deckgläsern
Deckgläser in 1 % Dichlordimethylsilan in Chloroform baden
trocknen (> 1h)
in 100 % EtOH aufbewahren

Präparation von Speicheldrüsenchromosomen

L3-Larven mit Hefe anfüttern

Herauspräparieren der Speicheldrüsen in 45 % Essigsäure

Überführen auf Objektträger mit Fixativ

Auflegen eines siliconisierten Deckglases, leichtes Zerreiben der Speicheldrüsen

überschüssige Flüssigkeit abtupfen und Präparat kräftigem Druck aussetzen

Deckglas in flüssigem Stickstoff abflippen und Objektträger sofort in 99 % EtOH für 5 min überführen

Lufttrocknen

Chromosomenhybridisierung

Waschen der Objektträger 30 min in 2 x SSC bei 65 °C, 2 min in 2 x SSC bei RT

Acetylieren in 50 ml 0,1 M Triethanolamin, 62,5 µl Acetanhydrid für 10 min

2 x 5 min in 2 x SSC waschen

Dehydrieren 2 x 5 min in 70 % EtOH, 5 min in 95 % EtOH

Lufttrocknen

Denaturieren für 3 min in 0,07 N NaOH

2 x 5 min in 2 x SSC waschen

erneut Dehydrieren (s.o.)

denaturierte DIG-Probe in 40 µl Hybridisierungslösung auftropfen, Deckglas auflegen

über Nacht bei 37 °C in feuchter Kammer

in Hybridisierungspuffer spülen

2 x 10 min in PBS waschen

100 µl AP-anti-DIG-Antikörper (1:1000 in PBS) auftropfen, Deckglas auflegen und > 1 h bei RT in feuchter Kammer inkubieren

4 x 5 min in PBS waschen

kurz in NBT-Puffer baden

100 µl Färbelösung (1 ml NBT-Puffer, 4,5 µl NBT-Lösung, 3,5 µl BCIP-Lösung) aufbringen

1-12 h in feuchter Kammer bei 37 °C,

Abstoppen durch Waschen mit bidestilliertem Wasser, bei 4 °C aufbewahren

Giemsa-Färbung von Chromosomen

Objektträger 50 s in Giemsa-Lösung (1 x Giemsa in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,2) inkubieren, mit Wasser abstoppen

2.6.5 Kutikula-Präparation von Embryonen

Von einer gealterten Ablageplatte werden die toten Embryonen abgesammelt, in 5 % NaOCl dechorionisiert und anschließend in Wasser überführt. Mit einem Pinsel werden die Embryonen in Hoyers Medium übertragen und ein Deckglas aufgelegt. Die Klärung erfolgt bei 65 °C über Nacht. (Besserer Kontrast wird durch Einbetten in Hoyers/Milchsäure 1:1 erzielt.)

Manuelle Devitellinisierung der Embryonen

(Es empfiehlt sich Fixierung in Glycerin/Essigsäure 1:4 für mind. 1 h bei 65 °C)

Embryonen nach Fixierung auf doppelseitiges Klebeband übertragen, Rest Fixativ absaugen und mit H_2O überschichten. Die Embryonen können nun mit einer stumpfen Nadel aus der Vitellinmembran entfernt und in Hoyers überführt werden.

2.6.6 Anfertigung von Augenschnitten

Simultanfixierung für Augenschnitte

Alle Schritte bis zum Ende der Alkoholreihe werden auf Eis durchgeführt, danach bei RT.

Die Augen werden abgeschnitten und für 30 min in 2 % Glutaraldehyd, 1 % Osmiumtetroxid in 0,1 M Phosphatpuffer fixiert. Danach 2 x mit 0,1 M Phosphatpuffer waschen und für 2 h in 2 % Osmiumtetroxid in 0,1 M Phosphatpuffer nachfixieren. Die Augen werden mit dest. Wasser gewaschen, über eine Alkoholreihe (50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 2x 100 % EtOH) für je 5 min entwässert und 2 x 15 min in Propylenoxid inkubiert. Danach erfolgt Propylenoxid/Araldit (1:1) über Nacht und reines Araldit für 8-12 h. Die Augen werden in Araldit in entsprechenden Formen eingebettet. Das Araldit härtet bei 65 °C über Nacht aus.

Die Augen werden am Mikrotom mit einem Glasmesser in Scheiben einer Dicke von 1,5 µm geschnitten und in Permount eingebettet.

2.6.7 Dünnschnitte von Embryonen

Die Embryonen werden manuell devitellinisiert (ohne Fixierung) und simultanfixiert (s.o.) bzw. nach evtl. Antikörperfärbung entwässert, in Propylenoxid inkubiert und anschließend in Araldit eingebettet. Die Embryonen werden in Scheiben geeigneter Dicke geschnitten.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 DNA-Restriktion

Restriktionsenzyme wurden von der Firma Boehringer Mannheim bezogen. DNA-Restriktionen erfolgten gemäß Herstellerangaben.

2.7.2 Gelelektrophorese

Trennung der DNA-Fragmente bei 100-150 V durch Horizontal-Gelelektrophorese in Ethidiumbromid-Agarosegelen, je nach Verwendungszweck mit Gelen von 0.8-1 % Agarose/TBE (Sambrook et al., 1989), zum Größenvergleich dient eine 1 kb-Leiter (Gibco/BRL).

2.7.3 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Zur Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösung wird ein zweckmäßiges Volumen auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Als Standard dient 1 µg 1kb-Leiter (Gibco/BRL). Die Konzentration der DNA-Lösung wird durch Vergleich der relativen Fluoreszenzintensitäten unter UV-Licht abgeschätzt.

2.7.4 Elution von DNA-Fragmenten aus einem präparativen Gel

Restriktionsverdau mit gewünschter Menge DNA

Gelelektrophorese

Ausschneiden der Banden mit Hilfe einer Rasierklinge auf einem UV-Tisch

Elektroelution

Das Gelstück wird in ein Isco Kammersystem gelegt, das mit 0,1 x TBE, 0,005 % SDS gefüllt ist. Die äußere Kammer wird mit 2 x TBE gefüllt. Die Elution erfolgt bei 4 mA pro Kammer für 1 Stunde. Anschließend wird die Elektrophoreserichtung für 10 s umgepolt, um die DNA von der Membran zu lösen.

Säulen-Elution

Die Elution wurde mit dem Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Düsseldorf) gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

2.7.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation werden Vektor und das zu klonierende DNA-Fragment im molaren Verhältnis von 1:3 bis 1:10 eingesetzt.

Wird der Vektor nur mit einem Enzym geöffnet, so ist die Vektor-DNA vor Ligation für 1 h mit SAP (1 µg/µl shrimp alkaline phosphatase, Boehringer) zu behandeln, um durch Dephosphorylierung die kinetisch bevorzugte, intramolekulare Religation zu verhindern. Bei Vektoren, die mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen geöffnet wurden, kann darauf verzichtet werden.

Ligationsansatz

100 ng Vektor-DNA

3-10fache molare Menge Fragment-DNA

4 µl 5 x Ligasepuffer (BRL)

ad 20 µl H_2O

1 µl T4-Ligase (BRL)

Inkubation 2 h bei 37 °C oder ü.N. bei 14 °C

2.7.6 Herstellung von elektrotransformationskompetenten XL-1 blue- oder DH5-α-*Escherichia coli*

1 l (2 x 0,5 l) LB-Medium mit 10 ml einer frischen Übernachtkultur animpfen, bei 37 °C im Schüttler bis zu einer OD_{600} von 0,4-0,6 inkubieren.

Kultur 15-20 min auf Eis stellen

in einem vorgekühlten Rotor bei 4000 rpm 15 min bei 4 °C zentrifugieren

Pellet in 1 l kaltem bidestillierten Wasser resuspendieren

Zentrifugation wie oben

Pellet in 0,5 l kaltem bidestillierten Wasser resuspendieren

Zentrifugation wie oben

Pellet in ca. 20 ml 10 % Glycerin/H_2O resuspendieren

Zentrifugation wie oben

Resuspendieren des Pellets in 2-3 ml 10 % Glycerin/H_2O

(Zellkonzentration beträgt dann ungefähr 1-3 x 10^8 Zellen/ml)

auf Eis 40 µl-Aliquots der Suspension herstellen und bei -70 °C lagern

2.7.7 Elektrotransformation von Bakterienzellen

kompetente Zellen auf Eis auftauen

40 µl Zellsuspension mit geeigneter DNA-Menge (0,5-2 µl DNA-Lösung) mischen und in eine 0,2 cm Elektroporationsküvette überführen

im "Gene Pulser" (Biorad) transformieren:

Impuls von 4-5 ms bei einer Feldstärke von 12,5 KV/cm

sofort 1 ml handwarmes SOC-Medium zugeben, in Reagenzglas überführen und bei 37 °C für 30-60 min inkubieren

auf geeignetem Medium ausplattieren, ü.N. bei 37 °C inkubieren

2.7.8 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

2 ml LB-Medium (mit Selektion) mit Einzelkolonie animpfen und ü.N. im 37 °C-Schüttler inkubieren

Ca. 1,5 ml Bakterienkultur in Sarstedt-Reagiergefäß überführen, den Rest aufheben

in Tischzentrifuge 15 s bei 13.000 rpm abzentrifugieren

400 µl STET zum Pellet geben und vortexen, bis das Pellet gelöst ist

1 min kochen, anschließend in Tischzentrifuge 7 min bei 13.000 rpm zentrifugieren

Überstand zu 400 µl Isopropanol in neues Reagiergefäß geben, mischen durch Invertieren und 10 min bei 13.000 rpm zentrifugieren

Pellet mit 70 % Ethanol waschen, trocknen und in 200 µl RNase-H_2O resuspendieren

2.7.9 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Präparation größerer DNA-Mengen erfolgt aus 50 ml Übernachtkulturen. Es werden dazu Kits der Firma Qiagen (Qiagen GmbH, Düsseldorf) entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

2.7.10 Präparation genomischer Fliegen-DNA

Ca. 40 betäubte Fliegen werden für mind. 10 min bei –20 °C eingefroren

Zugabe 100 µl Lysispuffer und Homogenisation

Zugabe weiterer 700 µl Lysispuffer, gut mischen

30 min bei 70 °C inkubieren (zwischendurch mischen)

Zugabe 154 µl 8 M K-Acetat, gut mischen

30 min auf Eis inkubieren

Zentrifugation für 30 min bei 10.000 rpm

Überstand überführen, erneut zentrifugieren
Überstand überführen
Fällung der DNA durch Zugabe 75 µl 2 M NaCl, 700 µl Isopropanol
vorsichtig mischen, Zentrifugation für 15 min bei 13.000 rpm
Überstand abgießen, Pellet mit 70 % EtOH waschen, trocknen lassen
Aufnahme in 100 µl RNase-Wasser

2.7.11 Präparation von Fliegen-Gesamt-RNA

Fliegen für ca. 2 h in einem sauberen Gefäß halten, um die Fliegen hefefrei zu bekommen
Ca. 100 Fiegen in fl. N_2 zerstoßen
Zugabe 4 ml RNA-Homo-Puffer und Fliegen zermörsern
Inkubation 1 h bei 37 °C
2 x Phenol-Extraktion
1 x Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)-Extraktion
Zugabe NaAc auf 200 mM
Fällung mit 2 Vol EtOH abs, Zentrifugation
Pellet mit 70 % EtOH waschen, trocknen
Lösen des Pellets in 1 ml H_2O
Zugabe 0,5 ml 10 M LiCl, 2 h bis ü. N. auf Eis inkubieren
Zentrifugation für 10 min bei 20.000 g
Pellet mit 70 % EtOH waschen, trocknen
Pellet in 1 ml H_2O lösen
Zugabe NaAc auf 200 mM, 2 Vol EtOH abs
Zentrifugation
Pellet mit 70 % EtOH waschen, trocknen
Pellet in 400 µl H_2O lösen

2.7.12 Digoxigenin-Markierung von DNA-Proben

250 ng DNA in 15 µl Volumen (DEPC-H_2O) werden durch 10 min Kochen denaturiert und auf Eis gehalten. Die Markierung erfolgt durch Zugabe von Hexonucleotiden, dNTP-Markierungsgemisch und Klenow-Polymerase nach Herstellerangaben für 3 h bei 37 °C. Danach wird der Ansatz mit DEPC-H_2O auf 50 µl Volumen aufgefüllt.

2.7.13 Fluorescein-Markierung von DNA-Proben

Erfolgt mit dem *Gene Images* random prime labeling System (Amersham) gemäß Herstellerangaben.

2.7.14 Nachweis Fluorescein-markierter DNA-Proben

Erfolgt mit *Gene Images* CDP-Star Detection System (Amersham) gemäß Herstellerangaben.

2.7.15 DNA-Transfer auf Nylonmembran ("Southern Blot")

Der Kapillartransfer der DNA auf eine Nylonmembran erfolgt abgewandelt nach Sambrook *et al.*, 1989.

2.7.16 Hybridisierung mit einer markierten DNA-Sonde

Nylonmembran für 1 h bei 65 °C in Church Hybridisierungspuffer präinkubieren.
Zugabe der markieren DNA-Sonde und Inkubation ü.N. bei 65 °C.
Waschen mit Church Waschlösung 3 x 10 min (ggf. weniger stringente Bedingungen wählen)
Nachweisreaktion

2.7.17 Sichtung von Phagen

Herstellung kompetenter Zellen

Phagenwirtsstamm (Y 1090, C 600) einer frischen Übernachtkultur auf 10 mM $MgSO_4$, 10 mM Maltose einstellen. Die Kultur kann bei 4 °C mehrere Wochen aufbewahrt werden.

Ausplattieren von Phagen

Nach Bestimmung des Titers wird eine etwa 40.000 Phagen entsprechende Menge der Phagenbank mit 300 µl Bakteriensuspension versetzt (für die erste Sichtung sollten insgesamt etwa 200.000 Phagen verwendet werden). Nach 15 min Penetrationszeit bei 37 °C werden 7 ml ca 50 °C warmer NZY-Topagar hinzugegeben und auf NZY-Agarplatten ausplattiert.
Zur erneuten Sichtung werden ausgestochene Phagenplaques in 1 ml SM-Puffer aufgenommen. Nach 1 h wird eine entsprechende Menge der Phagensuspension (meist Verdünnungsreihe) mit 100 µl Bakteriensuspension versetzt und nach 15 min mit 3 ml NZY-Topagar auf NZY-Agarplatten ausplattiert.

Herstellung von Filtern

Entsprechende Stücke von Hybond N^+-Filtermembran werden 1 min auf die Agarplatten aufgelegt. Anschließend wird die DNA durch Inkubation bei 100 °C für 1 min im Autoklaven fixiert.

2.7.18 Präparation von Phagen-DNA

100 ml Bakteriensuspension mit Phagen ü.N. inkubieren
Zugabe 5,8 g NaCl (1 M) und 300 µl Chloroform
15 min Inkubation
Zentrifugation für 15 min bei 6000 rpm
Überstand mit 1/1000 Vol DNase/RNase (je 10 mg/ml) versetzen, 30 min bei 37 °C inkubieren
Zugabe ¼ Vol PEG 6000
Inkubation 1-2 h auf Eis
Zentrifugation für 10 min bei 7000 rpm
Pellet im 2 ml SM aufnehmen

Phenol-Chloroform-Extraktion

Zugabe 1/10 Vol 0,5 M EDTA, 1/10 Vol 20 % SDS, 1 Vol Phenol
taumeln, 5 min bei 4200 rpm zentrifugieren
Oberphase überführen
Zugabe 0,5 Vol Phenol, 0,5 Vol Chloroform, taumeln, 2 min bei 4200 rpm zentrifugieren
Oberphase überführen
Zugabe 1 Vol Choroform, taumeln, 2 min bei 4200 rpm zentrifugieren (ggf. mehrmals)
Oberphase ohne Chloroform überführen

Ethanolfällung

Zugabe 1/10 Vol NH_4Ac, 2,5 Vol EtOH abs., mischen
Zentrifugation für 10 min bei 10.000 rpm
Pellet mit 70 % EtOH waschen, trocknen
in geeignetem Volumen Wasser oder TE aufnehmen

Alternativ können Kits der Firma Qiagen (Qiagen GmbH, Düsseldorf) entsprechend den Herstellerangaben verwendet werden.

2.7.19 Präparation von Cosmid-DNA

Erfolgt aus einer 400 ml Übernachtkultur in YT-Medium. Cosmidbildung wird durch Zugabe von 1 mM IPTG (frisch angesetzt) 3 h vor Ernte bzw. bei Ansetzen der Kultur induziert. Es werden dazu Kits der Firma Qiagen (Qiagen GmbH, Düsseldorf) entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

2.7.20 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für inverse PCR wird die genomische DNA zunächst mit geeigneten Restriktionsenzymen (z.B. *AluI, DdeI, NdeII* oder *RsaI*) verdaut. Etwa 100 ng DNA werden ü.N. bei 16 °C in einem Volumen von 100 µl ligiert und dienen als Template für die Reaktion.

Reaktionsansatz (50 µl)

Menge:	Standard	inverse	final (c)
Template	4 µl	10 µl	
10 x Puffer	5 µl		1 x
$MgCl_2$			1,5 mM*
dNTP (10 mM)	1 µl		0,2 mM
Primer (2 µM)	je 10 µl	je 2,5 µl	je 0,4 µM/0,1 µM
Taq-Polymerase			1-2 U
H_2O			ad 50 µl

* Mg-Konzentration kann ggf. erhöht werden

Temperaturprofil Standard PCR

Initiale Denaturierung	94 °C	1 min
Denaturierung	94 °C	0:40 min
Anneling	54 °C*	0:40 min
Extension	72 °C	1:30 min
Anzahl Zyklen	30	
Finale Extension	72 °C	5 min
Kühlen	4 °C	nach Bedarf

Temperaturprofil inverse PCR

Initiale Denaturierung	94 °C	1 min
Denaturierung	94 °C	0:30 min
Anneling	54 °C*	1 min
Extension	72 °C	3:30 min
Anzahl Zyklen	35	
finale Extension	72 °C	5 min
Kühlen	4 °C	nach Bedarf

* abhängig vom Tm-Wert der eingesetzten Primer

2.7.21 RT-PCR

Priming

RNA	8 µl	3-5 µg
Primer/Hexanucleotide	1 µl	20 µM

10 min auf 65 °C, anschließend auf Eis

Reverse Transkription

RNA/Primer	9 µl
5 x RT-Puffer	4 µl
DTT 0,1 M	2 µl
dNTP (10 mM)	3 µl
RNase-Inhibitor	0,1 µl
RT	1 µl

10 min	30 °C
1 h	42 °C
30 min	50 °C
10 min	70 °C

auf 4 °C abkühlen

Anschließend werden 4 bzw. 10 µl für eine Standard-PCR eingesetzt.

2.7.22 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden auf einem PE Applied Biosystems ”ABI PRISM 310 Genetic Analyzer” unter Verwendung des ”dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

2.8.1 Herstellung des PEP-Konstruktes

tramtrack p69 cDNA im BlueSkript-Vektor wurde mit dem Restriktionsenzym *DraIII* geschnitten, ebenso *pointed* 5.2 cDNA im BlueSkript-Vektor. Die Überhänge wurden mit T4-DNA-Polymerase entfernt. Die *tramtrack*-DNA wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym *BamHI*, die *pointed*-DNA mit dem Restriktionsenzym *XbaI* geschnitten und die entsprechenenden Fragmente, der N-terminale Teil von *ttk* (*ttk*-POZ, 1,2 kb) und der C-terminale Teil von *pnt* (*pnt* ETS, 1,6 kb), nach Gelelektrophorese eluiert. Beide Fragmente wurden gleichzeitig in den mit den Restriktionsenzymen *BglII* und *XbaI* geöffneten pUAST-Vektor hineinligiert. Um sich von der Korrektheit der Übergangsstelle zu überzeugen, wurde sie vom Primer *pnt2/1742* ausgehend sequenziert. Das resultierende Konstrukt wird PEP (für **P**OZ-**E**TS-**P**rotein) genannt.

2.8.2 Herstellung des UAS*mas*-Konstruktes

Die *mas* cDNA mit Hilfe des Restriktionsenzyms *EcoR1* aus dem *Blueskript*-Vektor in den pUAST-Vektor umkloniert. Die korrekte Orientierung der cDNA wurde durch verschiedene Restriktionsansätze bestätigt.

2.9 Verwendete Primer

P-Element Primer:

205	CGA CGG TAC CAC CTT ATG TT
204	TGC GAG TGA AAG GAA TAG TA
402	GAA GCT TAC CGA AGT ATA CA
Plac1	CAC CCA AGG CTC TGC TCC CAC AAT
Plac4	ACT GTG CGT TAG GTC CTG TTC ATT GTT
Pry1	CCT TAG CAT GTC CGT GGG GTT TGA AT
Pry2	CTT GCC GAC GGG ACC ACC TTA TGT TAT T

tramtrack-Primer:

ttk 50 POZ	GTG CTA TCC GCC TGC AGT CCC
ttk 302 PEST	TAT GGA ACC TCA ACT TAT GCT GG
ttk PEST INV	CCA GCA TAA GTT GAG GTT CCA TA
ttk 501⁻ Zn	TAC GTA TGC TCG CCC TCT TTG G

disembodied-Primer

dib 1-3´	TGA AAC ACT TCC TGA TGT TGC C
mas 5´	ACA CGT TGG CAA ACG ATG ACG
mas 3´	TTG AGT ATG GAT TTG GTT GGG
BAC686rev	TAT CAG ACC AGT TGC GTC CAC
BAC709	CTC CGA AAG CCA TGC ACA TCC
BAC9300rev	ACC AAG CAG CTG CCC AAG CAG
scrt5´	CTT CCT GAT TGT TGC CTT TGC
scrt3´	TGT CAA TGG CCG TCG AGA CG

sonstige Primer

pnt2/1742	TGT GGG AGT GGG GCG TGG

3. Ergebnisse

Zunächst werden kurz die Ergebnisse dargestellt, die die Funktion von *tramtrack* für die embryonale Gliazellentwicklung beschreiben. Danach wird anhand weiterer Untersuchungen die Funktion des *tramtrack*-Proteins analysiert und anschließend auf eine Gruppe von Genen eingegangen, die zu einem *tramtrack*-ähnlichen Ausfallphänotyp führen und daher zur *tramtrack*-Gengruppe zusammengefaßt wurden.

3.1 Die Funktion von *tramtrack* bei der Nervensystementwicklung

3.1.1 Das Expressionsmuster von *tramtrack*

Das Gen *tramtrack (ttk*) kodiert zwei Transkripte, ttkp69 und ttkp88. Beide Proteine werden während der Embryonalentwicklung in zahlreichen Geweben exprimiert und haben ein ähnliches Expressionsmuster.

Eine maternale Expression ist während der ersten zwei Stunden der Entwicklung, bis zum Beginn der Zellularisierung, nachzuweisen. Die Transkripte sind homogen über den Embryo verteilt. Die zygotische Expression beginnt im Stadium 9, zunächst in den Anlagen des Mitteldarmes und den Polzellen. Ab Stadium 11 ist *ttk* in den Speicheldrüsen- und Tracheen-placoden nachweisbar (Read und Manley, 1992; Read *et al*., 1992; Brown und Wu, 1993). Vom Stadium 12 an wird *tramtrack* in der Epidermis, den Tracheen, den Speicheldrüsen, der Amnioserosa, dem Hinterdarm und den posterioren Spirakeln exprimiert (Abb. 2A).

Der Unterschied in der Expression beider Proteine besteht darin, daß TTKp69 im Gegensatz zu TTKp88 im ZNS nachweisbar ist. TTKp69 wird in allen Gliazellen des ZNS exprimiert, sowohl in den lateralen als auch in den Mittelliniengliazellen (Abb. 2B). Es ist das einzige bekannte Protein, das in beiden Untergruppen der ZNS-Gliazellen exprimiert wird.

3.1.2 Der *tramtrack*-Ausfallphänotyp

Während der Ausfall von *ttkp88* nur geringe phänotypische Auswirkungen zeigt und die Vitalität nicht beeinträchtigt, führt der Ausfall von *ttkp69* zu embryonaler Letalität (Xiong und Montell, 1993).

Im ZNS kommt es zu einem deutlichen „fusionierten Kommissuren“-Phänotyp, einem Defekt, der bei Störungen in der Entwicklung der Mittelliniengliazellen auftritt. Die Konnektive sind verdünnt und das gesamte ZNS ist schmaler als im Wildtyp (Abb. 2C, D). Die Faszikel der Konnektive, die sich mit dem Antikörper 1D4 (anti-FasciclinII) darstellen lassen, sind in der

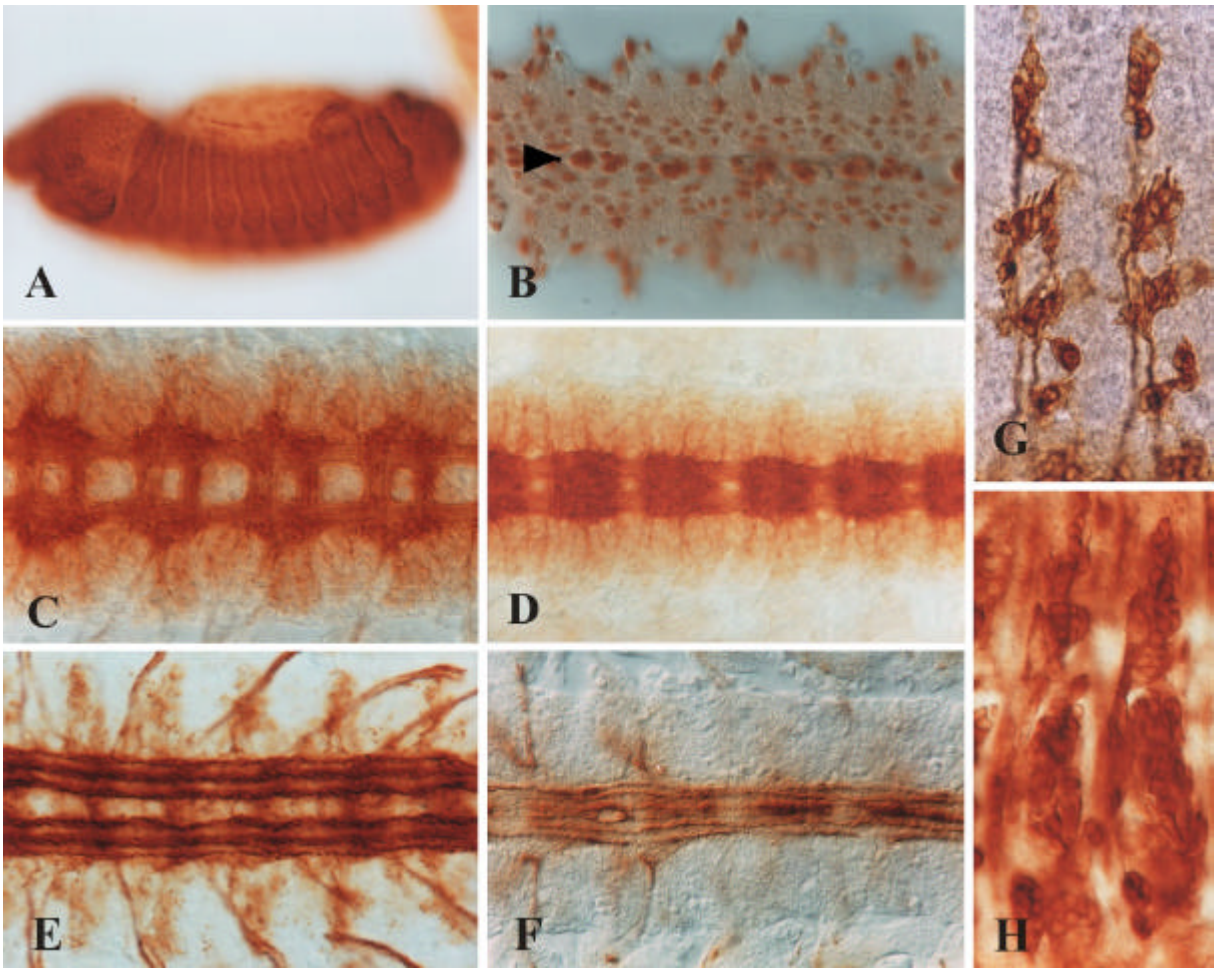


Abb. 2 Nervensystemdefekte in *ttk*^{B330}-mutanten Embryonen A) TTK-Expression im Wildtyp. B) TTKp69-Expression in den lateralen und den Mittellinien-Gliazellen (Pfeilspitze) des ZNS. C) Wildtypisches ZNS, D) *ttk*-mutantes ZNS, beide mit mAb BP102 markiert. E) mAb 1D4 markiert im wildtypischen ZNS sechs Faszikel. F) In *ttk*-mutanten Embryonen sind die Faszikel unterbrochen, das ZNS schmaler. G) Wildtypisches PNS, mit mAb 22C10 dargestellt. H) Der Ausfall von *ttk* führt zu neuronaler Hyperplasie im PNS und zu ektopischer Expression von 22C10 in Muskeln.

Anzahl reduziert, unterbrochen und kreuzen sogar die Mittellinie (Abb. 2E, F).

Es gibt deutlich weniger Mittelliniengliazellen als im Wildtyp (0-2 Zellen pro Segment im Gegensatz zu 3-4 im Wildtyp), die Zahl der lateralen Gliazellen ist um etwa 20% reduziert und ihre regelmäßige Anordnung gestört (Abb. 3C-F, Giesen *et al*., 1997).

Im PNS kommt es zu einer Hyperplasie der Neurone auf Kosten der übrigen Zellen innerhalb der externen Sinnes- und Chordotonalorgane, es findet eine Transformation der Unterstützungszellen zu Neuronen innerhalb eines Zellstammbaumes statt (Abb. 2H, Gho *et al.*, 1999; Reddy und Rodrigues, 1999b; Guo *et al*., 1995). Um zu überprüfen, ob es auch im ZNS zu Abweichungen in der Zahl der Neurone kommt, wurden durch Verwendung spezifischer Marker Neurone im ZNS markiert. Die *Enhancer trap*-Linie *X55* markiert im

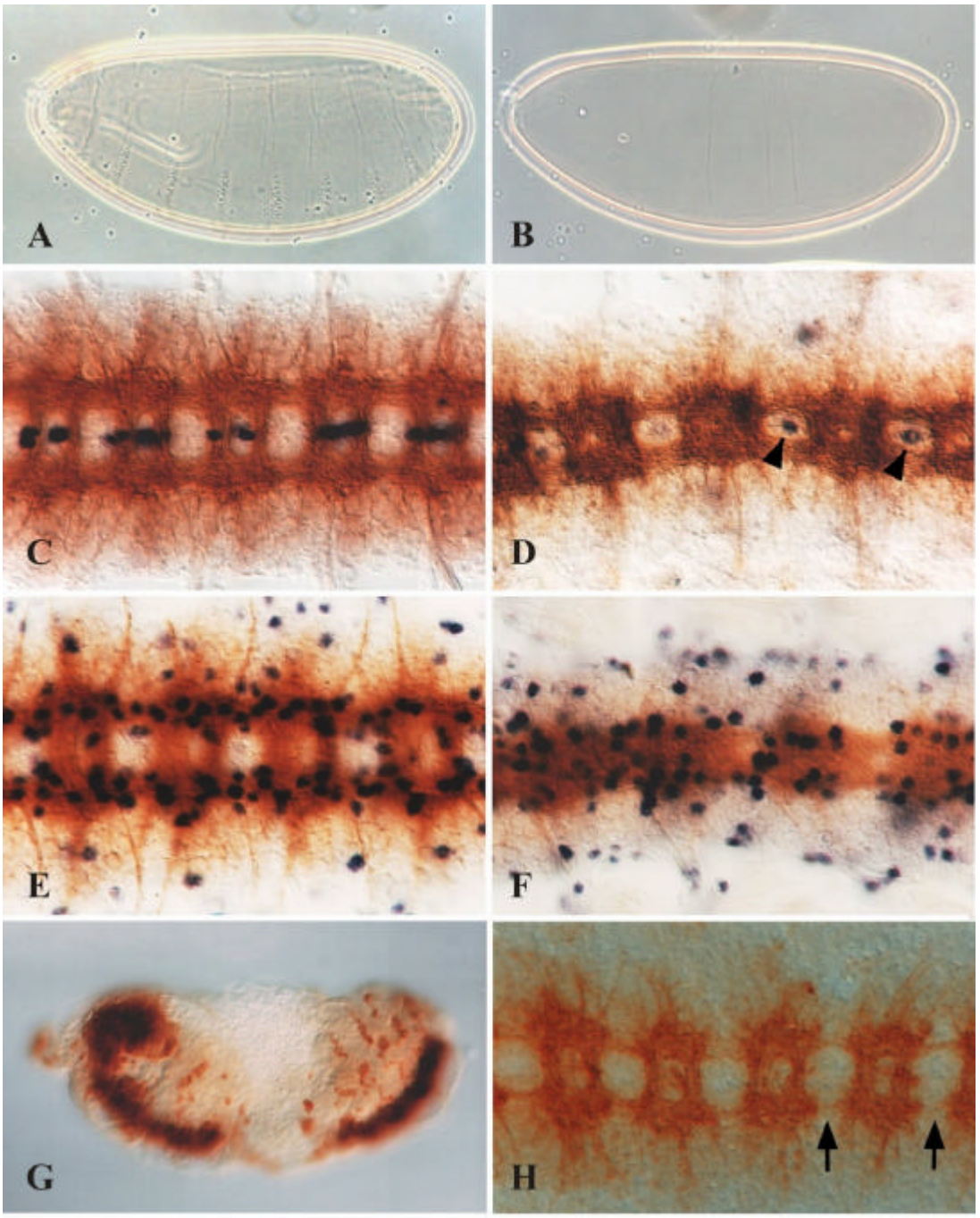


Abb. 3 A) Kutikula eines Wildtyp-Embryos. B) Bei *ttk*^{B330}-mutanten Embryonen findet keine Differenzierung der Kutikula mehr statt, auch die Mundhaken fehlen. C) Mittelliniengliazellen (MLG, blau) im Wildtyp, mit der *Enhancer trap*-Linie *AA142* markiert. D) In *ttk*^{B330}-mutanten Embryonen entwickeln sich nur wenige MLG (Pfeilspitzen). E) Die *Enhancer trap*-Linie *rA87* markiert die lateralen Gliazellen. F) Der Verlust von *ttk* führt zu einer Reduktion der Anzahl der lateralen Gliazellen.

G) Überexpression von TTKp69 in der *Krüppel*-Expressionsdomäne; in den Segmenten T2-A4 findet keine neuronale Entwicklung statt. H) *sim*-Gal4; UAS-*ttkp69*, Expression von TTKp69 in den Mittellinienneuronen führt zu Defekten in den Konnektiven (Pfeile).

Wildtyp 12 Mittellinienneurone. Der Vergleich von *ttk*-mutanten Embryonen zum Wildtyp zeigt keinen Unterschied in der Anzahl, lediglich die Anordnung der Zellen weicht ab (Abb. 17A, J). Auch die Untersuchung einiger ZNS-Neurone mit Hilfe eines Antikörpers gegen EVEN SKIPPED zeigt keinen Unterschied zum Wildtyp. Anders als im PNS scheint die Anzahl der Neurone im ZNS nicht verändert zu sein.

Auffällig ist bei *ttk*-mutanten Embryonen die Deregulation der Expression des neuronalen Antigens 22C10. Es wird zusätzlich in ekto- und mesodermalen Geweben wie Muskeln, dem Hinterdarm und der Amnioserosa exprimiert (Abb. 2H).

Der Ausfall von *ttkp69* führt zu einem sehr charakteristischen Kutikulaphänotyp. Es findet keine Differenzierung der Kutikula statt, Sinnesorgane wie *Keilin´s Organ* entwickeln sich nicht, und in amorphen Allelen sind die Mundhaken nicht mehr vorhanden (Abb. 3B). Vergleichbare Phänotypen sind auch für andere Gene beschrieben worden (Jürgens *et al.*, 1984, s.u.).

3.1.3 Auswirkungen der Überexpression von *tramtrack* auf das Nervensystem

Um die Auswirkungen der Überexpression von *ttk* auf das embryonale Nervensystem untersuchen zu können, wurden UAS*ttkp69*- undUAS*ttkp88*-Konstrukte hergestellt.

Die Überexpression von TTKp88 mit Hilfe verschiedener Gal4-Aktivatorlinine (*rho*-, *sim*-, *sca*-Gal4) zeigt im ZNS keine Effekte, im PNS fehlen vereinzelt Neurone der Chordotonalorgane (Daten nicht gezeigt). Überexpression von TTKp69 hat drastische Effekte auf das Nervensystem. Im Bereich der Expressionsdomäne der jeweiligen Gal4-Aktivatorlinien gibt es keine Expression neuronaler Marker (Abb. 3G), was bedeutet, daß neuronale Entwicklung zellautonom dort unterdrückt wird, wo *tramtrack* exprimiert ist. Die Expression von TTKp69 in der Mittellinie mit Hilfe einer *sim*-Gal4-Linie hat zur Folge, daß sich die Konnektive nicht mehr entwickeln (Abb. 3H). Ursache ist wahrscheinlich die unterdrückte Differenzierung der Mittellinienneurone, die Mittelliniengliazellen entwickeln sich offensichtlich normal (Daten nicht gezeigt).

Durch Verwendung eines anti-SNAIL-Antikörpers konnte gezeigt werden, daß bei der Überexpression von TTKp69 die Neuroblasten normal angelegt werden. Folglich unterdrückt die Überexpression lediglich die neuronale Differenzierung. Die Expression glialer Marker (REPO, *rI50*, Abb. 4D) ist von der TTKp69-Expression nicht betroffen. Die gliale Entwicklung scheint normal zu verlaufen.

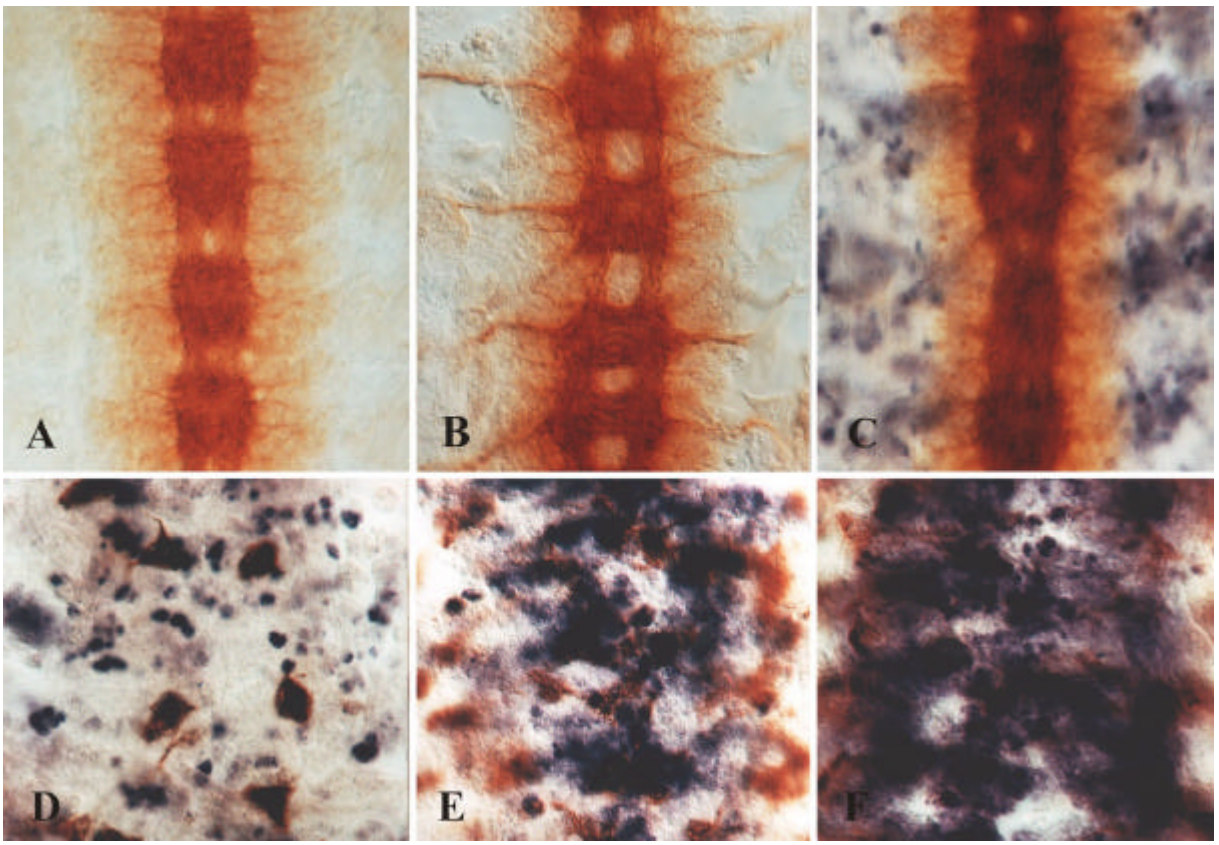


Abb. 4 Interaktion von *tramtrack* und *pointed* A) ZNS eines ttk^{B330}-mutanten Embryos. B) Das Allel pnt^{D88} zeigt einen „fusionierten Kommissuren"-Phänotyp. C) Doppelmutantes pnt^{D88}, ttk^{B330}-ZNS. Überexpression von TTK und PNT mit Hilfe eine *sca*-Gal4-Linie; das Nervensystem ist mit mAb 22C10, die Gliazellen mit der *Enhancer trap*-Linie *rI50* (blau) markiert D) Überexpression von TTKp69 unterdrückt neuronale, aber nicht gliale Differenzierung. E) Ektopische Expression von PNTP1 führt zur Entstehung ektopischer Gliazellen. F) Koexpression von UAS*ttkp69* und UAS*pntP1*.

3.1.4 Interaktion von *tramtrack* und *pointed*

Bei *tramtrackp69* handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der in allen Gliazellen exprimiert wird. Der Ausfall bedingt einen ZNS-Phänotyp, der zeigt, daß *tramtrack* für die korrekte Entwicklung der Gliazellen notwendig ist.

Das Gen *pointed (pnt)* kodiert zwei Transkripte, pntP1 und pntP2. Sie sind in den verschiedenen Untergruppen der ZNS-Gliazellen exprimiert und für deren Entwicklung notwendig (Klämbt, 1993). Der Ausfall von *pnt* führt ebenfalls zu einem „fusionierten Kommissuren"-Phänotyp, ähnlich dem von *tramtrack* (Abb. 4B), und die Konnektive sind verdünnt. Da beide Gene für die Gliazellentwicklung wichtig sind, wurde ihre Interaktion untersucht. Dazu wurde eine $pointed^{D88}$, $tramtrack^{B330}$-Doppelmutante hergestellt. Sie zeigt im ZNS einen intermediären Phänotyp, der Eigenschaften beider Ausfallmutanten aufweist (Abb. 4C). Dies spricht dafür, daß beide Gene unabhängig voneinander wirken. Da der

Ausfall des einen Gens die Expression des anderen nicht beeinflußt (Daten nicht gezeigt), regulieren sie sich nicht gegenseitig.

Zur weiteren Analyse wurden beide Proteine überexprimiert. Unter Verwendung einer *scabrous*-Gal4-Linie wurden jeweils TTKp69, PNTP1 sowie beide Proteine gleichzeitig exprimiert. Die *Enhancer trap*-Linie *rI50* diente der Markierung der glialen Zellen.

Überexpression von TTKp69 führt zu einer weitgehenden Blockierung neuronaler Entwicklung (Abb. 3G, 4D). Die gliale Entwicklung scheint nicht betroffen zu sein (s.o.). Wird PNTP1 überexprimiert, kommt es zu ektopischer Expression des glialen Markers *rI50* in zahlreichen Zellen (Abb. 4E). Diese sind in der Lage, in ihren Nachbarzellen die Expression von 22C10 zu induzieren. Dies bedeutet, daß es sich hinsichtlich bestimmter Aspekte um funktionelle Gliazellen handelt (Klaes *et al.*, 1994).

Die gleichzeitige Überexpression von TTKp69 und PNTP1 führt ebenfalls dazu, daß zusätzliche Zellen den Marker *rI50* exprimieren. Allerdings wird die Expression von 22C10 im zentralen Bereich des ZNS weitgehend unterdrückt, während es im peripheren Bereich zu verstärkter Expression kommt (Abb. 4F). Auch hier zeigt sich ein intermediärer Phänotyp.

Diese Ergebnisse zeigen, daß *pointed* und *tramtrack* parallel und unabhängig voneinander wirken.

3.1.5 Die Wirkung von *tramtrack* im Auge

Das Komplexauge von *Drosophila* besteht aus etwa 800 Ommatidien. Jedes Ommatidium setzt sich aus 20 Zellen zusammen: 8 Photorezeptorzellen (R1-8), vier Linsen- oder Semperzellen sowie 8 Pigmentzellen. Zuerst entwickelt sich die R8-Zelle, die dann für die Rekrutierung der übrigen Zellen des Ommatidiums verantwortlich ist. Störungen in Anzahl oder Organisation dieser Zellen führt zu einem „rauhe Augen“-Phänotyp.

tramtrack spielt bei der Augenentwicklung eine wichtige Rolle. Der Ausfall des *ttkp88*-Transkriptes führt zu zusätzlichen R7-Photorezeptorzellen und weniger R1-R6-Photorezeptoren (Xiong und Montell, 1993). Die zusätzlichen R7-Zellen stammen aus der R7-Äquivalenzgruppe (Yamamoto *et al.*, 1996). TTKp88 fungiert als Repressor des R7-Schicksals und ist daran beteiligt, daß nur eine R7-Zelle entsteht.

Der Ausfall von *ttkp69* führt zu einer Transformation ommatidialer in nicht-ommatidiale Zellen. Im Auge scheint *ttkp69* der Repression von Genen zu dienen, deren Expression inkompatibel mit dem ommatidialem Schicksal ist (Xiong und Montell, 1993; Lai *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1997; Lai *et al.*, 1997).

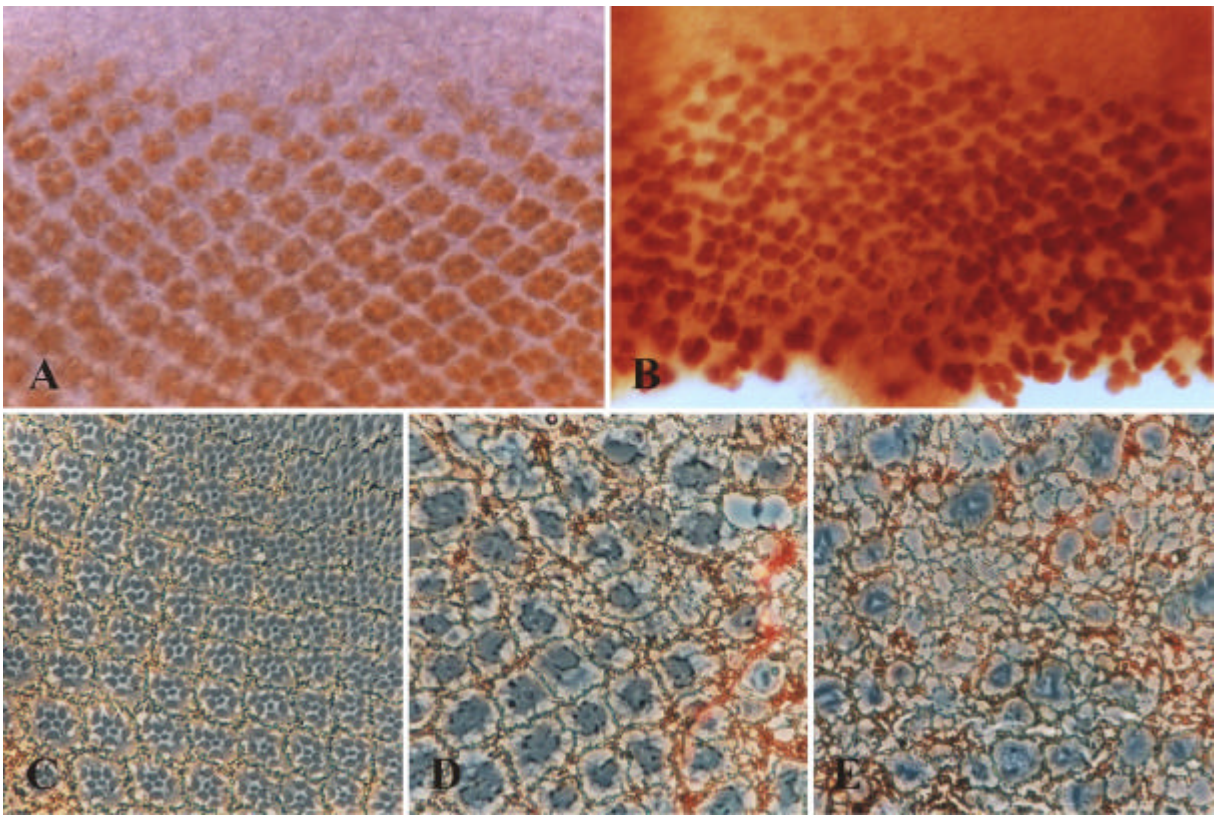


Abb. 5 Ektopische Expression von TTK im Auge mit einer *sev*-Gal4-Aktivatorlinie
A,B) Augenimaginalscheiben, differenzierte Neurone sind mit mAb 44C11 (anti-ELAV) dargestellt. A) Wildtyp, B) Expression von TTKp69 unterdrückt die neuronale Entwicklung. C-E) Semidünnschnitte von Komplexaugen. C) Wildtyp. D) Überexpression von TTKp88 führt zu einer Reduktion der Anzahl von Photorezeptoren. D) TTKp69 verhindert weitgehend die Entwicklung von Photorezeptoren.

Die ektopische Expression von TTKp69 im Auge mittels einer *sevenless*-Gal4-Aktivatorlinie führt zu Störungen in seiner Organisation, die vergleichbar mit denen der Verlustmutante sind. Es ist kleiner als das wildtypische Auge und zeigt eine Vielzahl schwarzer Areale, die von der Größe einzelner Ommatidien bis hin zu etwa 10 % der Fläche des Auges reichen (Abb. 26B). Der Rest des Auges zeigt einen sehr starken „rauhe Augen“-Phänotyp.
Zur detaillierteren Untersuchung wurden Semidünnschnitte dieser Augen angefertigt. Der Großteil des Auges besteht aus nicht-ommatidialen Zellen, wobei es sich wahrscheinlich um Pigmentzellen handelt (Abb. 5E). Es gibt kein Ommatidium, das sich normal entwickelt. Die noch vorhandenen Ommatidien besitzen eine deutlich reduzierte Anzahl an Photorezeptorzellen (meist 2-3).
Die Differenzierung der Photorezeptorzellen in der Augenimaginalscheibe verläuft anfangs normal. Die ersten drei Photorezeptoren (R8, R2 und R5) differenzieren, wie mit einer Antikörperfärbung gegen den neuronalen Marker ELAV gezeigt wurde. Danach entwickeln

sich aber keine weiteren Photorezeptoren, und die Organisation innerhalb der Scheibe ist gestört (Abb. 5B).

Die Überexpression von TTKp88 führt zu einem schwächeren Phänotyp. Die Augen erscheinen zwar rauh, jedoch es gibt keine schwarzen Areale wie bei der Überexpression von TTKp69. Die Ommatidien weisen in der Regel 3-5 Photorezeptoren auf, und die Linsenzellen sind vorhanden (Abb. 5D).

3.2 Struktur-Funktionsanalyse von TRAMTRACK

Die TRAMTRACK-Proteine p69 und p88 weisen mindestens drei funktionelle Domänen auf. Der gemeinsame N-terminale Bereich beinhaltet eine POZ- oder BTB-Domäne und eine PEST-Sequenz. Im unterschiedlichen C-terminalen Bereich weisen sie je zwei Zink-Finger als DNA-bindende Domäne auf (Harrison und Travers, 1990; Brown *et al.*, 1991; Read und Manley, 1992; Zollman *et al.*, 1994). In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der POZ-Domäne und der Zink-Finger für die Funktion von TTKp69 untersucht.

Um die einzelnen Domänen funktionell getrennt untersuchen zu können, wurden zunächst verschiedene Teilkonstrukte, die von P. Badenhorst zur Verfügung gestellt wurden, in ihrer Wirkung auf das embryonale Nervensystem untersucht. Bei diesen Konstrukten handelt es sich um verschiedene Modifikationen von *ttkp69*. *ttk130C* fehlen die ersten 130 Aminosäuren (d.h. die gesamte POZ-Domäne) des wildtypischen Proteins, *ttk130* beinhaltet nur die POZ-Domäne. Außerdem wurden drei Konstrukte mit Punktmutationen in der POZ-Domäne untersucht: *ttkm2* (Serin53→Alanin), *ttkm13* (Aspartat32→Alanin) und *ttkm19* (Aspartat32→Asparagin). Alle Konstrukte lagen im UAST-Vektor vor und wurden über das Gal4-System exprimiert.

Mit dem Konstrukt *ttk130C* läßt sich überprüfen, ob die Überexpression des Zinkfingers zum Beispiel durch Besetzung von TRAMTRACK-Bindungsstellen als Dominant-Negativ wirkt. Analog kann das Konstrukt *ttk130* wirken, indem es Interaktionspartner durch Bindung wegtitriert. Die verschiedenen Punktmutationen zeigen die Bedeutung einzelner Aminosäuren in der POZ-Domäne und damit auch ihre Empfindlichkeit auf Veränderungen.

Die einzelnen Konstrukte wurden unter Verwendung diverser Gal4-Aktivatorlinien (*rho*-, *Kr*-, *sim*-Gal4) exprimiert und die Embryonen auf Nervensystemdefekte hin untersucht. Kein Konstrukt zeigte jedoch einen Effekt im embryonalen Nervensystem.

Die Überexpression von TTKp88 im Flügel führt zu einer Reduktion der Zellen in Anzahl und Größe, die Borstenentwicklung wird unterdrückt. Die Zahl der Chordotonalorgane und campaniformen Sensillen ist verringert. Dieser Phänotyp wird bei Überexpression von

TTKp69 deutlich verstärkt. Die Überexpression der Konstrukte *ttk130C, ttkm2, ttkm13* und *ttkm19* führt ebenfalls zum Verlust von Borsten und Sensillen. Dieser Phänotyp unterscheidet sich aber von dem der Überexpression von TTKp88, da die Zellzahl und –größe nicht verändert sind. Die Konstrukte scheinen als Dominant-Negative zu wirken. Die Überexpression von *ttk130* zeigt keinen Effekt (P. Badenhorst, pers. Mitteilung).

3.2.1 Rettungsversuche mit verschiedenen *tramtrack*-Konstrukten

Die verschiedenen *ttk*-Konstrukte zeigen im Embryo im Gegensatz zum Flügel keinen Effekt auf das Nervensystem. Es wurde untersucht, ob sie die Fähigkeit besitzen, den Kutikula-Ausfallphänotyp von *tramtrack* zu retten oder zumindest abzuschwächen. Zu diesem Zweck wurden die Gal4-Aktivatorlinie 512 (*rho*-Gal4) und die verschiedenen *ttk*-Konstrukte mit dem *ttk*-Allel *B330* rekombiniert. Als Negativkontrolle diente die Kreuzung der Rekombinante 512, ttk^{B330} gegen ttk^{B330}. Diese Embryonen zeigen den typischen *ttk*-Kutikula-Phänotyp (undifferenzierte Kutikula). Die Überexpression des kompletten TTKp69-Proteins rettet den mutanten Phänotyp. Im Bereich des Expressionsmusters der *rho*-Aktivatorlinie wird das wildtypische Zähnchenmuster nahezu wiederhergestellt (Abb. 6B). Die Überexpression der verschiedenen Teilkonstrukte und der punktmutierten cDNAs ist nicht in der Lage, den mutanten Phänotyp zu retten. Hier zeigt sich kein Unterschied zum *ttk*-mutanten Embryo (Abb. 6C, D).

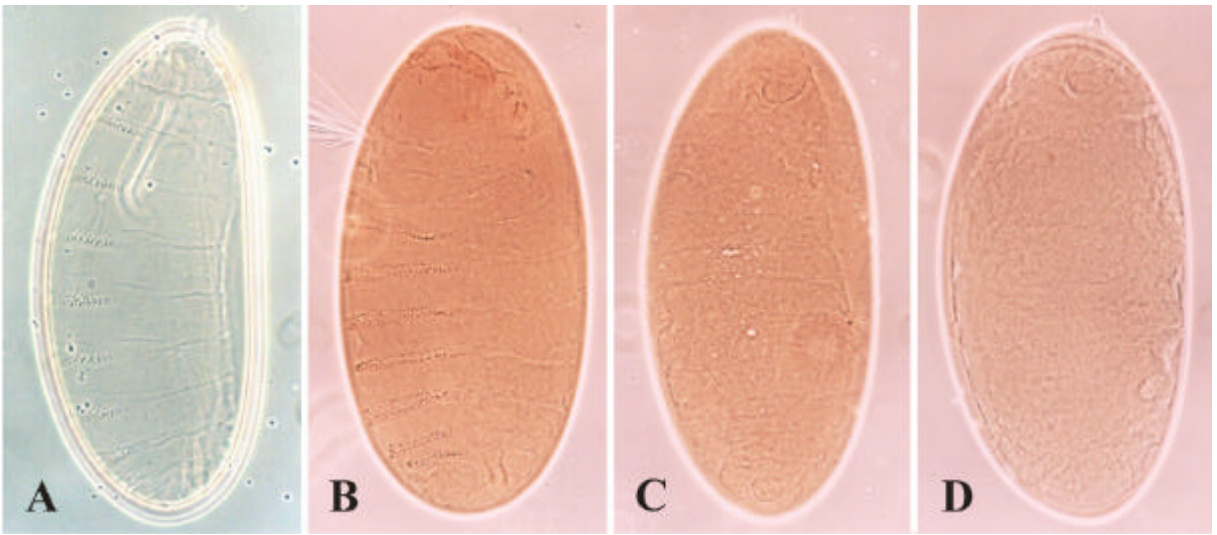


Abb. 6 Rettungsversuch des *ttk*-mutanten Phänotyps mit verschiedenen Konstrukten Kutikulapräparationen, anterior ist oben, ventral links. A) Wildtyp. B) *rho*-Gal4, ttk^{B330}/ *UASttkp69*, ttk^{b330}, im ventralen Bereich wird der mutante Phänotyp gerettet, die Zähnchenbänder entwickeln sich. C) *rho*-Gal4, ttk^{B330}/ *UASttk130C*, ttk^{b330}, D) *rho*-Gal4, ttk^{B330}/ *UASttkm19*, ttk^{b330}. Der mutante Phänotyp wird nicht gerettet.

3.2.2 Funktion der POZ-Domäne in einem chimären POZ-ETS-Protein

In der Literatur wird TRAMTRACK als transkriptioneller Repressor beschrieben. Daher ergab sich die Fragestellung, durch welche der beiden Domänen die Repression geschieht: durch die DNA-Bindung der Zink-Finger und direkte Abschaltung der Zielgene oder über die POZ-Domäne und Wechselwirkung mit anderen Proteinen.

Da die verschiedenen TTK-Proteindomänen einzeln im Embryo keine biologische Aktivität zeigen (s.o.), wurde ein chimäres Protein konstruiert, das sowohl die POZ-Domäne als auch ein DNA-bindendendes Motiv besitzt. Zu diesem Zweck wurde das DNA-bindende Motiv des *tramtrack*-Proteins, der Zink-Finger, durch die ETS-Domäne des Transkriptionsfaktors *pointed* ersetzt (siehe Material und Methoden). Das resultierende Konstrukt wurde PEP (für **P**OZ-**E**TS-**P**rotein) genannt.

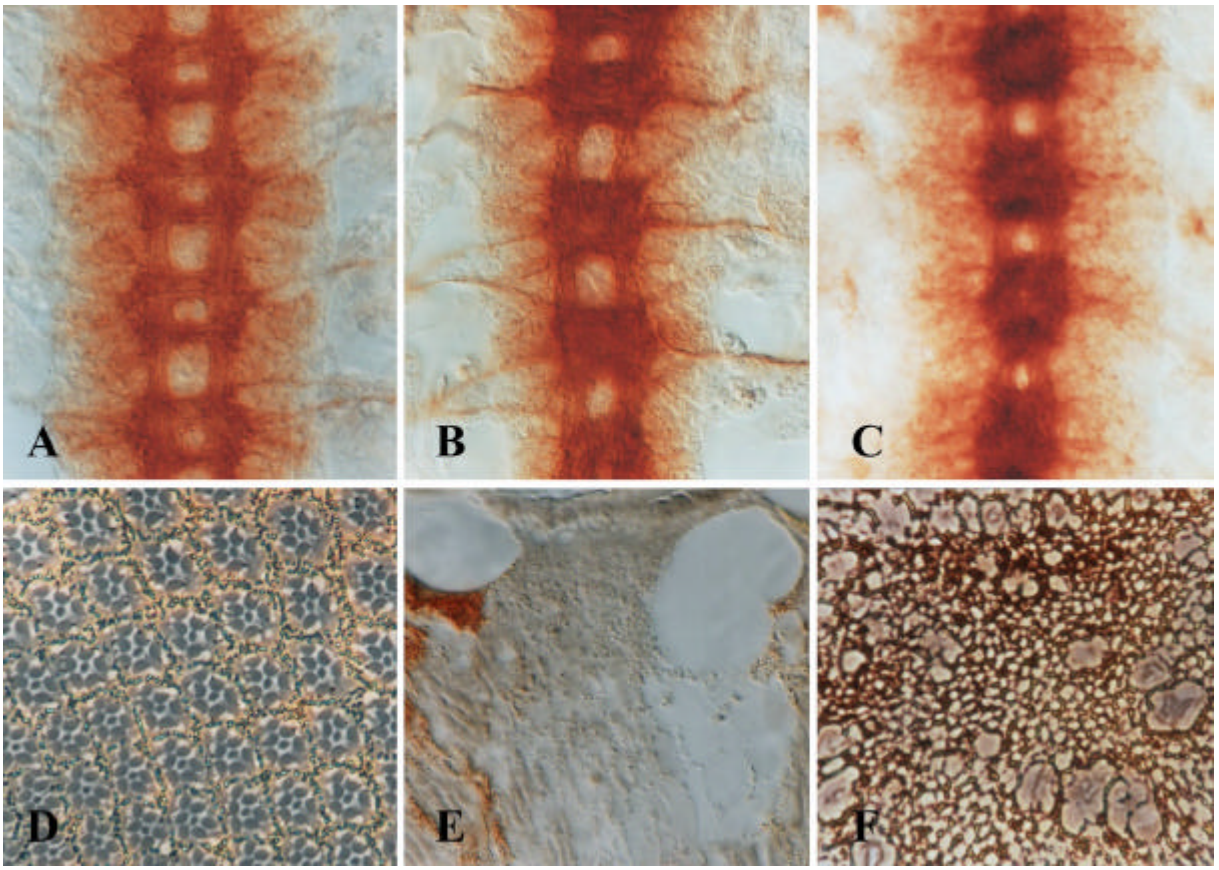


Abb. 7 Expression des PEP-Konstruktes A) wildtypisches ZNS. B) ZNS eines mutanten pnt^{D88}-Embryos. C) Expression von PEP mit einer *rho*-Gal4-Linie führt zu einer *pnt*-Phänokopie.

D) Dünnschnitt eines Wildtyp-Auges. E) Augenklon, mutant für pnt^{D88}. Es entwickeln sich keine Photorezeptoren. F) Expression von PEP mit einer *sev*-Gal4-Linie, die Entwicklung von Photorezeptoren ist unterdrückt.

Die Expression des PEP-Konstrukts im embryonalen ZNS mit Hilfe der *rho*-Gal4-Linie führt zu einen deutlichen „fusionierten Kommissuren“-Phänotyp (Abb. 7C). Der Vergleich mit der *pointed*-Mutante pnt^{D88} zeigt eine große Ähnlichkeit der Phänotypen (Abb. 7B), so daß man von einer Phänokopie sprechen kann. Dieser Effekt ist spezifisch und beruht nicht darauf, daß die ETS-Domäne des PEP-Proteins mit dem endogenen POINTED um entsprechende Bindungsstellen kompetitiert, da die Expression der ETS-Domäne allein keinen Effekt zeigt (C. Klämbt, pers. Mitteilung).

Expression von PEP im sich entwickelnden Auge mittels einer *sevenless*-Gal4-Linie zeigt drastische Effekte. Die komplette Organisation des Auges geht verloren. Es entwickeln sich praktisch keine Ommatidien mehr, statt dessen gibt es nur eine strukturlose Ansammlung von Pigmentzellen (Abb. 7F). Die wenigen Ommatidien, die sich entwickeln, zeigen eine variable Anzahl von Photorezeptorzellen. Der Vergleich mit mutanten Augenklonen des amorphen *pointed*-Allels pnt^{D88} zeigt auch hier große Ähnlichkeit (Abb. 7E). Es entwickeln sich keine Photorezeptoren. Augenklone hypomorpher *pointed*-Allele weisen weniger Photorezeptoren auf und es entstehen ebenfalls mehr nicht-ommatidiale Zellen (O´Neill *et al*., 1994; Brunner *et al*.,1994).

Die Effekte des PEP-Konstruktes zeigen, daß die POZ-Domäne für die reprimierende Wirkung verantwortlich ist, das DNA-bindende Motiv vermittelt die Spezifität.

3.3 Klonierung von *tramtrack*-Homologen

tramtrack erfüllt in *Drosophila* in der Nervensystementwicklung die wichtige Funktion, zu verhindern, daß Gliazellen für diesen Zelltyp inadäquate, neuronale Gene exprimieren.

Viele Entwicklungsprozesse verlaufen in *Drosophila* und anderen Organismen ähnlich und häufig unter Beteiligung homologer Proteine. So konnten ganze Signalkaskaden, die aus *Drosophila* bekannt waren, in Vertebraten identifiziert werden. Daher ist davon auszugehen, daß auch in anderen Organismen *tramtrack*-homologe Proteine wirken.

Es wurden bereits Proteine beschrieben, die eine ähnliche Funktion wie TRAMTRACK ausüben, z.B. lin-26 in *C. elegans* und REST/NRSF in Vertebraten. (Labouesse *et al*., 1996; Chong *et al*., 1995; Schoenherr *et al*., 1996). Allerdings weisen diese Proteine keine Sequenz-Homologie zu TRAMTRACK auf. Deshalb wurde begonnen, in anderen *Drosophila*-Arten die *tramtrack*-Homologen zu klonieren, um eine Aussage über den Grad der Konservierung machen zu können und um eine mögliche Verbindung zu einem Vertebraten-Homolog von *tramtrack* zu haben. Es wurden die Arten *D. hydei*, *D. pseudobscura* und *D. virilis* ausgewählt.

Der 3´-Bereich von *tramtrack* in *D. melanogaster*, beginnend mit der PEST-Domäne, liegt innerhalb eines Exons. Von einer ähnlichen genomischen Organisation bei den anderen *Drosophila*-Spezies ausgehend, wurde zunächst versucht, diesen Bereich mittels PCR an genomischer DNA zu amplifizieren. Dazu wurden zwei Primer in den potentiell konservierten Bereichen der PEST-Domäne und des Zink-Fingers (*ttk 302 PEST* und *ttk 501 Zn*) gewählt.
Mit diesen Primern wurde in den *Drosophila*-Arten jeweils ein Fragment von 0,6 kb amplifiziert. Die Sequenzanalyse ergab eine Identität von 72% bei *D. hydei*, 68% bei *D. pseudobscura* und 82% bei *D. virilis* auf Nukleotidebene. Auf Aminosäurebasis liegen die Identitäten bei 68%, 81% bzw. 76%, die Ähnlichkeiten, bedingt durch Substitution ähnlicher Aminosäuren, bei 76%, 87% und 82% (siehe Anhang).
Im 5´-Bereich des *tramtrack*-Gens in *D. melanogaster* liegen zwei Introns. Daher wurde der 5´-Bereich durch RT-PCR in *D. pseudobscura* und *D. virilis* amplifiziert. In *D. hydei* gelang dies nicht. Die Identität zu *D. melanogaster-ttk* beträgt auf Nukleinsäurebasis für *D. pseudobscura* und *D. virilis* 98% bzw. 97% und auf Aminosäurebasis 97% bzw. 96 %. Ein ähnlicher hoher Grad der Konservierung wurde schon für das POZ-Protein TRITHORAX-LIKE beschrieben (Lintermann *et al*.,1998).

3.4 Die *tramtrack*-Gengruppe

Die *tramtrack*-Gruppe umfaßt die Gene *disembodied (dib), phantom (phm), rippchen (rpc), shade (shd), shadow (sad), spook (spo), shroud (sro)* und *tramtrack (ttk)*. Sie wurden aufgrund ihrer ähnlichen Defekte, zu denen ihr Ausfall während der Embryonalentwicklung führt, zu einer Gruppe zusammengefaßt.

Die meisten dieser Gene wurden in der Sichtung von Nüsslein-Volhard und Wieschaus identifiziert (Wieschaus *et al*., Jürgens *et al*., 1984). Die drittchromosomalen Gene *disembodied, shade, shadow, spook* und *shroud* wurden aufgrund ihrer identischen Kutikula-Phänotypen schon dort, zusammen mit dem Gen *haunted*, zu einer Gruppe zusammengefaßt (Jürgens *et al*., 1984). Das X-chromosomale Gen *phantom* zeigt den gleichen Ausfall-phänotyp (Wieschaus *et al*., 1984). *tramtrack* als Namensgeber der Gruppe konnte in dieser Sichtung nicht aufgedeckt werden. Es wurde als erstes dieser Gene in seiner Wirkung im Nervensystem untersucht (s.o.). Im Rahmen dieser Untersuchung fiel zunächst das Gen *shroud* aufgrund seiner *ttk*-ähnlichen Defekte in der Kutikula, aber auch im Nervensystem, auf. Dies war der Anlaß, mit der weiteren Untersuchung der Gene dieser Gruppe zu beginnen.

Das drittchromosomale Gen *rippchen* (*Hummel et al*., 1999) zeigt bei Ausfall zwar einen divergierenden Kutikula-Phänotypen (Abb. 8), wurde aber aufgrund seiner ähnlichen Nervensystemdefekte mit in die Untersuchung einbezogen.

Das Gen *haunted (hau)* unterscheidet sich in Aspekten des Ausfallphänotyps (speziell im Nervensystem) von den anderen Genen der *tramtrack*-Gruppe. Es wird aber infolge der Eingruppierung zu den übrigen drittchromosomalen Mitgliedern durch den gleichen Kutikulaphänotyp (Jürgens *et al*., 1984) ebenfalls mitbehandelt.

Es gibt noch zweitchromosomale Gene, die entsprechende Kutikuladefekte zeigen, so z.B. *ghost* (undifferenzierte Kutikula) oder *faint sausage, mummy, pimples* oder *raw* (kaum differenzierte Kutikula, Nüsslein-Volhard *et al*.,1984). Diese Gene wurden aber aufgrund ihrer fehlenden oder unterschiedlichen Nervensystemdefekte nicht berücksichtigt. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich im wesentlichen auf die Untersuchung der dritt-chromosomalen Mitglieder der *tramtrack*-Gruppe.

Zunächst werden, neben einer genauen Kartierung, die Einflüsse dieser Gene auf die Entwicklung verschiedener Geweben beschrieben, bevor auf die Ergebnisse der molekularen Untersuchung eines dieser Gene, *disembodied*, eingegangen wird

3.4.1 Genetische Kartierung der Gene der *tramtrack*-Gruppe

Da die Gene der *tramtrack*-Gruppe z.T. nur grob meiotisch kartiert waren, bestand zunächst die Aufgabe einer genaueren zytologischen Kartierung. Dies geschah über Defizienzen. Ebenso wurde der meiotische Abstand zu P-Elemente bestimmt, deren genaue Kartierung bekannt ist.

disembodied

Das Gen *disembodied (dib)* wurde durch meiotische Kartierung auf 3-12 lokalisiert (Jürgens *et al*., 1984). Durch Harrisson *et al*. (1995) wurde *dib* durch Einschluß in die Defizienz *Df(3L)TE1* (64A3;B12) und Ausschluß aus der Defizienz *Df(3L)C175* (64A3;A6) (Kulkarni *et al*.,1994) auf 64A3 kartiert. Das Komplementationsverhalten bezüglich dieser Defizienzen wurde bestätigt. Die meiotische Kartierung gegen die P-Element-Insertion *A72* (64A1-3) ergab einen Abstand von 0,34 cM (±0,17 cM, 4 Rekombinanten unter 1181 ausgezählten Fliegen).

haunted

Das Gen *haunted (hau)* wurde meiotisch auf 3-48.4 kartiert (Jürgens *et al*., 1984). Dieser Bereich entspricht zytologisch etwa der Region 85B-D. Aus dieser Region wurde eine

Vielzahl überlappender Defizienzen getestet, jedoch konnte keine das Gen *haunted* aufdecken. Allerdings wird der zytologische Bereich 85C10-D12 durch keine Defizienz aufgedeckt. Der meiotische Abstand zur P-Element-Insertion *R135* (85D1-2) beträgt 0,77 cM (±0,17 cM, 20 Rekombinanten unter 2610 ausgezählten Fliegen). Durch eine letale P-Element-Insertion in *haunted* (diese Arbeit) konnte das Gen mittels *in situ*-Hybridisierung auf 85D kartiert werden.

rippchen

Das Gen *rippchen (rpc)* konnte durch Einschluß in die Defizienz *Df(3L)CAT* (75B8;F1) und Ausschluß aus der Defizienz *Df(3L)W4* (75B10;C5) in den Bereich 75B8-10 kartiert werden.

shade

Das Gen *shade (shd)* liegt meiotisch bei 3-41 und wird durch die Defizienz *Df(3L)fz-D21* (70D2;E8) aufgedeckt (Harbecke und Lengyel, 1995). Dieser Bereich konnte durch Einschluß in die Defizienz *Df(3L)fz-GS1a* (70D2;E4-5) und Ausschluß aus der Defizienz *Df(3L)fz-GF3b* (70C2;D5) weiter auf die Region 70D5-E5 eingegrenzt werden. Der meiotische Abstand zur P-Element-Insertion *K110* (70E) beträgt 0,43 cM (± 0,14 cM, 9 Rekombinanten unter 2082 ausgezählten Fliegen).

shadow

shadow (sad) kartiert durch Einschluß in die Defizienz *Df(3R)E229* (86F6;87B2) und Ausschluß aus der Defizienz *Df(3R)kar-D1* (87A7;87D1) im Intervall 86F6-87A7 (Jürgens *et al.*,1984; Tearle und Nüsslein-Volhard, 1987). Dieses Intervall konnte durch Ausschluß aus der Defizienz *Df(3R)kar-H5* (87A2;D5) auf 86F6-87A2 eingegrenzt werden. Zur meiotischen Kartierung wurde die P-Element-Insertion *S87* gewählt, bei der es sich um eine Insertion in das Gen *prospero* (86E3) handelt. Der Abstand der beiden Gene beträgt 0,1 cM (±0,08 cM, 2 Rekombinanten unter 1935 ausgezählten Fliegen).

spook

spook (spo) wurde meiotisch auf 3-19 kartiert. Durch Einschluß in die Defizienzen *Df(3L)ZN47* (64C2-10;65C1-D4), *Df(3L)vn*$^{\beta}$ (64C;F1-5) und *Df(3L)v65c* (64E;65C-D) sowie Ausschluß aus den Defizienzen *Df(3L)GN24* (63F4-7;64C13-15) und *Df(3L)vn*$^{\gamma}$ (64F) konnte der Bereich auf 64E eingegrenzt werden. Der meiotische Abstand zur P-Element-Insertion *Q114* (64C12-14) beträgt 1,24 cM (±0,29 cM, 17 Rekombinanten unter 1376 ausgezählten Fliegen).

shroud

Das Gen *shroud (sro)* wurde meiotisch auf 3-100 und zytologisch auf 100A2-B9 kartiert (99A-100A, Jürgens *et al*., 1984; linke Grenze relativ zu *anon-100Aa*, Quelle unbekannt). Diese Lokalisation konnte nicht bestätigt werden. Alle getesteten *shroud*-Allele komplementieren Defizienzen, die den angegebenen Bereich überspannen (z.B. *Df(3R)tll-g* (99F1-2;100B5), *Dp(3;1)34* (99F14;100E5-F1)). *shroud* wird durch die Defizienzen *Df(3R)L127* (99B6;F1), *Df(3R)A113* (99E5-F1;100F5) und *Df(3R)R133* (99E4;100F5) aufgedeckt, so daß es im Intervall 99E5-F1 kartiert. Dieses Intervall stimmt besser mit der meiotischen Kartierung überein als das über Defizienzen publizierte (dies entspricht meiotisch etwa 3-102). Auch zeigt die Defizienz *Df(3R)L127* im Gegensatz zu den Defizienzen der Region 100A-B typische Merkmale des *sro*-Ausfall-Phänotyps (Abb. 9A). Der meiotische Abstand zum P-Element *D30* (99F5-100A2) beträgt 1,31 cM (±0,20 cM, 45 Rekombinanten unter 3427 ausgezählten Fliegen).

Gen	zytologische Kartierung	P-Element für die meiotische Kartierung (Lokalisation)	Abstand zum P-Element (in cM)
disembodied	64A3	*A72* (64A1-3)	0,34
haunted	85D	*R135* (85D1-2)	0,77
rippchen	75B8-10		
shade	70D5-E5	*K110* (70E)	0,43
shadow	86F6-87A2	*S87* (86E3)	0,10
shroud	99E5-F1	*D30* (99F5-100A2)	1,31
spook	64E	*Q114* (64C12-14)	1,24

Tabelle 1: Zusammenfassung der Kartierung der drittchromosomalen *ttk*-Gruppengene.

3.4.2 Kutikula-Phänotypen

Die Kutikula wird von epidermalen Zellen sezerniert. Wildtypische Embryonen zeigen im Stadium 17 im ventralen Bereich der Kutikula ein charakteristisches, segmental angeordnetes Muster von Zähnchenbändern.

Der Ausfall der Gene *disembodied, shade, shadow, spook, shroud* und *tramtrack* führt zu einem identischen Kutikula-Phänotyp (Abb. 8). Es findet keine Differenzierung der Kutikula

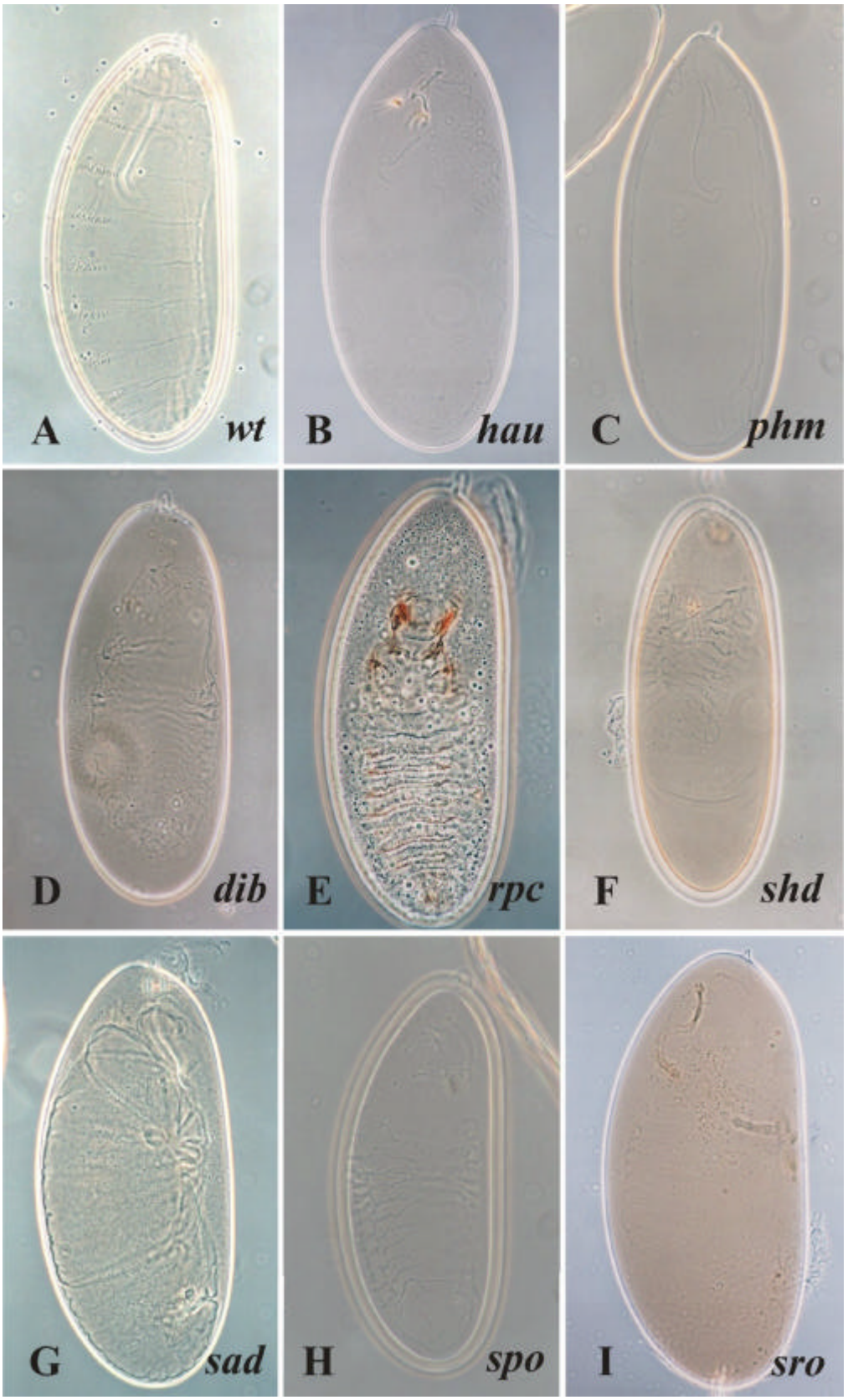


Abb. 8 Kutikula-Ausfallphänotypen der *ttk*-Gruppengene Kutikulapräparationen mutanter Embryonen der *ttk*-Gruppe, anterior ist oben, ventral links. Der Ausfall der Gene führt zu fast identischen Phänotypen, die Kutikula differenziert nicht mehr.

A) Wildtyp, B) hau^{p1}, C) phm^{EX}, D) dib^{3}, E) $rpc^{O2\text{-}54}$, es gibt noch Kutikulareste, wahrscheinlich handelt es sich um ein hypomorphes Allel (siehe Text). F) shd^{2}, G) sad^{1}, H) spo^{1}, I) sro^{1}.

statt, die Zähnchen werden nicht mehr gebildet. Es gibt zwar noch Reste einer kutikulären Hülle, die jedoch bei alten Embryonen (Stadium 17) den Kontakt zur Vitellinmembran verliert und besonders im ventralen Bereich „faltig“ aussieht. Epidermale Sinnesorgane wie *Keilin´s Organe* oder die „schwarzen Punkte“ („black dots“) werden nicht gebildet, und auch die Mundhaken sind - wenn überhaupt - nur rudimentär vorhanden.

Der Ausfall der Gene *phantom* und *haunted* führt zu einem fast identischen Phänotyp, allerdings scheinen sich die Mundhaken normal zu entwickeln.

Der Phänotyp von *rippchen* sieht etwas anders aus, da eine Differenzierung der Epidermis stattfindet und Zähnchenbänder gebildet werden (Abb. 8E). Diese liegen in den Falten der Kutikula und sind nur undeutlich zu erkennen. Folglich ist es nicht möglich, zu sagen, ob eine wildtypische Anzahl der Zähnchen erreicht wird. Auch die Mundhaken sind vorhanden, allerdings stark verkrüppelt. Der Unterschied zu Mutationen der übrigen Genen ist wahrscheinlich dadurch bedingt, daß es sich bei den beiden untersuchten *rippchen*-Allelen um hypomorphe Allele handelt. Die beiden Defizienzen *Df(3L)CAT* und *Df(3L)W10*, die den *rippchen*-Locus aufdecken, zeigen Kutikuladefekte, die denen der übrigen Genen der *tramtrack*-Gruppe ähneln (Abb. 9B).

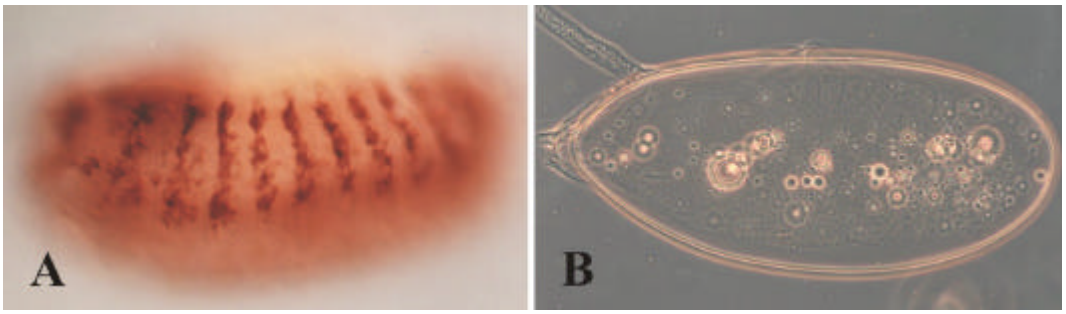


Abb. 9 Phänotypen verschiedener Defizienzen A) Die Defizienz *DF(3R)L127* zeigt einen *sro*-ähnlichen Phänotyp (das Nervensystem ist mit mAb22C10 markiert). B) Der Kutikulaphänotyp der Defizienz *Df(3L)Cat* entspricht dem der übrigen Mitglieder der *ttk*-Gengruppe.

3.4.3 Defekte in der Gesamtmorphologie

Mutationen in den Genen der *tramtrack*-Gruppe führen zu Defekten in zahlreichen Geweben. Auch die Gesamtmorphologie des Embryos ist betroffen.

Bei Ausfall der Gene *haunted* und *tramtrack* bleibt die Gesamtmorphologie des Embryos im wesentlichen erhalten (Abb. 10B, C). Bei *tramtrack*-mutanten Embryonen vollzieht sich die Kopfinvolution nicht korrekt, das Clypeolabrum bleibt bis zum Ende der Embryogenese deutlich hervorgestreckt (Abb. 10C).

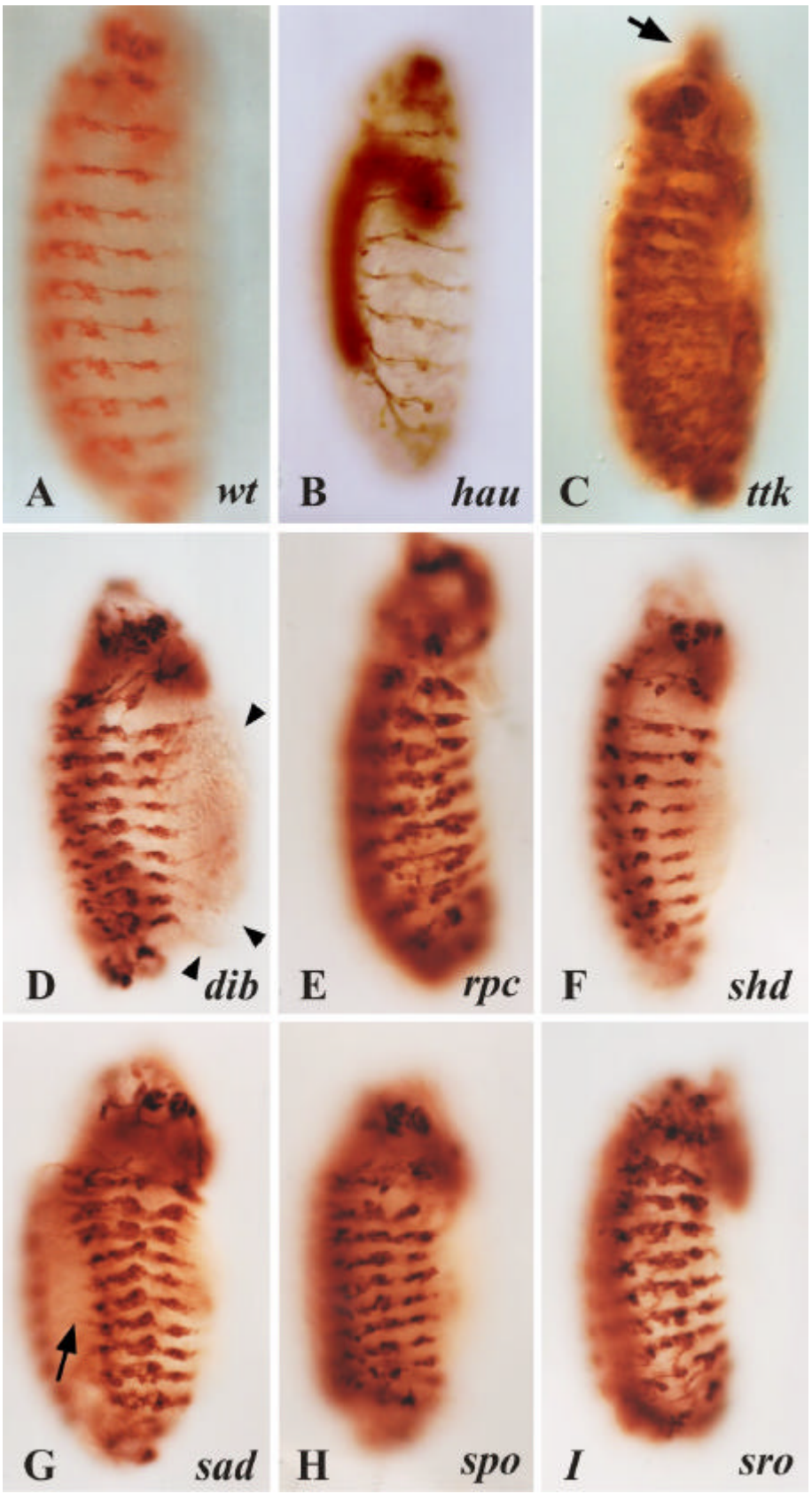


Abb. 10 Veränderung der Gesamtmorphologie I Lateralansicht mutanter Embryonen der *ttk*-Gruppe im Stadium 16/17, mit mAb 22C10 markiert (anterior ist oben, ventral links). A) Wildtyp, B) hau^{P1}, C) ttk^{B330}, das Clypeolabrum ist hervorgestreckt (Pfeil), D) dib^{1}, der Embryo ist dorsal offen, Gewebe tritt aus (Pfeilspitzen), E) $rpc^{O2\text{-}54}$, F) shd^{2}, G) sad^{1}, das ZNS ist eingefallenen (Pfeil), H) spo^{1}, I) sro^{1}.

Die Morphologie der Embryonen erscheint bei Ausfall der übrigen Gene bis zum Stadium 15 normal und der dorsale Schluß der Epidermis erfolgt. Im Stadium 16/17 kommt es jedoch zu Veränderungen, die die Gesamtmorphologie des Embryos drastisch ändern (Abb. 10). Der Embryo verkürzt sich sehr stark über die ventrale Seite in anterior-posteriorer Richtung. Im dorsalen Bereich scheint die Epidermis aufzureißen, z.T. tritt dort Gewebe aus. Dieses Phänomen kann auch in Kutikulapräparationen beobachtet werden, dort findet sich im dorsalen ebenso wie im anterioren Bereich keine Kutikula mehr (Abb. 8). Die vorhandenen Kutikulareste kommen wie „zusammengeschnurrt“ im posterior-ventralen Bereich der Vitellinmembran zu liegen. In Kutikulapräparationen und auch teils in Antikörperfärbungen sieht man Reste der Kutikula, die transversal über das ZNS hinwegführen (Abb. 11D).

Das ZNS liegt nicht mehr im ventralen Bereich des Embryos, es kommt tief im Embryo zu liegen (Abb. 8G, 11B).

Wodurch wird dieser Phänotyp verursacht? Es gibt zwei Möglichkeiten: Es kommt zu einer Hyperplasie der ventralen Epidermis. In diesem Fall würde das ZNS durch epidermales Gewebe in den Embryo hineingedrückt. Die andere Möglichkeit ist, daß die Epidermis durch die Veränderung der Gesamtmorphologie im ventralen Bereich zusammengeschoben wird und dadurch das ZNS in den Embryo hineingedrückt wird.

Unter Verwendung eines anti-TRAMTRACK-Antikörpers als epidermalem Marker ist zu erkennen, daß sich die Epidermis in Mutanten der *tramtrack*-Gruppe normal entwickelt und sie auch im ventralen Bereich vollständig vorhanden ist (Abb. 11D). Allerdings erscheint sie stark faltig.

Um den Phänotyp genauer zu untersuchen und zwischen den beiden Möglichkeiten unterscheiden zu können, wurden Semi-Dünnschnitte mutanter Embryonen angefertigt.

In großen Bereichen innerhalb eines Segmentes hat sich ein Hohlraum zwischen Epidermis und darüberliegendem Gewebe gebildet, der nicht durch zelluläres Material gefüllt ist (Abb. 11E, F). Lediglich an einer Stelle pro Segment besteht noch Kontakt zwischen Epidermis und ZNS. Dies scheint im Bereich der intersegmentalen Adopemata zu sein. Die Bereiche, die den Kontakt zu dem darunterliegenden Gewebe verloren haben, bilden die oben beschriebenen transversalen Strukturen. Folglich ist das eingesunkene ZNS nicht durch epidermale Hyperplasie bedingt, es scheint durch epidermale Faltenwerfung in das Innere des Embryos hineingedrückt zu werden.

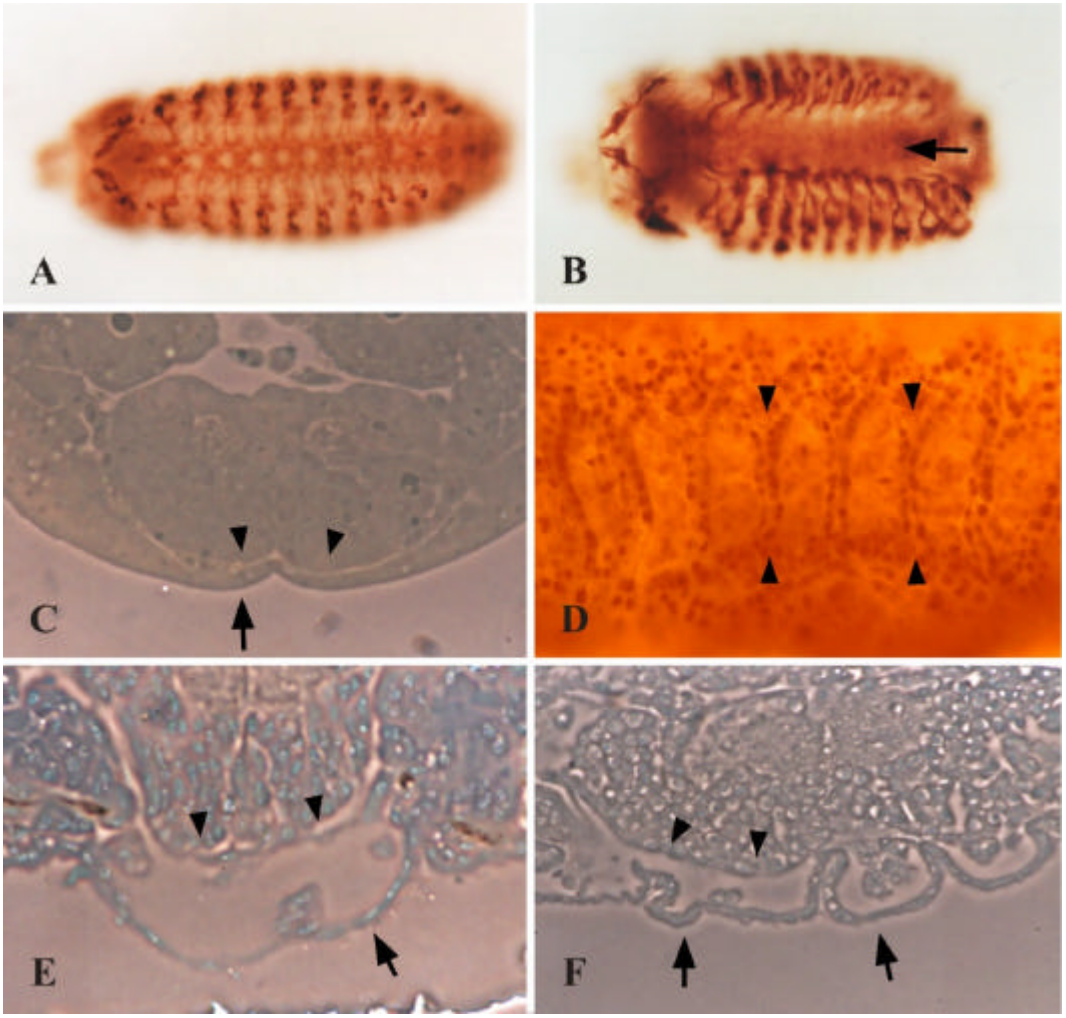


Abb. 11 Veränderung der Gesamtmorphologie II A) Wildtyp. B) *sro*-mutanter Embryo, jeweils Ventralansichten. Der Embryo ist in anterior-posteriorer Richtung verkürzt, das ZNS liegt nicht mehr ventral (Pfeil). D) Ventralansicht eines *sro*-mutanten Embryos, die Epidermis ist mit einem anti-TTK-Antikörper gefärbt. Die Epidermis ist vollständig vorhanden, man erkennt transversale epidermale Streifen (Pfeilspitzen), die über dem ZNS liegen. Die Bereiche dazwischen liegen tiefer und außerhalb der Fokusebene.
C) Transversalschnitt durch einen wildtypischen Embryo. Die Epidermis (Pfeil) hat Kontakt zum ZNS (Pfeilspitzen). E) Transversalschnitt, F) Sagittalschnitt durch einen *sro*-mutanten Embryo, Epidermis und ZNS haben den Kontakt verloren, es hat sich ein Hohlraum gebildet.

Der Verlust von *tramtrack* führt zu einem weiteren, charakteristischen Defekt, der deutlichen Deregulation des neuronalen Antigens 22C10. Dieses wird normalerweise nur in den Neuronen des PNS sowie in einigen Neuronen im ZNS exprimiert. In *tramtrack*-mutanten Embryonen findet sich zusätzliche 22C10-Expression in der somatischen Muskulatur, der Amnioserosa und dem Hinterdarm. Bei den übrigen Mitgliedern der *tramtrack*-Gengruppe gibt es keine ektopische Expression dieses Antigens.

3.4.4 Nervensystemdefekte in Mutanten der *tramtrack*-Gengruppe

Die Gene *phantom, disembodied, rippchen, shade, shadow spook* und *shroud* zeigen im Nervensystem sehr ähnliche Ausfallphänotypen. Eine letale P-Element-Insertion in *haunted* (diese Arbeit) zeigt Defekte im Nervensystem, die sich aber deutlich von denen der übrigen Mitglieder der *tramtrack*-Gruppe unterscheiden. Andere *haunted*-Allele weisen außer dem Kutikula-Phänotyp keine weiteren Defekte auf.

3.4.4.1 Die ZNS-Phänotypen

Alle Mitglieder der *tramtrack*-Gruppe führen bei Ausfall im embryonalen ZNS zu einem „fusionierten Kommissuren"-Phänotyp, der auf Defekte in den Mittelliniengliazellen hinweist (Abb. 12). Der Phänotyp der Gene *disembodied, phantom, shade, shadow, spook* und *shroud* ist sehr ähnlich. Der intrakommissurale Raum ist vollständig mit Axonen ausgefüllt, es findet keine Trennung der Kommissuren mehr statt. Weiterhin erscheinen die Konnektive dünner und bei *tramtrack*-mutanten Embryonen ist zusätzlich das gesamte ZNS schmaler als im Wildtyp (Giesen *et al.*, 1997).

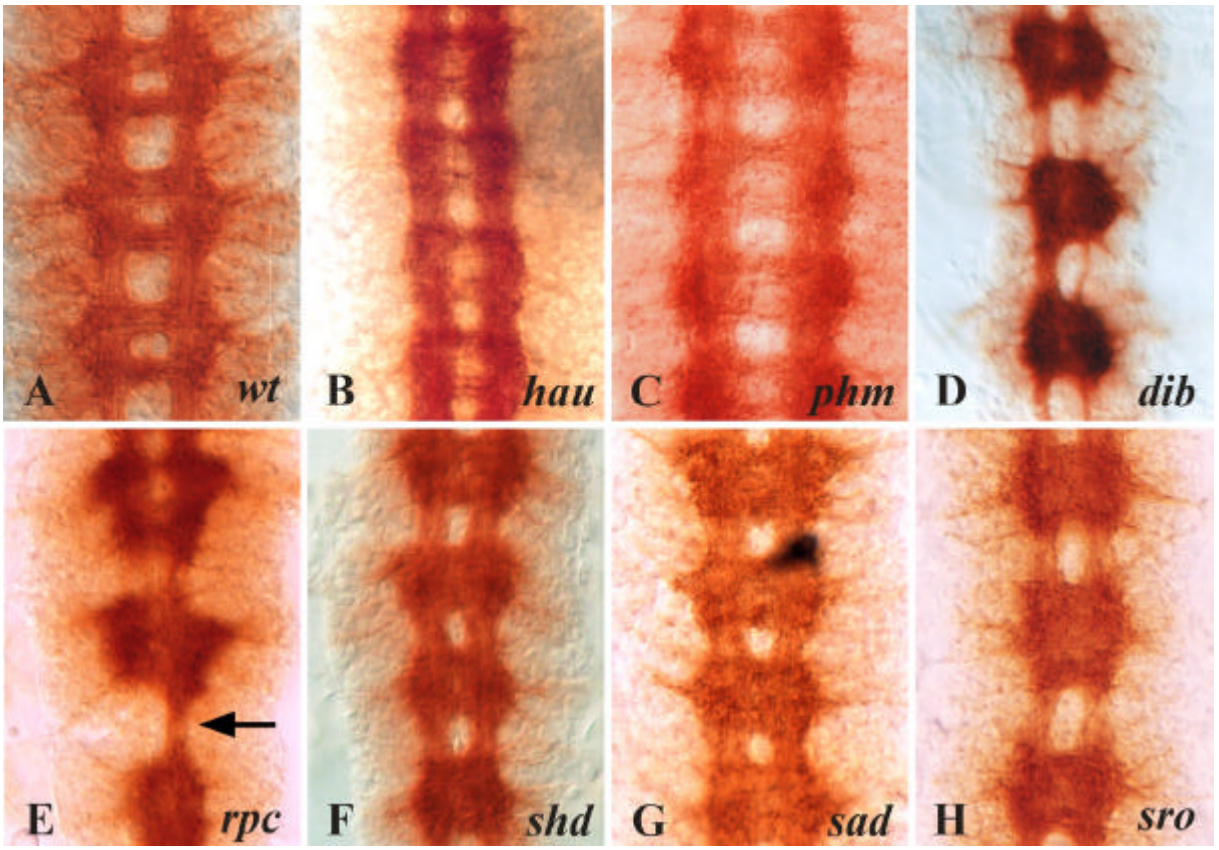


Abb. 12 ZNS-Phänotypen der *ttk*-Gruppengene Das ZNS ist mit dem mAb BP102 markiert. Mutationen in den Genen der *ttk*-Gruppe führen zu einem „fusionierten Kommissuren"-Phänotyp, die Konnektive sind verdünnt. A) Wildtyp, B) hau^{p1}, C) phm^{EX}, D) dib^{3}, die Konnektive sind stark verdünnt. E) $rpc^{O2\text{-}54}$, teilweise entwickelt sich nur ein Konnektiv (Pfeil). F) shd^{2}, G) sad^{1}, H) spo^{1}, I) sro^{1}.

Der Ausfall von *disembodied* betrifft zusätzlich die Kondensation des Bauchmarks, sie ist verzögert (Abb. 12D). *rippchen* unterscheidet sich in seinem ZNS-Phänotyp von den übrigen Mitgliedern der Gruppe (Abb. 12E). Zwar tritt auch hier der „fusionierte Kommissuren"-Phänotyp auf, jedoch ist das ZNS in einigen Segmenten deutlich schmaler als im Wildtyp. Die Konnektive sind nicht durchgängig, in einigen Segmenten wird nur ein Konnektiv gebildet.
haunted zeigt einen ZNS-Phänotyp, der sich durch schwächer-„fusionierte Kommissuren" auszeichnet (Abb. 12B). Ab Stadium 15 erscheint das ZNS sehr stark kondensiert, also deutlich früher als dies im Wildtyp der Fall ist (Abb. 10B).

Die faszikuläre Organisation der Konnektive läßt sich mit dem Antikörper 1D4 (anti-FasciclinII) darstellen. Er markiert in den Konnektiven sechs Faszikel, drei in jedem longitudinalen Trakt, die deutlich voneinander getrennt sind (Abb. 13A).
Der Ausfall von *spook* bedingt, daß die Faszikel näher an der Mittellinie liegen, so daß der Abstand der Konnektive zueinander geringer ist. Die Breite des ZNS ist aber wildtypisch, da der Abstand der einzelnen Faszikel größer als im Wildtyp ist (Abb. 13H). Auch sonst wirkt die Organisation des ZNS wildtypisch. *phantom* zeigt einen ähnlichen Phänotyp, die Konnektive erscheinen aber breiter. Der Abstand der einzelnen Faszikel ist z.T. deutlich größer als im Wildtyp (Abb. 13C).
Der Ausfall der Gene *shade*, *shadow* und *shroud* bedingt einen sehr ähnlichen Phänotyp (Abb. 13F, G, I). Die Faszikel verlaufen nicht gerade wie im Wildtyp, sondern „wellig". Im Bereich der Kommissuren kommen sie näher aneinander zu liegen, sie berühren sich sogar fast. Im interkommissuralen Bereich gehen sie wieder auf wildtypischen Abstand zur Mittellinie, wodurch die Wellenform zustande kommt. Die jeweils äußeren Faszikel sind oft unterbrochen.
In *haunted*-mutanten Embryonen ist das ZNS schmaler als im Wildtyp, im Bereich der Kommissuren berühren sich die Faszikel (Abb. 13B). Auch bei *disembodied* ist das ZNS schmaler. Die medianen Faszikel berühren sich im Bereich der Kommissuren, im interkommissuralen Bereich ist der Abstand der Faszikel von der Mittellinie größer als im Wildtyp (Abb. 13D). Die äußeren Faszikel sind unterbrochen und erscheinen oft defaszikuliert.
Der Ausfallphänotyp von *rippchen* unterscheidet sich von dem der anderen Gene. Die Konnektive haben einen größeren Abstand von der Mittellinie als im Wildtyp und die Faszikel sind deutlich unterbrochen (Abb. 13E). Im Bereich der Kommissuren kreuzen FasciclinII-positive Axone die Mittellinie.

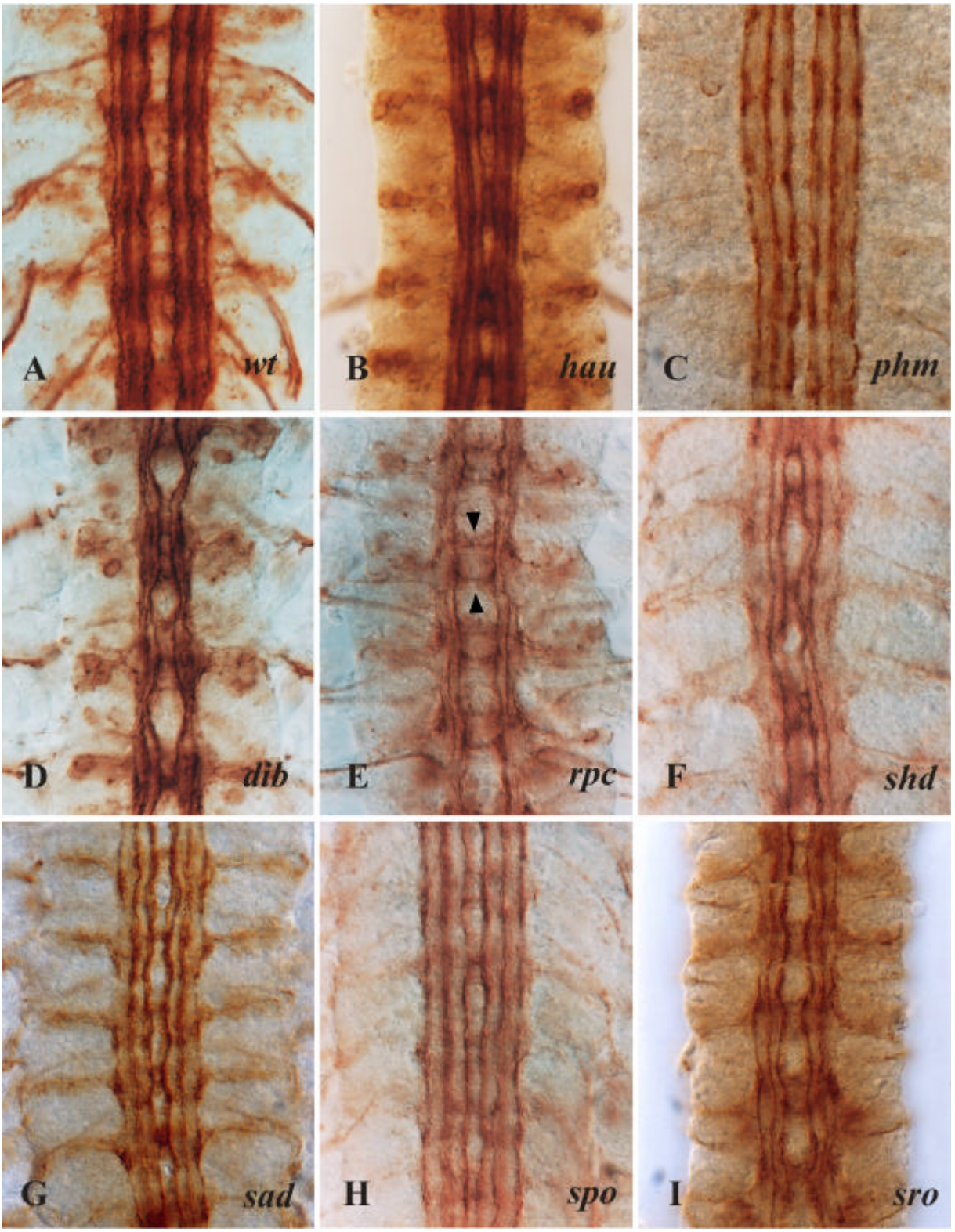


Abb. 13 Defekte in der faszikulären Struktur des ZNS Das ZNS ist jeweils mit mAb 1D4 (anti-FasciclinII) markiert (Details siehe Text). A) Wildtyp, es werden sechs voneinander getrennte Faszikel markiert. B) *hau*^{p1}, C) *phm*^{EX}, D) *dib*^{3}, E) *rpc*$^{O2\text{-}54}$, kommissurale Axone exprimieren FasciclinII (Pfeilspitzen). F) *shd*^{2}, G) *sad*^{1}, H) *spo*^{1}, I) *sro*^{1}.

3.4.4.2 Die Mittelliniengliazellen

Alle Mitglieder der *tramtrack*-Gengruppe zeigen den Phänotyp der „fusionierten Kommissuren“ (Abb. 12). Da die Mittelliniengliazellen (MLG) für die Trennung der anterioren und posterioren Kommissur verantwortlich sind, ist dieser Phänotyp immer ein Hinweis auf Defekte in diesen Zellen. Die *Enhancer trap*-Linie *AA142* markiert die Zellkerne der MLG. Die Anzahl der Mittelliniengliazellen wurde mittels konfokaler Mikroskopie bestimmt, da lichtmikroskopisch die einzelnen Zellen z.T. nicht mehr aufgelöst werden können. Im Wildtyp findet man durchschnittlich 3,6 (3-4) Mittelliniengliazellen pro Segment (Abb. 14, Zahlen in Tabelle 3). Es wurden im Durchschnitt 10 Segmente in verschiedenen Embryonen gezählt.

Mutationen in drei Genen der *tramtrack*-Gruppe führen zu einer Reduktion der Anzahl der MLG. In *tramtrack*-mutanten Embryonen werden durchschnittlich nur noch 1,8 MLG

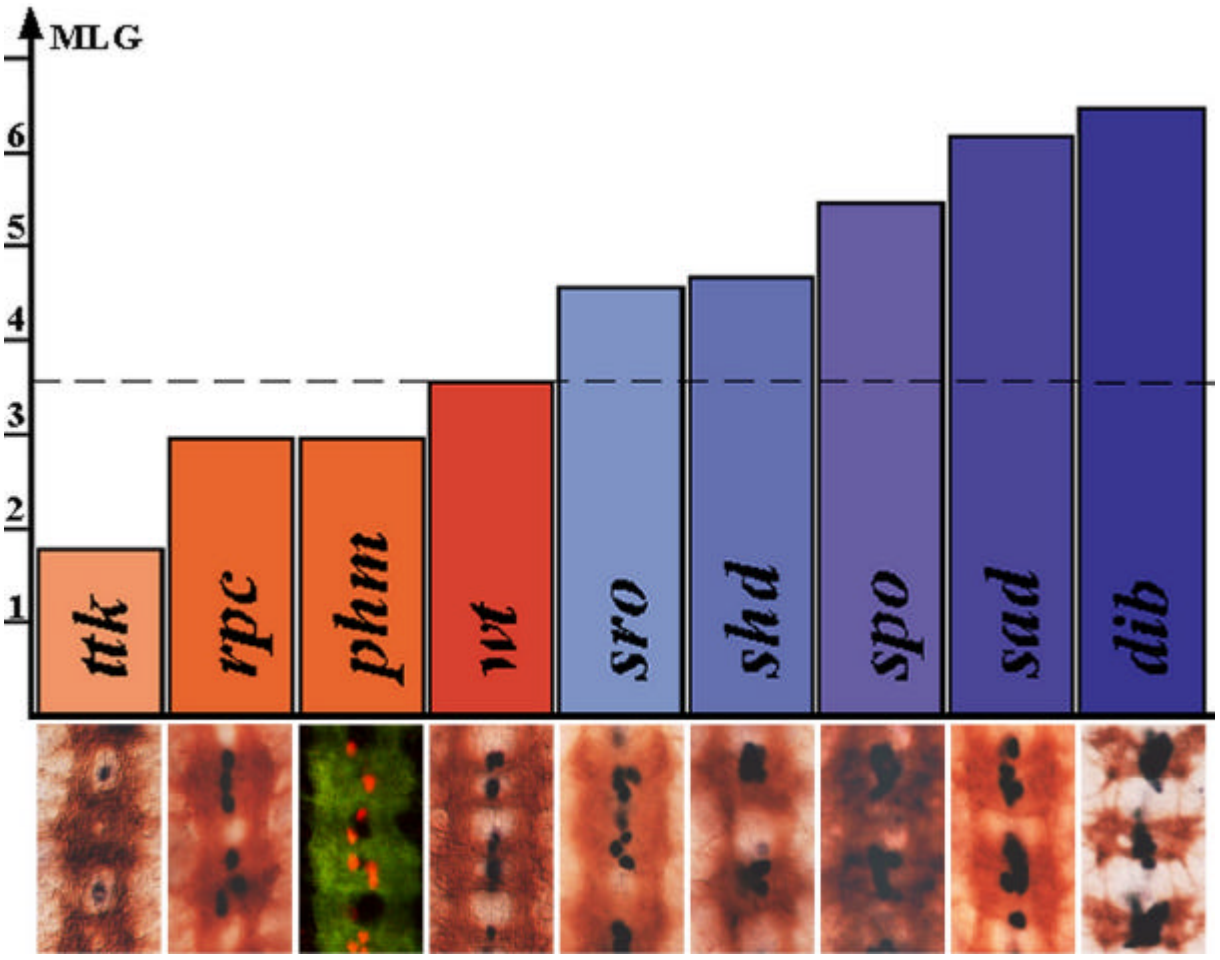


Abb. 14 Anzahl der MLG in den einzelnen Mutanten der *tramtrack*-Gruppe Die MLG wurden durch die *Enhancer trap*-Linie *AA142* markiert. Es wurden folgende Allele untersucht: ttk^{B330}, rpc^{D1-42}, phm^{EX}, sro^{1}, shd^{B1-53}, spo^{D3-110}, sad^{C3-9}, dib^{D2-65}.

pro Segment markiert (es finden sich 0-2 Zellen pro Segment), bei *phantom* und *rippchen* sind es drei MLG pro Segment, also eine im Vergleich zum Wildtyp etwas reduzierte Anzahl. Auch bei Mutationen in *haunted* ist die Anzahl leicht auf 3,2 reduziert.

Bei den übrigen Genen der *tramtrack*-Gruppe findet man mehr Mittelliniengliazellen als im Wildtyp. In mutanten Embryonen von *shade* und *shroud* gibt es 4,6 bzw. 4,7 MLG, bei *spook* 5,5 und bei *shadow* und *disembodied* sogar 6,2 bzw. 6,5 MLG pro Segment, also fast die doppelte Anzahl im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 14, Tabelle 3). Die Zahl der MLG ist bei diesen Mutanten variabel, man findet Abweichungen von bis zu zwei Zellen mehr oder weniger vom Mittelwert. Sämtliche Mittelliniengliazellen exprimieren das Gen *tramtrack*, das normalerweise in den MLG exprimiert ist (Abb. 15).

Mit Hilfe konfokaler Mikroskopie wurde die Lage der Mittelliniengliazellen im ZNS mutanter Embryonen untersucht. Die markierten Zellen liegen teils an abnormer Position. Im dorsalen Bereich des ZNS, der normalen Position der MLG, finden sich in der Regel zwei Zellen. Zwischen den Kommissuren befinden sich nur selten Gliazellen. Die Zellkerne der zusätzlichen MLG liegen oft im ventralen Bereich des ZNS, einer für MLG untypischen Position (Abb. 15, 25F).

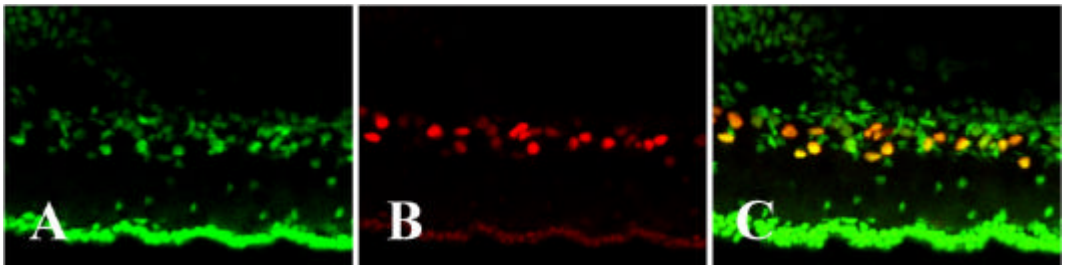


Abb. 15 ZNS eines mutanten *dib*$^{D2\text{-}65}$-Embryos, lateral A) Gliazellen, mit anti-TTKp69-Antikörper markiert, B) MLG, durch die *Enhancer trap*-Linie *AA142* markiert, C) Überlagerungsbild von A) und B), die MLG exprimieren TTKp69.

3.4.4.3 Die Mittellinienneurone

Es besteht die Möglichkeit, daß die zusätzlichen Mittelliniengliazellen (s.o.) auf Kosten der Mittellinienneurone entstehen, es also eine Transformation von einem Zelltyp in den anderen gibt. Aus diesem Grund wurde die Anzahl der Mittellinienneurone bestimmt. Als Marker diente die *Enhancer trap*-Linie *X55*. Im Wildtyp werden 12 Mittellinienneurone pro Segment markiert (Abb. 16A). Diese Anzahl wurde auch in den Mutanten der *tramtrack*-Gruppe gefunden (Abb. 16B-J), nur bei *haunted* und *shadow* wurden mit 11 bzw. 10 Zellen weniger als im Wildtyp gezählt. (Aufgrund der kompakten Anordnung ist es allerdings nicht

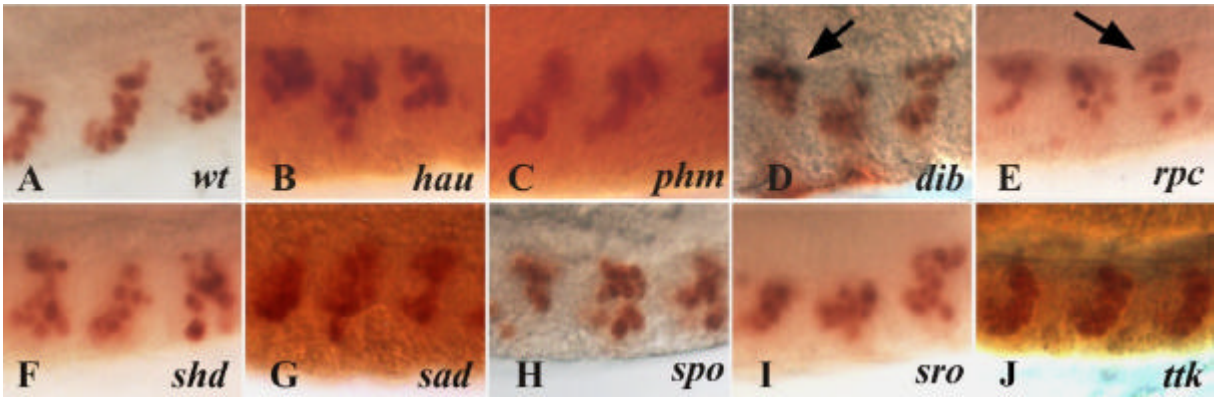


Abb. 16 Mittellinienneurone in den Mutanten der *tramtrack*-Gruppe A) Wildtyp, B) hau^{P1}, C) phm^{EX}, D) dib^{3}, E) $rpc^{O2\text{-}54}$, F) shd^{2}, G) sad^{1}, H) spo^{1}, I) sro^{1}, J) ttk^{B330}. Die Neurone liegen häufig im dorsalen Bereich des ZNS (Pfeile in D, E).

ausgeschlossen, daß doch die normale Anzahl an Mittellinienneuronen vorhanden ist, dies aber lichtmikroskopisch nicht aufgelöst werden konnte.) Die Anordung der Mittellinienneurone ist jedoch verschieden vom Wildtyp, da sie vermehrt im dorsalen Bereich des ZNS liegen. Es scheint also (evtl. mit Ausnahme von *shadow*) keine Transformation von Neuronen in Gliazellen in der Mittellinie stattzufinden. Auch bei *tramtrack*, für das im PNS eine glio-neurale Transformation beschrieben ist (Guo *et al*., 1995), findet sich die wildtypische Anzahl der Mittellinienneurone. Die Anzahl EVEN SKIPPED-positiver ZNS-Neurone ist ebenfalls unverändert (Daten nicht gezeigt).

3.4.4.4 Die lateralen Gliazellen

Um Veränderungen in Anzahl und Anordnung der lateralen Gliazellen feststellen zu können, wurden diese mittels eines anti-REPO-Antikörpers markiert und mutante Embryonen durch konfokale Mikroskopie auf Abweichungen vom Wildtyp hin untersucht. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden durchschnittlich 5 Segmente in drei verschiedenen Embryonen ausgezählt. Im Wildtyp lassen sich pro Segment durchschnittlich 43 laterale Gliazellen erkennen, von denen etwa 60% im Bereich der Konnektive und Kommissuren liegen. Sie haben eine sehr regelmäßige Anordnung (Abb. 17A).

wt	*dib*	*hau*	*phm*	*rpc*	*shd*	*sad*	*spo*	*sro*	*ttk*
43 (100%)	34 (80%)	35 (81%)	38 (88%)	38 (88%)	36 (84%)	35 (81%)	37 (86%)	41 (95%)	34 (80%)

Tabelle 2: Anzahl der lateralen Gliazellen pro Segment in den verschiedenen Mutanten. Die erste Zeile gibt die Anzahl der Gliazellen wieder, die zweite die Reduktion in Bezug auf die wildtypische Anzahl.

Alle Gene der *tramtrack*-Gruppe führen bei Ausfall zu einer Reduktion der Anzahl der lateralen Gliazellen auf 80-88% der wildtypischen Anzahl. Lediglich der Verlust der Funktion von *shroud* scheint die Anzahl der Gliazellen nur gering zu ändern.

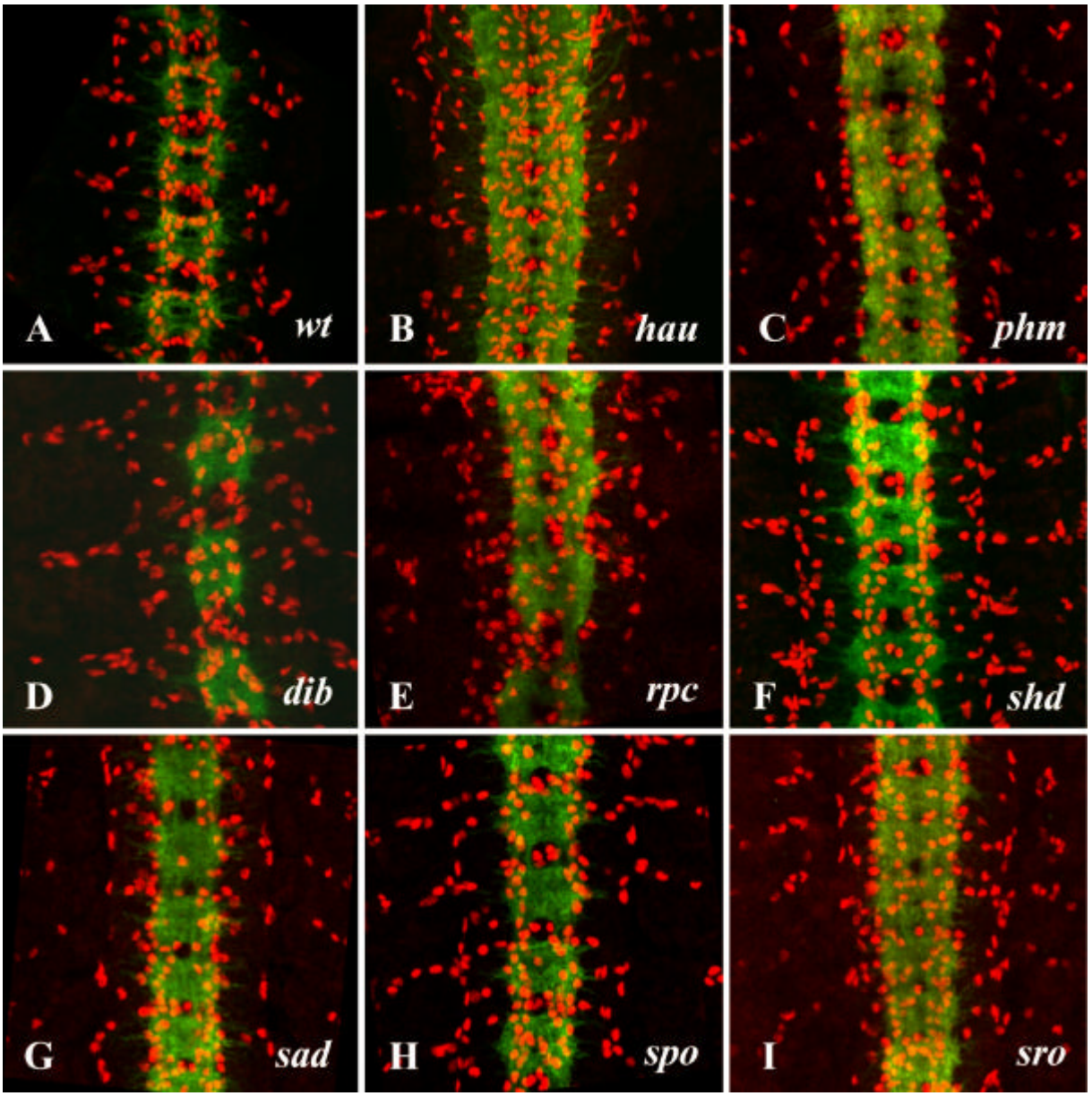


Abb. 17 Die lateralen Gliazellen in mutanten Embryonen der *ttk-Gruppe* Das Nervensystem wurde mit mAb BP102 markiert (grün), die lateralen Gliazellen (rot) mit einem anti-REPO-Antikörper. In den Mutanten der *ttk*-Gruppe kommt es zu Abweichungen in Anzahl und Anordnung der Gliazellen.
A) Wildtyp, B) hau^{p1}, C) phm^{EX}, D) dib^{3}, E) $rpc^{O2\text{-}54}$, F) shd^{2}, G) sad^{1}, H) spo^{1}, I) sro^{1}.

Oft geht die regelmäßige Anordnung der Zellen verloren (Abb. 17). Während sie in Mutanten der Gene *shade, spook* und *shroud* überwiegend normal ist, kommen die lateralen Gliazellen bei *dib*- und *ttk*-mutanten Embryonen näher an der Mittellinie zu liegen. Der Verlust von *shadow* führt dazu, daß die Gliazellen weiter lateral liegen und die Anordnung aufgelockert

ist. Im *rippchen*-mutanten ZNS ist keine regelmäßige Anordnung der lateralen Gliazellen mehr erkennbar.

3.4.4.5 Defekte und Zellzahlen im PNS

Die Anordnung der Neurone im PNS ist in mutanten Embryonen der *ttk*-Gruppe nicht mehr so klar strukturiert wie im Wildtyp (Abb. 18). Die Trennung in dorsales, laterales und ventrales Cluster ist teilweise aufgehoben. Die Neurone liegen kummuliert, die Anordnung wirkt kompakter. Dadurch scheint es, wie bei *tramtrack*, zu einer Veränderung der Zellzahl zu kommen. Die Axone erscheinen teilweise defaszikuliert.

Bei *hau*-mutanten Embryonen wirkt das PNS, als fehlten dort Neurone, die Anordnung ist aufgelockerter als im Wildtyp (Abb. 18B).

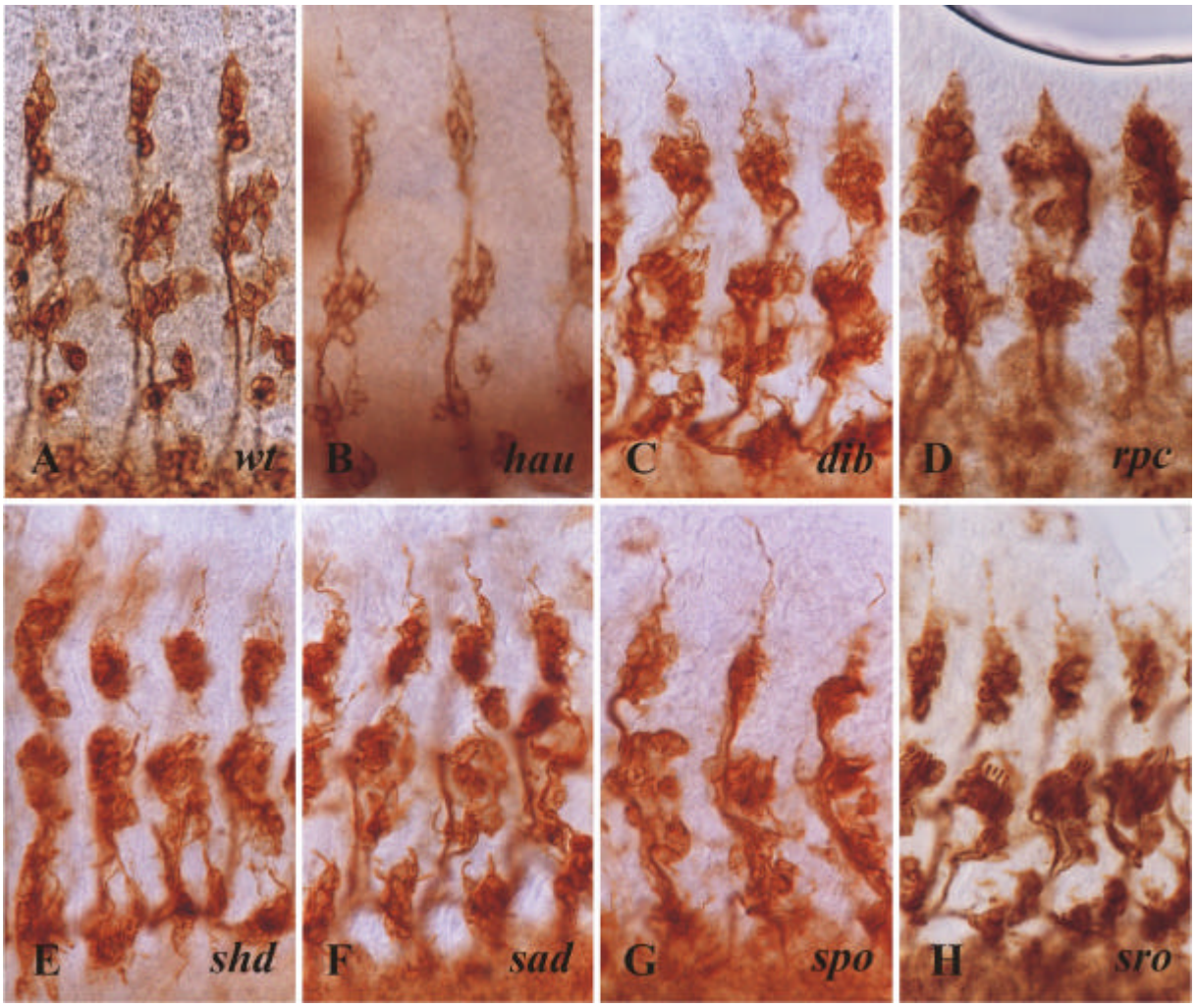


Abb. 18 PNS-Defekte in mutanten Embryonen der *ttk*-Gruppe Die PNS-Neurone wurden mit dem mAb 22C10 markiert. Es kommt zu Störungen in der Anordnung der Neurone, eine Identifizierung der einzelnen Neurone ist nicht möglich. A) Wildtyp, B) hau^{p1}, C) dib^{3}, D) $rpc^{O2\text{-}54}$, E) shd^{2}, F) sad^{1}, G) spo^{1}, H) sro^{1}.

Um zu überprüfen, ob es im PNS zu einer Veränderung der Zellzahlen kommt, wurde die genaue Anzahl neuronaler und glialer Zellen im dorsalen und lateralen Cluster bestimmt. Als Marker dienten die Antikörper 44C11 (anti-ELAV, neuronal) sowie MR1A (anti-PROS, markiert Hüll- und Skolopedialzellen) und anti-REPO als glialer Marker. Die Analyse erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie, da anders eine Auflösung der einzelnen Zellen nicht möglich ist. Ferner liegt in dieser Methode der Vorteil, Koexpressionen der Antigene nachweisen zu können.

Im Wildtyp gibt es im dorsalen und im lateralen Cluster jeweils 12 Neurone, die durch den Antikörper 44C11 erkannt werden. Der anti-REPO Antikörper markiert im dorsalen Cluster zwei und im lateralen Cluster fünf Zellen (Abb. 19A). MR1A erkennt im lateralen Cluster sechs Skolopedialzellen der Chordotonalorgane sowie drei weitere Zellen der Externen Sinnesorgane (ES). Im dorsalen Cluster werden insgesamt fünf (2+3) Zellen in den ES markiert (Abb. 20A). Oft ist in mutanten Embryonen keine Zuordnung der markierten Zellen zu bestimmten Sinnesorganen mehr möglich, da die Gesamtorganisation der Zellen im PNS gestört ist.

In *ttk*-mutanten Embryonen kommt es fast zu einer Verdopplung der Anzahl der Neurone. Es gibt je 21 Neurone im dorsalen und lateralen Cluster. *dib-*, *phm-*, *rpc-* und *spo*-mutante Embryonen weisen eine wildtypische Anzahl an Neuronen auf. Mutationen in den Genen *hau*, *shd*, *sad* und *sro* führen zum Verlust von Neuronen. Es gibt jeweils nur 11 Neurone pro Cluster, bei *sro*-mutanten Embryonen nur 10 (Abb. 19B-E, 20C-F).

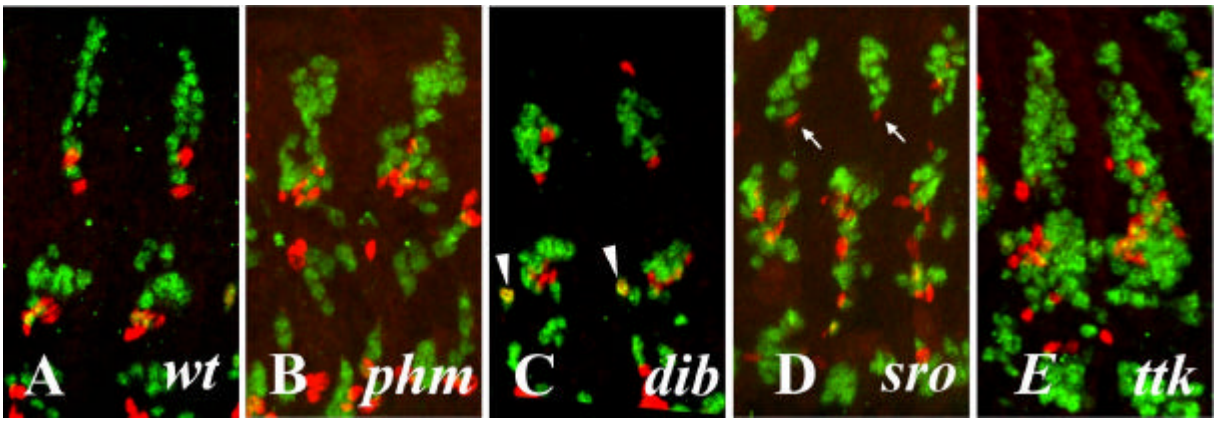


Abb. 19 Die Zellzahlen im PNS I Zur Bestimmung der genauen Zellzahlen wurden die Neurone mit mAb 44C11 (anti-ELAV, grün) und die Gliazellen mit einem anti-REPO-Antikörper (in rot) markiert. Es sind einige Phänotypen exemplarisch dargestellt (Details im Text). A) Wildtyp, es gibt sechs REPO-positive Zellen im lateralen und zwei im dorsalen Cluster. B) phm^{EX}-mutante Embryonen zeigen sieben REPO-positive Zellen im lateralen Cluster. C) In dib^{3}-mutanten Embryonen exprimiert je eine Zelle ELAV und REPO (Pfeilspitzen). D) sro^{1}-Allele zeigen nur noch eine REPO-positive Zelle im dorsalen Cluster (Pfeile). E) In *ttk*-mutanten Embryonen gibt es mehr REPO-exprimierende Zellen.

Mutationen in den Genen *dib, rpc, shd* und *spo* führen zu keiner Veränderung der Anzahl an *repo*-positiven Zellen. Auffällig ist, daß in *dib*-mutanten Embryonen eine Zelle des lateralen Clusters sowohl REPO als auch ELAV exprimiert (Abb. 19C). Bei *sad*- und *sro*-mutanten Embryonen läßt sich im dorsalen Cluster nur eine *repo*-positive Zelle erkennen (Abb. 19D), ebenso bei Embryonen, die mutant für *hau* sind. Allerdings werden hier im lateralen Cluster 6 Zellen markiert, so daß es evtl. nur zur Verschiebung dieser Zelle gekommen ist.
Der Verlust von *phm* und *ttk* führt zu mehr *repo*-exprimierenden Zellen: bei *phm* sind es 7 Zellen im lateralen Cluster (und 2 im dorsalen), bei *ttk* im dorsalen Cluster 2-3, im lateralen 7-9 (Abb. 19B, E, die Zahlen sind leicht variabel).

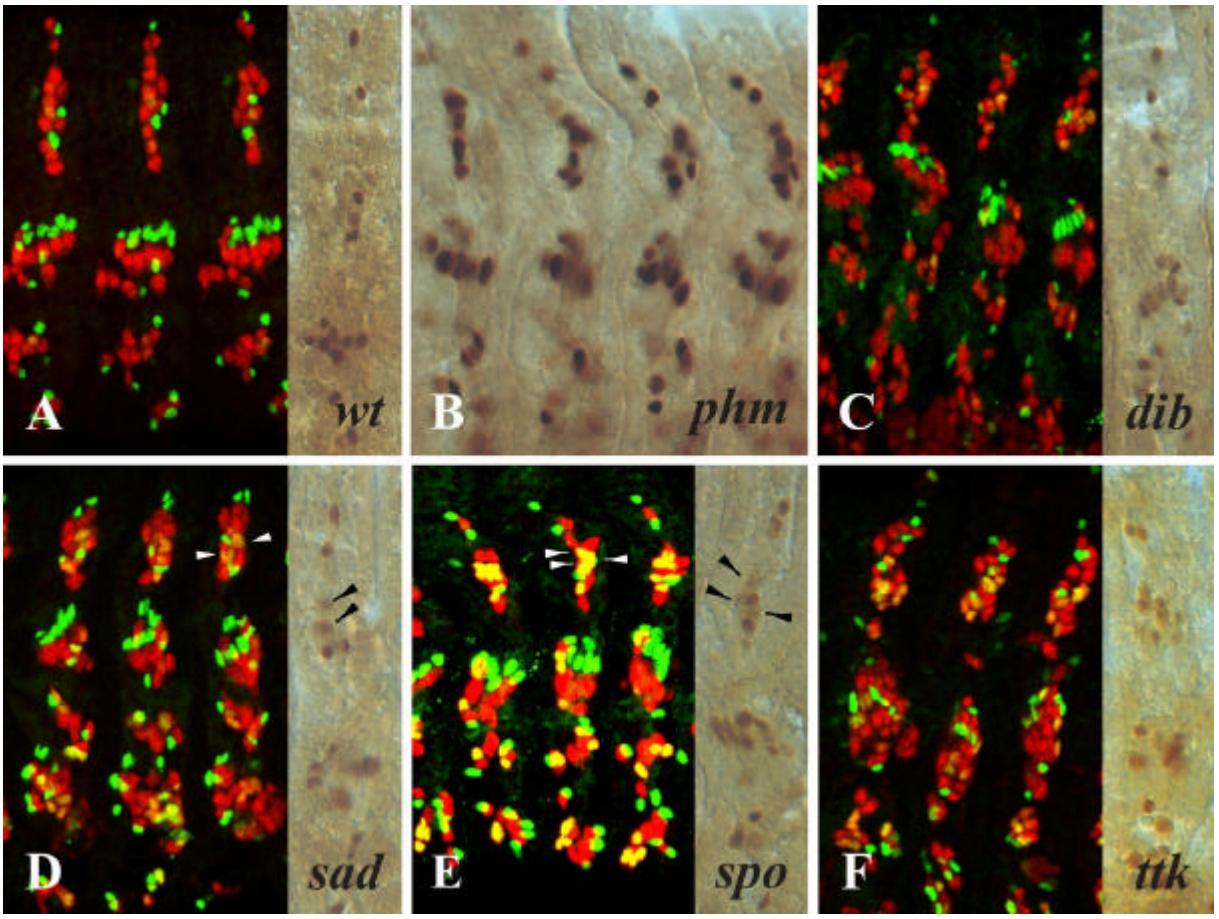


Abb. 20 Die Zellzahlen im PNS II Doppelfärbungen gegen ELAV (neuronal, rot) und PROS (grün, konfokale Bilder) bzw. Einzelfärbungen gegen PROS (jeweils rechter Bildteil). Einige mutante Phänotypen sind exemplarisch dargestellt (*phm* wurde nicht mittels konfokaler Mikroskopie untersucht). Auffällig ist, daß es im dorsalen Cluster Zellen gibt, die sowohl ELAV als auch PROS exprimieren (Pfeilspitzen, Details im Text).

Mutationen in den Genen *shd, hau, sad* und *sro* führen zu keiner Veränderung der Anzahl *pros*-exprimierender Zellen, bei *rpc*- und *spo*-mutanten Embryonen werden im lateralen Cluster noch 8, bei *dib*-mutanten Embryonen noch 6 Zellen markiert (Abb. 20). Bei Verlust

der *ttk*-Funktion gibt es im dorsalen Cluster 11-12, im lateralen 12-14 PROS-exprimierende Zellen (dies entspricht also nicht ganz einer Verdopplung der Anzahl). Bei *phm* kommt es im dorsalen Cluster zu einer Verdopplung der PROS-exprimierenden Zellen der ventralen drei ES-Organe. Es werden sechs Zellen mit dem Antikörper MR1A markiert (Abb. 20B).
Auffällig ist, daß es bei allen Mutanten im dorsalen Cluster 2-3 Zellen gibt, die neben einer starken Expression des neuronalen Markers ELAV auch noch schwache PROS-Expression aufweisen, also sowohl neuronalen als auch nicht-neuronalen Marker exprimieren.

3.4.5 Defekte im Tracheensystem

Kutikulapräparationen der Mutanten der *tramtrack*-Gruppe deuten Tracheendefekte an. Um diese Defekte näher zu untersuchen, wurden zwei Ansätze gewählt: Es wurde eine *breathless*-Gal4, UAS-tau-GFP-Linie verwendet, die die Mikrotubuli in den tracheenbildenden Zellen markiert und die Möglichkeit der Lebendbeobachtung bietet. Nach Einkreuzen dieser Linie wurden Embryonen im Stadium 16 mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Zum anderen wurden die Tracheen mit dem lumenspezifischen Antikörper 2A12 markiert.
Das Tracheensystem besteht aus dem dorsalen Stamm, der den Körper auf jeder Seite longitudinal durchzieht und in den anterioren und posterioren Spirakeln endet (Abb. 21A). Von ihm geht segmental ein dorsaler Ast und nach ventral ein transversales Konnektiv ab. Die transversalen Konnektive sind untereinander durch die lateralen longitudinalen Äste miteinander verbunden und setzen sich weiter ventral als ganglionische Äste bis in das ZNS fort. Vom dorsalen Stamm ziehen noch viszerale Äste in das Innere des Embryos.
Mutationen der *tramtrack*-Gene führen zu Defekten in der Organisation des Tracheensystems. Die einzelnen Äste verlaufen nicht mehr gerade wie im Wildtyp, sondern bilden verschiedene Windungen und Bögen aus, bis sie schließlich meist ihr ursprüngliches Zielgewebe erreichen. Das Gesamtsystem wirkt desorganisiert und zerfasert, da die Mikrotubuli der tracheenbildenden Zellen nicht mehr parallel, sondern zum Teil senkrecht zur Tracheenoberfläche verlaufen.
sad-mutante Embryonen weisen keine offensichtlichen Tracheendefekte auf (Abb. 21F). Mutationen in *spo* führt dazu, daß sich die posterioren Spirakel nicht ausbilden und die dorsalen Äste fehlen (Abb. 21G). In mutanten *dib*- und *shd*-Embryonen ist der dorsale Stamm unterbrochen und die Fusion der longitudinalen Äste mit den Konnektiven findet nicht statt (Abb. 21C,E), was auch in *sro*-mutanten Embryonen beobachtet wird (Abb. 21H). Bei *dib*-mutanten Embryonen fehlen die kleineren Tracheenäste.

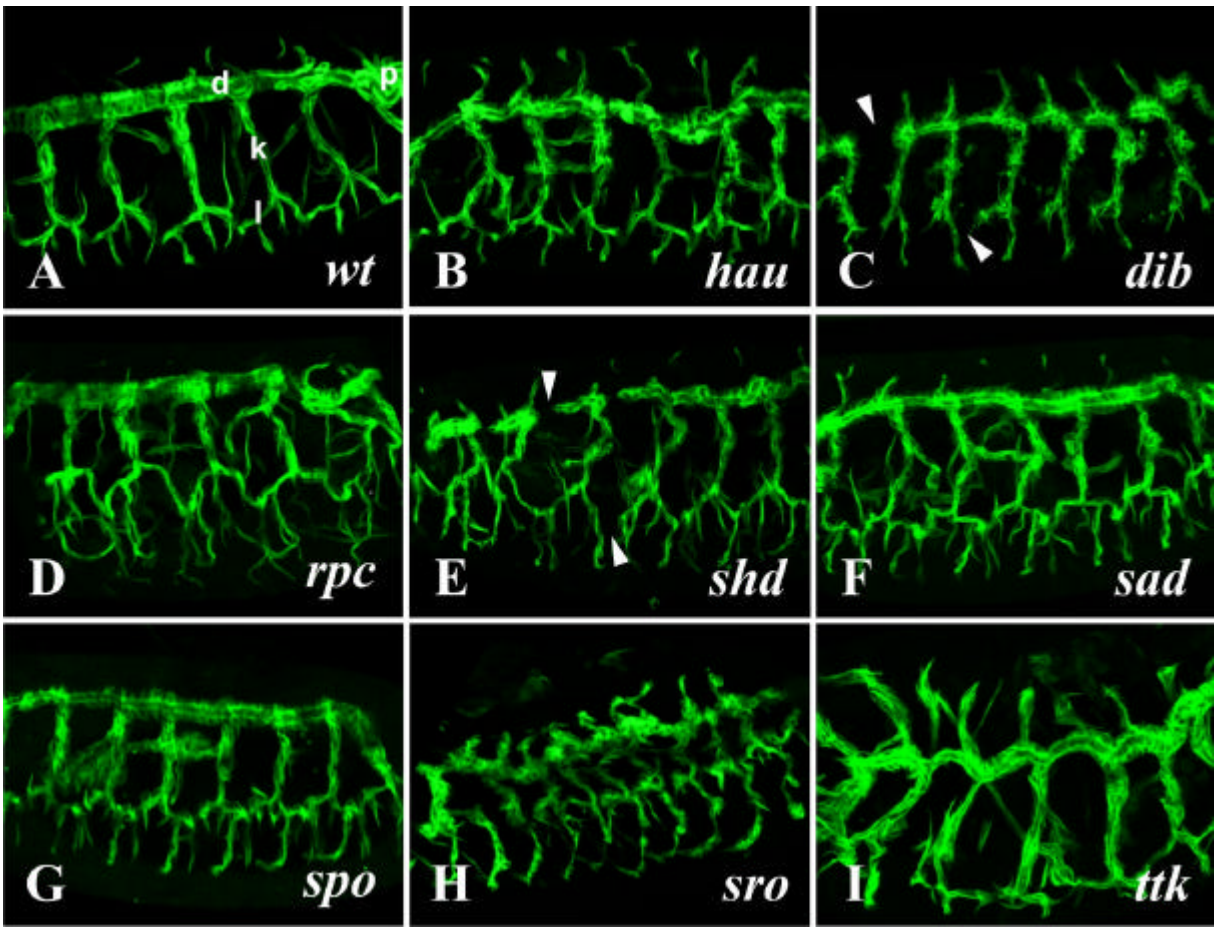


Abb. 21 Tracheendefekte bei den Genen der *ttk*-Gruppe A) Das wildtypische Tracheensystem besteht aus dem dorsalen Ast (d) , den transversalen Konnektiven (k) sowie den longitudinalen Ästen (l). p markiert die posterioren Spirakel. B) hau^{P1}, C) dib^{3}, D) $rpc^{O2\text{-}54}$, E) shd^{2}, F) sad^{1}, G) spo^{1}, H) sro^{1}, I) ttk^{B330}.
Verschiedene Tracheenäste sind unterbrochen (Pfeilspitzen in C, E), die Mikrotubuli der tracheenbildenden Zellen verlaufen teilweise senkrecht zur Oberfläche.

Mutationen in *rpc* führen zu einer Verkürzung der transversalen Konnektive. Die dorsalen Äste sowie die posterioren Spirakel fehlen (Abb. 21D), genauso wie bei *spo* (Abb. 21G).Auch in *hau*-mutanten Embryonen erscheint das Tracheensystem unorganisiert, es bildet sich aber korrekt aus (Abb. 21B).

Der Tracheenphänotyp von *ttk* unterscheidet sich von dem der übrigen Mutanten. Das Tracheensystem wirkt weitläufiger und weniger fein strukturiert als im Wildtyp. Kleinere Tracheenäste fehlen, ebenso Verbindungen zwischen den vorhandenen. Das Tracheensystem wirkt in seiner Struktur aufgelockert.

3.4.6 Muskeldefekte in der *ttk*-Gengruppe

Zur Untersuchung von Muskeldefekten wurde eine MHC-*lacZ-Enhancer trap*-Linie in die Mutanten der *ttk*-Gengruppe eingekreuzt, um die Muskeln mit anschließender anti-ß-Galaktosidase-Antikörperfärbung sichtbar zu machen.

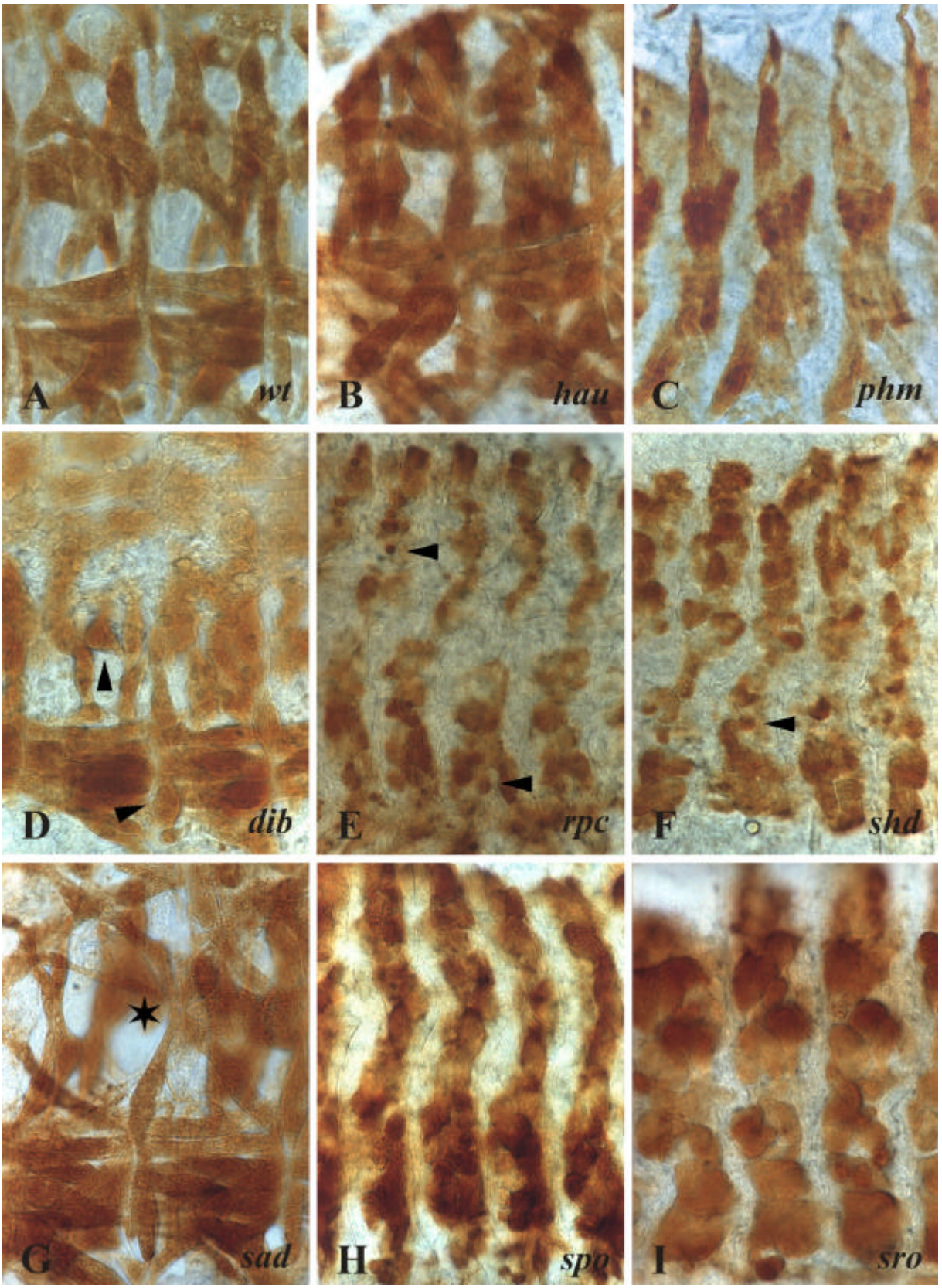


Abb. 22 Muskeldefekte in mutanten Embryonen der *ttk*-Gruppe In Embryonen der *ttk-Gruppe* des Stadiums 15/16 gibt es Anheftungsdefekte diverser Muskeln (Pfeilspitzen in D) bzw. ganze Muskeln fehlen (Stern in G), einzelne Myoblasten scheinen nicht zu fusionieren (Pfeilspitzen in E, F). *hau*-mutante Embryonen zeigen nur geringe Muskeldefekte (B).

A) Wildtyp, B) hau^{p1}, C) phm^{EX}, D) dib^{3}, E) $rpc^{O2\text{-}54}$, F) shd^{2}, G) sad^{1}, H) spo^{1}, I) sro^{1}.

Die Myogenese findet im Embryo während der Stadien 13-15 statt. Zuerst entwickeln sich einzelne Myoblasten, die dann fusionieren. Diese Synzytien wachsen weiter und bilden die einzelnen Muskeln. Im Stadium 16 ist die Myogenese abgeschlossen. Die Muskeln bilden ein sehr stereotypes, segmental organisiertes Muster, das die Identifizierung der einzelnen Muskeln erlaubt. In den Abdominalsegmenten A1-A7 kann man drei Muskelgruppen unterscheiden (nach Bate, 1993): die dorsale, die laterale und die ventrale Gruppe (Abb. 22A). Mutationen in den Genen der *tramtrack*-Gruppe führen zu drastischen Muskelphänotypen (Abb. 22C-I).

Erste Defekte in der Myogenese können im Stadium 15 beobachtet werden. Einzelne Muskeln werden nicht angelegt, andere weisen eine abnorme Morphologie auf und runden sich ab (Abb. 22D, G).

Ab Stadium 16, einhergehend mit den Veränderungen der Gesamtmorphologie, treten deutliche Defekte in der Muskulatur auf. Die Muskeln runden sich ab und scheinen keinen Kontakt zu den Apodemata (den Anheftungsstellen an der Körperwand) zu haben. Einzelne Muskeln lassen sich nur schwer ausmachen. Die Gesamtorganisation der Muskelgruppen ist gestört. Zusätzlich scheint es, als ob einzelne Myoblasten nicht fusioniert sind.

Der Ausfall von *haunted* scheint keinen bedeutenden Einfluß auf die Myogenese zu haben. Alle Muskeln sind vorhanden und weisen eine normale Morphologie auf. Allerdings zeigen sich Abweichungen vom wildtypischen Organisationsmuster (Abb. 22B).

3.4.7 Funktion der *ttk*-Gene im Auge

tramtrack übt bei der Augenentwicklung eine wichtige Funktion aus (s.o.). Um zu analysieren, ob die übrigen drittchromosomalen Gene der *ttk*-Gruppe ebenfalls eine Funktion im Auge haben, wurden Augenklone hergestellt. Es wurden geeignete P[w^+]-Elemente in der Nähe der entsprechenden Gene ausgewählt (meist die zur Kartierung benutzten, s.o.) und gegen starke Allele der jeweiligen Gene gekreuzt. Die Larven wurden röntgenbestrahlt und die adulten Fliegen auf Augenklone hin untersucht.

In den analysierten Augenklonen der Gene *dib*, *hau*, *rpc*, *shd*, *sad*, *spo* und *sro* zeigte sich kein Unterschied zum wildtypischen Auge. Die Photorezeptoren sind normal in Anzahl und Anordnung (Abb. 23). Die Gene der *ttk*-Gengruppe - mit Ausnahme von *tramtrack* - scheinen keine Funktion während der Augenentwicklung auszuüben.

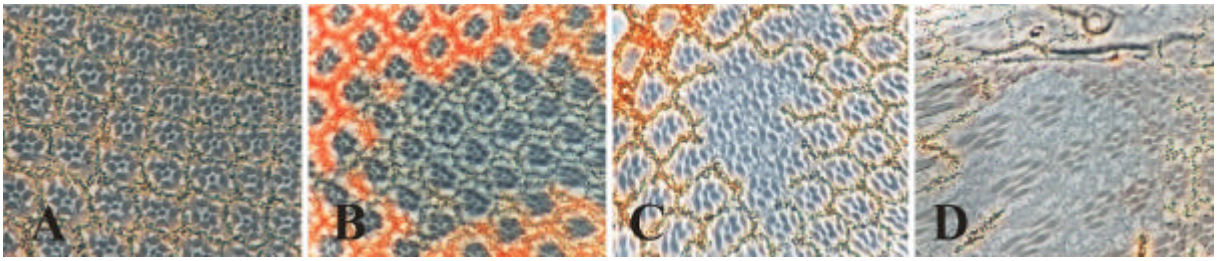


Abb. 23 Mutante Augenklone der Gene der *ttk*-Gruppe Semidünnschnitte von Komplexaugen; es sind einige Augenklone exemplarisch dargestellt. A) Wildtypisches Auge, B) *hau*^{1}-mutanter Augenklon, C) *shd*^{2}-mutanter Augenklon, D) *sad*^{1}-mutanter Klon. Es zeigen sich keine Abweichungen vom wildtypischen Organisationsmuster.

3.4.8 Einflüsse maternaler Komponenten

Das Gen *tramtrack* wird maternal exprimiert. Diese frühe Funktion wird zur Etablierung des Segmentierungsmusters verschiedener Paarregelgene wie *fushi tarazu* benötigt (Brown und Wu, 1993). Um zu untersuchen, ob die übrigen Gene der *tramtrack*-Gruppe eine maternale Komponente besitzen, also schon sehr früh in der Entwicklung benötigt werden, wurden Keimbahnklone erzeugt.

Dazu wurden Allele der jeweiligen Gene gegen die *OvoD-FRT*-Chromosomen des entsprechenden Chromosomenarms (3L bzw. 3R) gekreuzt. Die Larven wurden röntgenbestrahlt und die geschlüpften Weibchen gegen ein anderes Allel des entsprechenden Gens rückgekreuzt. Durch die Kreuzung gegen das *OvoD*-Chromosom können die Weibchen nur Eier legen, wenn mitotische Rekombination in den Zellen der Keimbahn stattgefunden hat. Die sich entwickelnden Eier besitzen keinen maternalen Anteil des entsprechenden Genprodukts. Durch die Rückkreuzung gibt es zwei Arten von Embryonen, solche, denen die maternale Komponente fehlt und solche, denen die maternale und die zygotische Komponente fehlen. Die Embryonen wurden in Kutikulapräparationen untersucht.

Embryonen, denen sowohl die maternale als auch die zygotische Genfunktion fehlen, weisen in Kutikulapräparationen keinerlei Strukturen auf (Abb. 24A-C). Es gibt, im Gegensatz zum Ausfall der zygotischen Genfunktion, keine Kutikulareste, die Mundhaken werden nicht angelegt. Die Embryonen sind oft in Längsrichtung verkürzt. Dieser Phänotyp ist bei allen Mutanten der *tramtrack*-Gruppe gleich.

Die zygotische Komponente ist in der Lage, eine nahezu wildtypische Entwicklung des Embryos zu ermöglichen (Abb. 24D). Die Embryonen zeigen ein praktisch wildtypisches Muster an Zähnchenbändern, die Mundhaken entwickeln sich und die Tracheen wirken normal. Die Embryonen sind allerdings nicht in der Lage zu schlüpfen.

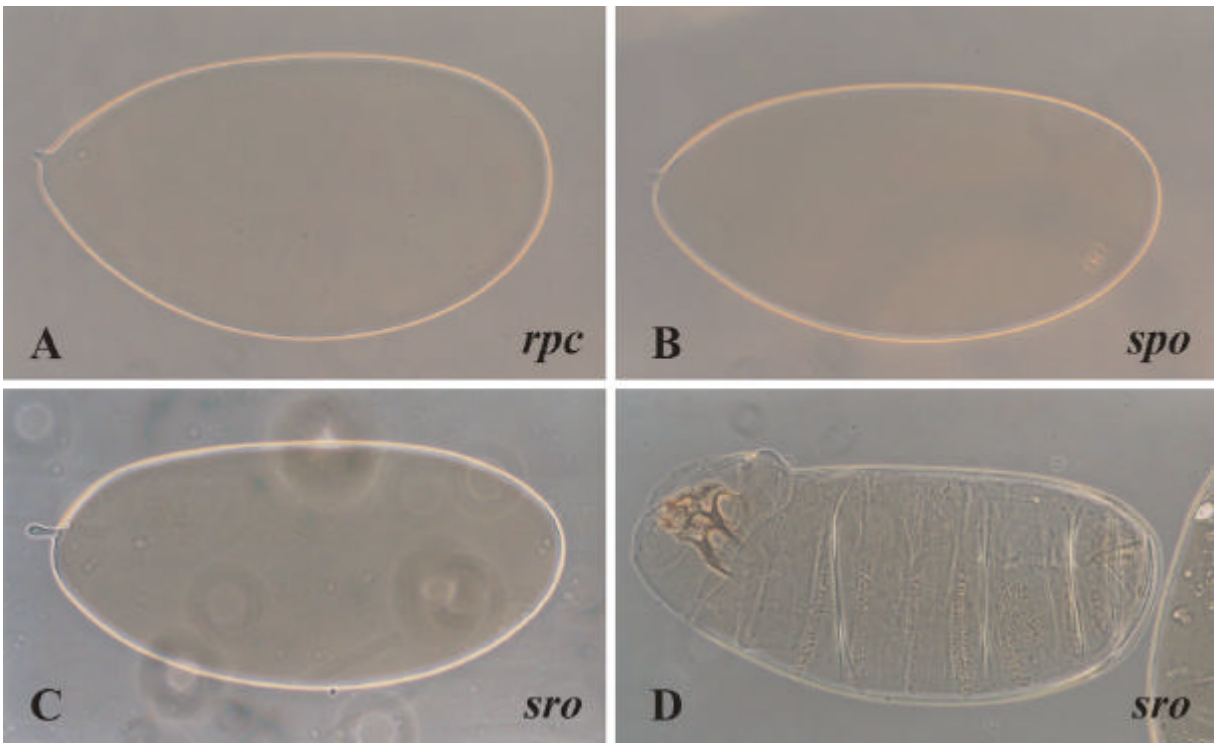


Abb. 24 Keimbahnklone Es sind Kutikulapräparationen einiger Embryonen exemplarisch dargestellt. A-C) Den gezeigten Embryonen fehlen sowohl die maternale als auch die zygotische Genfunktion. Es entwickeln sich keine kutikulären Strukturen oder Mundhaken, die Embryonen sind in anterior-posteriorer Richtung verkürzt. D) Dem Embryo fehlt nur die maternale Genfunktion, Kutikula und Mundhaken entwickeln sich wildtypisch.

Diese Resultate weisen auf das Vorhandensein einer maternalen Komponente hin. Ein Ausfall maternaler und zygotischer Genfunktion bedingt einen stärkeren Phänotyp als der Ausfall der zygotischen Funktion allein. Diese ermöglicht zwar eine überwiegend normale Entwicklung des Embryos, jedoch bleibt die embryonale Letalität erhalten.

Mutationen in den Genen der *tramtrack*-Gruppe führen außerdem zu Defekten bei der Entwicklung des Darms und der Malphigischen Gefäße, wie sie z.T. in Harbecke und Lengyel (1995), Bilder und Scott (1995) oder Jack und Myette (1999) beschrieben werden. Auf eine Analyse dieser Defekte wurde verzichtet.

3.4.9 Die Untersuchung von Interaktionen der *ttk*-Gruppengene

3.4.9.1 Genetische Interaktionen innerhalb der *ttk*-Gruppe

Die Ausfall-Phänotypen der *ttk*-Gengruppe sehen sehr ähnlich aus. Auch Doppelmutanten zwischen verschiedenen den Genen der Gruppe weisen einen Phänotyp auf, der ununterscheidbar von dem der Einzelmutanten ist. Bei der Betrachtung des Nervensystems

der Doppelmutanten mittels geeigneter Antikörper (22C10, BP102) erkennt man keine Unterschiede zu den fast identischen Phänotypen der Einzelmutanten (Abb. 25A-C). In keiner untersuchten Kombination treten verschiedene oder neue Qualitäten der Defekte auf. Dies bedeutet, daß im Nervensystem nur ein Zelltyp oder Entwicklungsprozeß betroffen ist. Daher kann davon ausgegangen werden, daß diese Gene zu einer gemeinsamen Wirkkette gehören. Es wurde versucht, sie in eine epistatische Reihe einzuordnen. Daher wurde die Anzahl der Mittelliniengliazellen als quantifizierbarer Marker mittels konfokaler Mikroskopie bestimmt. Dazu wurden die verschiedenen Doppelmutanten mit einer P{w^+,lacZ}*AA142*-Insertion als Marker im Hintergrund hergestellt (Abb. 25D-I). Da es bei den einzelnen Mutanten zum Teil deutliche Unterschiede in der Anzahl der Mittelliniengliazellen gibt, sollten sich zumindest in bestimmten Kombinationen Aussagen bezüglich der Epistasie treffen lassen. Die Ergebnisse faßt nachstehende Tabelle zusammen:

	dib	*rpc*	*shd*	*sad*	*spo*	*sro*	*ttk*
dib	**6,5**	3,8	3,1	5,7	2,6	5,6	1,6
rpc		**3,0**	3,4	4,2	5,1	3,8	6,0
shd			**4,7**	5,9	5,0	5,2	6,7
sad				**6,2**	4,6	6,9	7,3
spo					**5,5**	5,3	5,8
sro						**4,6**	n.b.
ttk							**1,8**

Tabelle 3: Zusammenfassung der Anzahl der Mittelliniengliazellen in den verschiedenen Einzel- und Doppelmutanten der drittchromosomalen Gene der *ttk*-Gruppe. Der Wildtyp zeigt 3,6 Mittelliniengliazellen pro Segment. *n.b.* nicht bestimmt.

Wie man an der Anzahl der Mittelliniengliazellen erkennen kann, ist eine eindeutige Zuordung der doppelmutanten Phänotypen zu einer Einzelmutante nicht möglich, da in den meisten Fällen ein intermediärer Phänotyp entsteht. Allerdings gibt es Ausnahmen: *dib* und *spo* zeigen in den Einzelmutanten mit 6,5 bzw. 5,5 MLG mehr Zellen als der Wildtyp. In der Doppelmutante ist die Anzahl auf 2,6 MLG reduziert. Bei der Doppelmutante *dib,shd* gibt es ebenfalls weniger MLG (3,1) als in den Einzelmutanten. *ttk*-mutante Embryonen haben nur noch 1,8 MLG pro Segment. Doppelmutanten mit *ttk* weisen hingegen eine erhöhte Anzahl von MLG auf, die sogar über der der übrigen Einzelmutanten liegt. Auch hier ist *disembodied* eine Ausnahme, die Doppelmutante *dib,ttk* weist die gleiche Anzahl wie die *ttk*-Mutante auf.

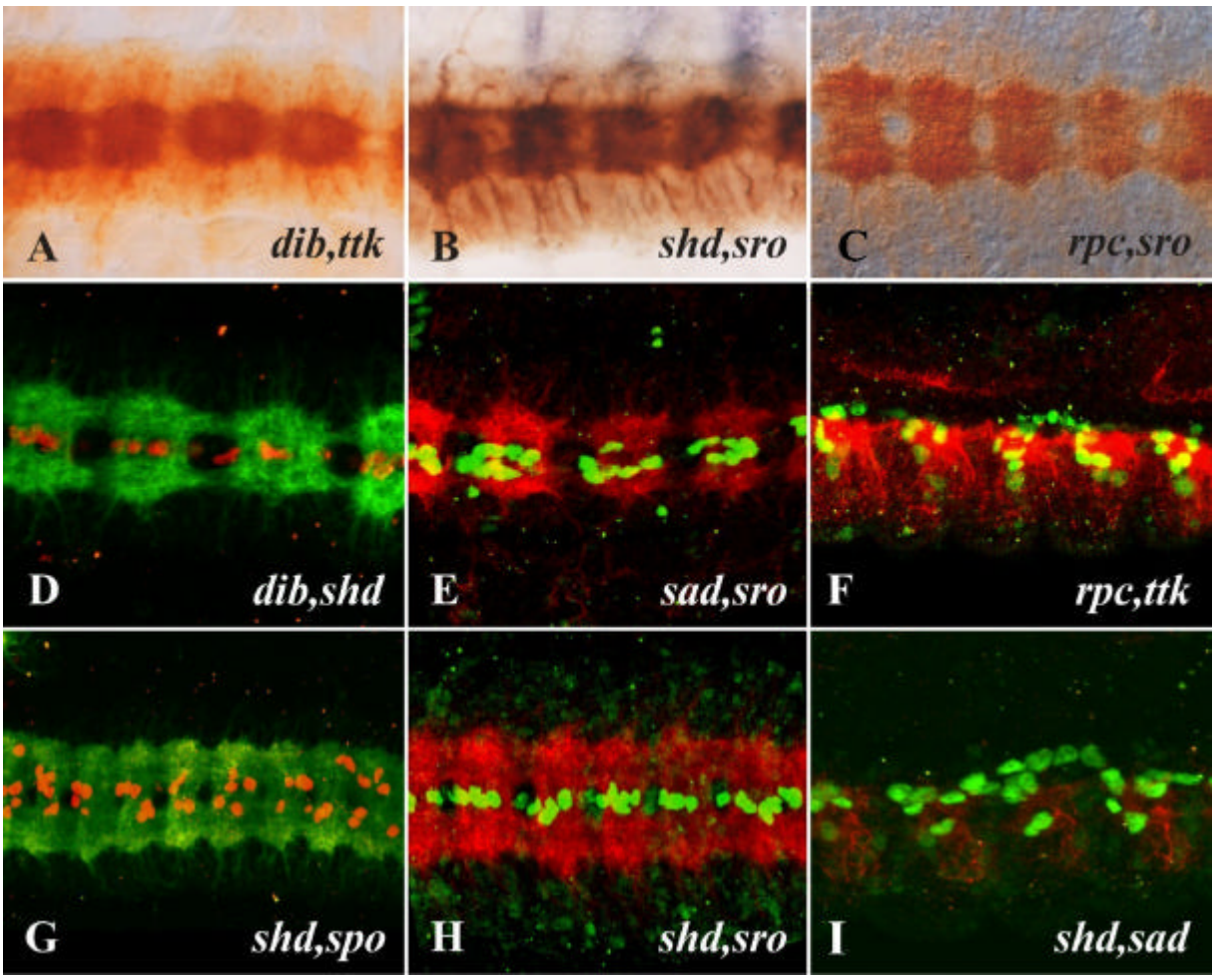


Abb. 25 Doppelmutanten innerhalb der *ttk*-Gruppe Zur Untersuchung der Wechselwirkung innerhalb der *ttk*-Gruppe wurden Doppelmutanten hergestellt. Einige sind exemplarisch dargestellt. Das Nervensystem wurde mit mAb BP102 markiert, in D-I zusätzlich die MLG mit der *Enhancer trap*-Linie *AA142* (Details siehe Text).
A) dib^{3}, ttk^{B330}, B) shd^{2}, sro^{1}, C) rpc^{D1-42}, sro^{1} D) dib^{D2-65}, shd^{2}, E) sad^{C3-9}, sro^{1}, F) rpc^{D1-42}, ttk^{B330}, Lateralansicht, G) shd^{2}, spo^{D3-110}, H) shd^{B1-53}, sro^{1}, I) shd^{B1-53}, sad^{1}, Lateralansicht

Bei den Doppelmutanten ist die Anzahl der MLG nicht so variabel wie bei den Einzelmutanten. Für die Lage der MLG gilt aber ebenso wie bei den Einzelmutanten, daß sich an den typischen Positionen weniger MLG finden, die ektopischen Zellen liegen an untypischen Positionen im ventralen Bereich des ZNS (Abb. 25F, I).

Eine Doppelmutante *sro,ttk* ließ sich nicht herstellen. Bei dem Versuch, diese Doppelmutante zu erzeugen, wurde beobachtet, daß nur 50% der erwarteten transheterozygoten Tiere auftreten. Die Dosisreduktion der beiden Gene führt zu partieller Letalität. Eine ähnliche Haploinsuffizienz wurde bei keiner weiteren Kombination beobachtet.

3.4.9.2 Interaktion mit TTK

Mutante Embryonen der Mitglieder der *ttk*-Gengruppe wurden auf ihre TRAMTRACK-Expression in verschiedenen Geweben untersucht.

Alle Gewebe der mutanten Embryonen zeigen normale Stärke der *tramtrack*-Expression, es läßt sich kein Unterschied zum Wildtyp feststellen. Selbst die in einigen Mutanten ektopisch vorhandenen MLG exprimieren TTKp69 (Abb. 15). Mutationen in den Genen der *tramtrack*-Gruppe haben keinen Einfluß auf die Expression von *tramtrack*, sie scheinen also nicht an dessen Kontrolle beteiligt zu sein.

Die Überexpression von TTKp69 führt, wie bereits beschrieben, zu starken Augendefekten (Abb. 26B). Diese Situation diente als Testsystem, um mögliche Interaktionen der übrigen Gene der *ttk*-Gruppe mit *tramtrack* nachzuweisen. Dazu wurde durch Herausnahme einer Kopie die Dosis eines Gens der *ttk*-Gruppe reduziert und überprüft, ob es zu einer Modifikation des *ttk*-Überexpressionsphänotyps kommt, sich also funktionell eine Interaktion nachweisen läßt.

Zu diesem Zweck wurde *ttkp69* mit Hilfe einer *sevenless*-Gal4-Linie im Auge überexprimiert. Die Herausnahme einer Kopie der Gene *disembodied* oder *haunted* zeigt keinen Einfluß auf

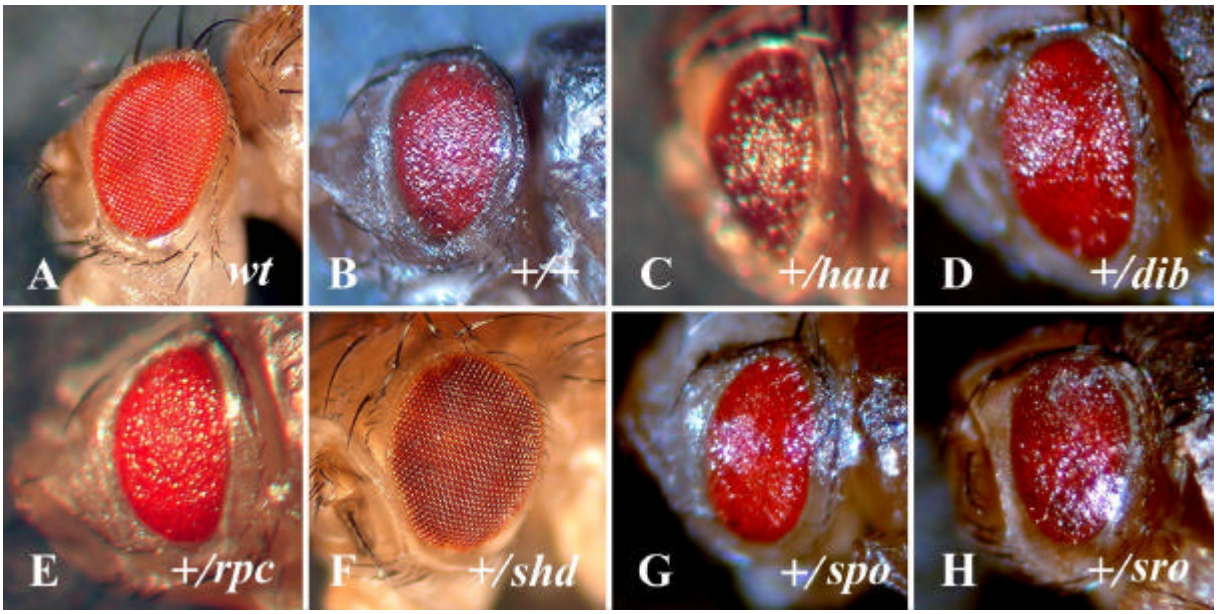


Abb. 26 Einfluß der Dosisreduktion der Gene der *ttk*-Gruppe auf ektopische Expression von TTKp69
Zur Untersuchung einer möglichen Interaktion innerhalb der *ttk*-Gruppe wurde TTKp69 mit einer *sev*-Gal4-Linie im Auge exprimiert und anschließend je eine Kopie eines *ttk*-Gruppengens herausgenommen. A) Wildtyp, B) *sev*-Gal4; *UASttkp69* führt zu rauhen Augen. C) *sev*-Gal4; *UASttkp69; +/ hau*^{P1} und D) *sev*-Gal4; *UASttkp69; +/ dib*^{3} zeigen keine Veränderung des Phänotyps. E) *sev*-Gal4; *UASttkp69; +/ rpc*$^{O2\text{-}54}$ und G) *sev*-Gal4; *UASttkp69; +/ spo*^{1} führen zur Abschwächung, *sev*-Gal4; *UASttkp69; +/ shd*^{2} (F) sogar fast zur Reversion des Phänotyps. Die Herausnahme einer Kopie von *sro* (*sev*-Gal4; *UASttkp69; +/ sro*^{2},H) verstärkt den Phänotyp.

den Phänotyp der Überexpression (Abb. 26C, D). Die Dosisreduktion der Gene *rippchen*, *shadow* und *spook* schwächt den „rauhen Augen"-Phänotyp ab, die Dosisreduktion von *shade* führt sogar zu einer fast vollständigen Reversion des mutanten Augenphänotyps (Abb. 26E-G). Im Gegensatz zu den übrigen Genen der *tramtrack*-Gruppe zeigt die Herausnahme einer Kopie von *shroud* eine deutliche Verstärkung des Phänotyps, die Augen weisen stärkere Defekte auf als die Überexpression von TRAMTRACK alleine (Abb. 26G). Diese Situation führt sogar zu pupaler Letalität.

3.4.9.3 Interaktion mit dem EGF-Rezeptorsignalweg

Da die Gene der *ttk*-Gruppe eine Wirkgruppe definieren, wurde untersucht, ob diese Teil von bekannten Signaltransduktionswegen ist oder mit ihnen interagiert.

Der EGF-Rezeptorsignalweg ist für die korrekte Differenzierung der Mittelliniengliazellen verantwortlich. Um eine mögliche Interaktion der *tramtrack*-Gengruppe mit der EGF-Rezeptorsignaltransduktionskaskade zu untersuchen, wurden Doppelmutanten der *tramtrack*-Gruppengene mit dem Gen s*pitz* hergestellt.

spitz ist ein Ligand des EGF-Rezeptors (Rutlegde *et al*., 1992), dessen Ausfall, bedingt durch den Differenzierungsdefekt in den Mittelliniengliazellen, zu einem „fusionierten Kommissuren"-Phänotyp führt (Abb. 27B, Klämbt *et al*., 1991). Doppelmutanten von *spitz* und den Genen der *tramtrack*-Gruppe zeigen Nervensystemdefekte, die zum Teil völlig verschieden von denen der Einzelmutanten sind. In *spi;sad*-Doppelmutanten bilden sich beide Kommissuren aus und sind, trotz des Ausfalls von *spitz*, deutlich getrennt (Abb. 27F). Die posteriore Kommissur erscheint dünner und die Konnektive sind dicker als im Wildtyp. In *spi;dib*-Doppelmutanten entwickeln sich keine Kommissuren mehr, auch die Ausbildung der Konnektive ist gestört (Abb. 27C). Einen ähnlichen Phänotyp zeigen auch *spi;rpc*-Doppelmutanten (Abb. 27D). Hier bilden sich einzelne Kommissuren aus, und die Konnektive sind, wenn auch stark verdünnt, vorhanden. Der Abstand der Konnektive voneinander ist in beiden Situationen breiter als im Wildtyp.

In *spi;sro*-Doppelmutanten bilden sich beide Kommissuren, die jedoch oft nicht getrennt werden (Abb. 27H). Es bildet sich nur ein Konnektiv aus. Ähnlich sieht auch das ZNS *spi;shd*-mutanter Embryonen aus. Beide Kommissuren bilden sich aus, werden aber nicht getrennt (Abb. 27E). Die Ausbildung der Konnektive ist gestört, sie sind stark verdünnt. Das bei dieser Doppelmutante verwendete *shade*-Allel *B1-53* trägt eine *AA142*-P-Element-Insertion im Hintergrund, wodurch sich die Mittelliniengliazellen markieren lassen. Pro Segment entwickeln sich 4-5 MLG, die Anzahl, wie man sie in *shade*-mutanten Embryonen findet. Diese liegen aber, für *spitz*-Mutanten typisch, nicht zwischen den Kommissuren.

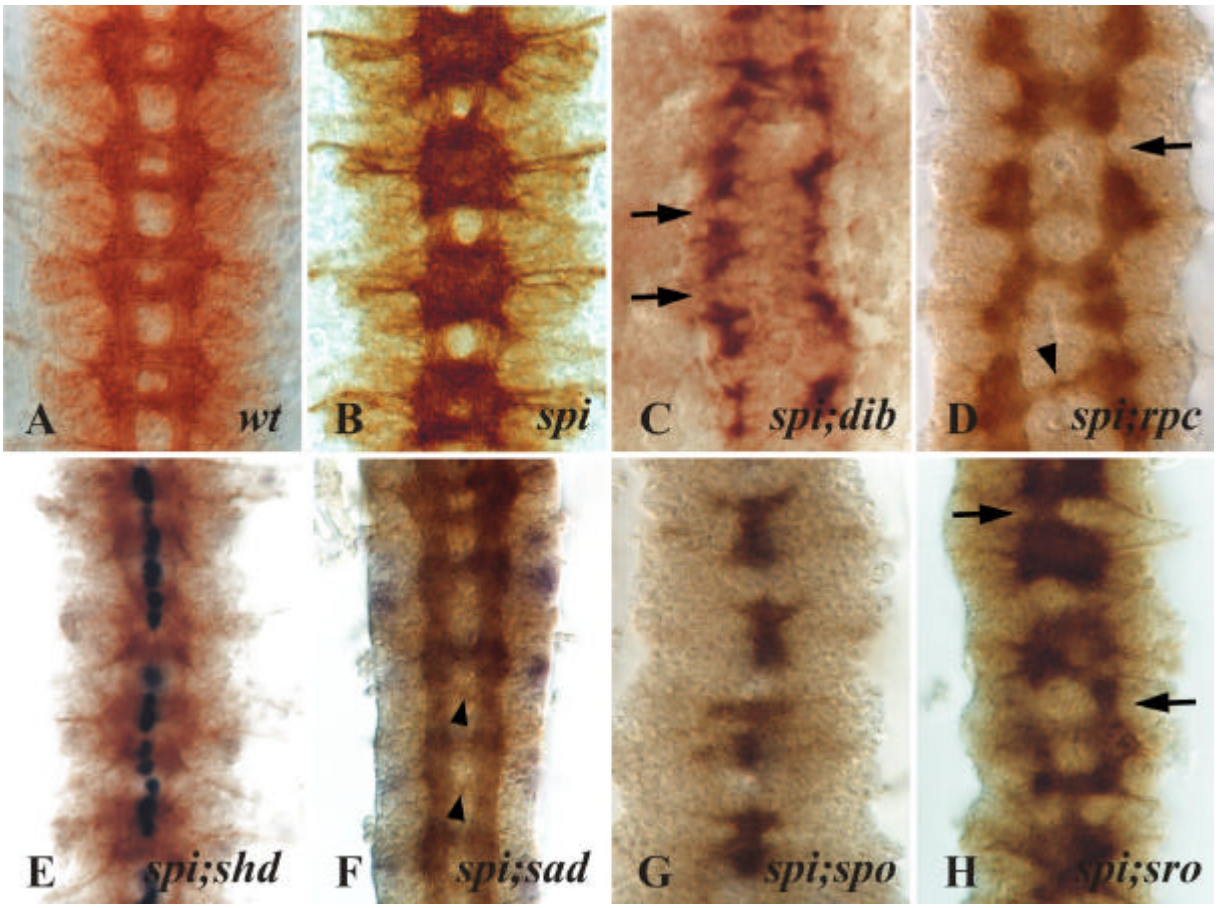


Abb. 27 Interaktion mit der EGF-Rezeptorsignaltransduktionskaskade Zur Untersuchung einer Wechselwirkung mit dem EGF-Rezeptorsignalweg wurden Doppelmutanten zwischen Genen der *ttk*-Gruppe und dem Allel spi^{IIA14} hergestellt. Das ZNS wurde mit mAb BP102 markiert. A) Wildtyp. B) spi^{IIA14}-mutante Embryonen zeigen einen „fusionierten Kommissuren"-Phänotyp. C) Doppelmutante $spi^{IIA14};dib^{3}$-Embryonen entwickeln keine Kommissuren, die Konnektive sind unterbrochen (Pfeile). D) In $spi^{IIA14};rpc^{O2\text{-}54}$-mutanten Embryonen gibt es einzelne Kommissuren (Pfeilspitze), die Konnektive sind reduziert oder unterbrochen (Pfeil). E) $spi^{IIA14};shd^{2}$ führt zur Reduktion der Konnektive. Die MLG (blau) sind markiert. F) In $spi^{IIA14};sad^{1}$-mutanten Embryonen ist die posteriore Kommissur reduziert (Pfeilspitzen), die Konnektive sind verdickt. G) $spi^{IIA14};spo^{1}$-doppelmutante Embryonen zeigen einen Kollaps des ZNS an der Mittellinie, die Konnektive sind unterbrochen. H) In $spi^{IIA14};sro^{1}$-Embryonen entwickelt sich nur ein Konnektiv (Pfeile). Die Kommissuren werden nicht getrennt.

Einen zu *spi;dib*-Doppelmutanten entgegengesetzen Phänotyp zeigen *spi;spo*-mutante Embryonen (Abb. 27G). Hier ist das Nervensystem an der Mittellinie kollabiert, zwischen den Neuromeren bilden sich keine Konnektive aus. Ein ähnlicher Phänotyp wurde für Mutationen in *single minded* oder *faint little ball* beschrieben (Thomas *et al.,* 1988*;* Raz und Shilo, 1992). Die Phänotypen der Doppelmutanten unterscheiden sich deutlich von denen der Einzelmutanten. Dies bedeutet, daß *spitz* und die Gene der *ttk*-Gruppe unterschiedlich wirken und diese daher wahrscheinlich nicht innerhalb des EGF-Rezeptorsignalweges agieren.

3.4.9.4 DECAPENTAPLEGIC-Expression in Mutanten der *ttk*-Gruppe

Der JUN-Kinase-Signaltransduktionsweg ist für korrekte epidermale (speziell für den dorsalen Schluß) und tracheale Entwicklung verantwortlich. DECAPENTAPLEGIC (DPP) wird im Embryo in den Zellen des dorsalen Randes der Epidermis exprimiert, die den dorsalen Schluß vollziehen, ebenso in den Tracheenplacoden (Abb. 28). Es wird also in zwei Geweben exprimiert, die in Mutanten der *tramtrack*-Gruppe betroffen sind. Daher wurde untersucht, ob die *dpp*-Expression in diesen Mutanten verändert ist.

Mutanten der Gene *dib, hau ,rpc, phm, shd, sad, spo* und *sro* zeigen keine Veränderung des wildtypischen *dpp*-Expresisonsmusters.

In *ttk*-mutanten Embryonen finden sich Abweichungen vom wildtypischen Expressionsmuster (Abb. 28). Es sind alle Expressionsdomänen vorhanden. Allerdings ist die Anordnung und deutliche Trennung der Domänen gestört. Es scheint sich aber eher um sekundäre Effekte zu handeln, da in *ttk*-Mutanten schon früh verschiedene Gewebe betroffen sind.

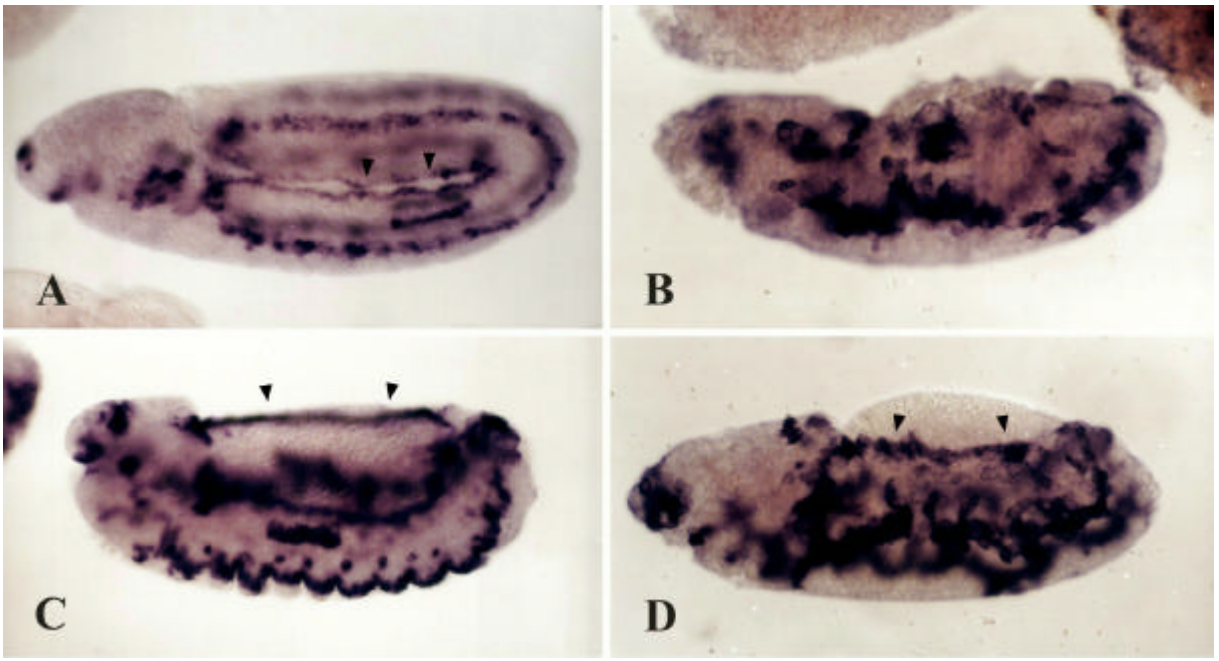


Abb. 28 *dpp*-Expression in *ttk*-mutanten Embryonen A,C) Wildtypische Embryonen in den Stadien 11 und 13 (nach Campos-Ortega und Hartenstein). B, D) *ttk*-mutante Embryonen vergleichbarer Altersstufen. Sämtliche Expressionsdomänen sind erkennbar, erscheinen aber ungeordnet. Die Pfeilspitzen markieren die *dpp*-Expression im dorsalen Rand der Epidermis.

3.4.9.5 Einfluß auf die Positions-Effekt-Variegation

Chromatinbindende Proteine können durch Änderung des Chromatinzustandes (Hetero- bzw. Euchromatin) Einfluß auf Genaktivität nehmen (Paro, 1990; Jones und Gelbart, 1993). Zahlreiche dieser Komponenten wurden identifiziert, da sie als Modifikatoren der Positions-

Effekt-Variegation (PEV) agieren. Sie nehmen in bestimmten chromosomalen Rearrangements Einfluß auf die Expression euchromatischer Gene. Eine solche Veränderung kann man im Komplexauge relativ leicht beobachten. Dort kommt es durch unterschiedlich starke Expression des *white*-Gens innerhalb des Auges zu variegierter Augenfarbe.

TTK besitzt eine POZ-Domäne, wie sie auch einige chromatinbindende Proteine und der *E(Var)3-93D* (Dorn *et al.*, 1993) aufweisen. Da zusätzlich in der jeweiligen unmittelbaren Umgebung der *tramtrack*-Gruppengene auch *Enhancer* bzw. Suppressoren der Variegation (*E(var)/ Su(var)*) kartieren, wurde untersucht, ob es sich bei den Mitgliedern der *tramtrack*-Gruppe um solche Modifikatoren handelt.

Um dies zu testen, wird das chromosomales Rearrangement w^{m4h} verwendet, bei dem das *white*-Gen an eine Grenze zwischen Eu- und Heterochromatin transloziert ist. Dies führt zu variegierter Augenfarbe (Dorn *et al.*, 1993b). Nach Einkreuzen von Mutationen kann durch Veränderung des Augenphänotyps auf Einflüsse auf die Variegation geschlossen werden. Da im Ausgangsstamm eine relativ große Varianz des Phänotyps auftritt, die eine genaue Aussage erschwert, wurden zwei weitere Teststämme verwendet. Der eine trägt zusätzlich eine Mutation, die die Variegation supprimiert und zu einem fast wildtypisch roten Auge führt. Der andere Stamm ist mit einem *Enhancer* der Variegation kombiniert und resultiert in nahezu weißen Augen (Abb. 29A, G). Die Verwendung dieser Stämme ermöglicht durch Veränderung dieser Extremformen der Variegation eine genauere Aussage über mögliche *Enhancer* oder Suppressoren.

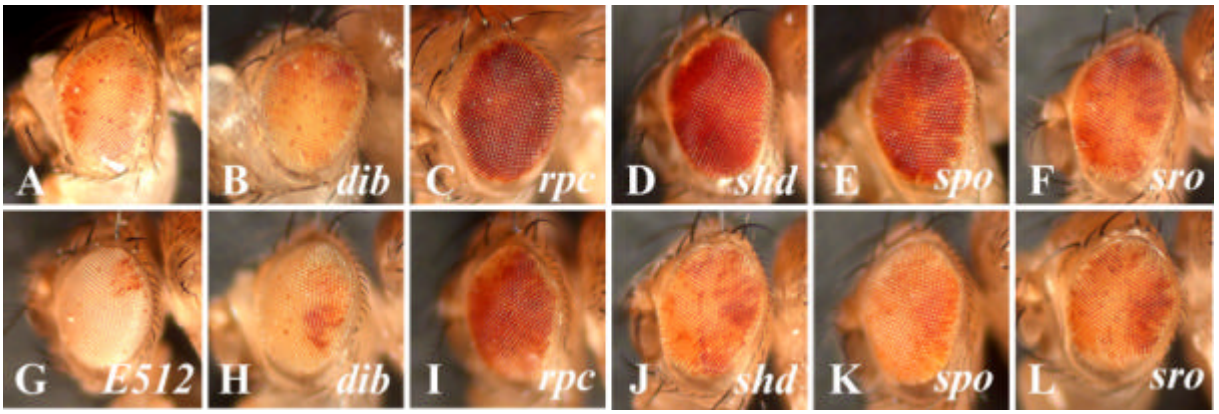


Abb. 29 Einfluß der *ttk*-Gruppengene auf die Postitions-Effekt-Variegation A) Das Standardrearrangement w^{m4h} zeigt variegierte Augen. B-F) zeigen jeweils den Einfluß auf das Standardrearrangement, die Variegation wird supprimiert. G) Standardrearrangement, rekombiniert mit dem *Enhancer* der Variegation *512*. H-L) die verstärkte Variegation des *Enhancers 512* wird deutlich verringert.

Zur Untersuchung eines Einflusses wird jeweils eine Kopie des zu untersuchenden Gens herausgenommen.

Das Einkreuzen von Allelen der Gene *hau*, *sad* und *ttk* führt zu keiner erkennbaren Veränderung der Variegation der Teststämme. Allele von *rpc*, *shd* und *spo* führen zu einer Verringerung der Variegation (Abb. 29C-E, I-K), so daß es sich um Suppressoren dieses Effektes zu handeln scheint. *dib* und *sro* sind allenfalls sehr schwache Suppressoren der Variegation, eine genaue Aussage ist aufgrund der Variabilität in den Teststämmen nicht möglich (Abb. 29B, H, F, L). Die Gene der *tramtrack*-Gruppe haben also zumindest teilweise einen Effekt auf die PEV und damit möglicherweise Einfluß auf die Genexpression durch Veränderung der Chromatinstruktur.

3.5 Suche nach letalen P-Element-Insertionen

Um einen Ansatzpunkt für eine molekulare Analyse zu haben, wurde versucht, letale P-Element-Insertionen in den Genen der *tramtrack*-Gruppe zu finden. Dazu wurden die verfügbaren letalen P-Element-Insertionsstämme der entsprechenden Regionen aus dem *Bloomington Stock Center* auf ihr Komplementationsverhalten hin untersucht. Alle Stämme komplementierten jedoch die entsprechenden EMS-Allele der Gene der *tramtrack*-Gruppe. Es standen auch Teile einer - damals nicht näher charakterisierten - Sammlung letaler P[*white*$^+$]-Elementstämme (mittlerweile z.T. veröffentlicht unter Deák *et al*., 1997) zur Verfügung. Es wurden etwa 4600 Komplementationskreuzungen ausgewertet.
Zwei der P-Element-Insertionen der Sammlung, 1456/12 und 1481/2, komplementieren Allele des Gens *shroud* nicht. Es konnte allerdings nachgewiesen werden, daß es sich um Hintergrundsmutationen handelt und diese Letalitäten nicht durch die P-Element-Insertionen verursacht werden.

Das Gen *rippchen* kartiert im Intervall 75 B8-10. In dieser Region kartiert ein Modifikator der Variegation, der *Enhancer of Variegation 181 (E(Var)181*, 75B5-10, Dorn *et al*., 1993b). Von 125 untersuchten Exzisionsereignissen dieser P-Element-Insertion führen 72 zu embryonaler Letalität. Diese fallen in zwei Komplementationsgruppen, die aber beide *rippchen* komplementieren. Keines der Exzisionsallele zeigt einen *rippchen*-ähnlichen Phänotyp. Da durch die Exzisionen beide Seiten der P-Element-Insertion betroffen sind, ist davon auszugehen, daß *rippchen* nicht in unmittelbarer Nachbarschaft des *E(Var)181* liegt.

3.6 Generierung neuer P-Element-Insertionen

Unter den getesteten P-Element-Linien ließ sich keine letale P-Element-Insertion in den Genen der *ttk*-Gruppe finden. Daher wurde versucht, mittels P-Element-Mobilisierung („local

hop“) Insertionen in den entsprechenden Genen zu erzeugen (Tower *et al*., 1993; Zhang und Spradling, 1993). Als Ausgangsstämme wurden meist die zur meiotischen Kartierung benutzten P-Elementstämme gewählt. Für das Gen *rippchen* wurde die Insertionslinie *E(Var)181* (75B5-10) gewählt, für *haunted* der Stamm *P{hsneo}neur*$^{[neo37]}$ (85D1-27). Es konnten zwei P-Element-induzierte *disembodied*-Allele sowie ein *haunted*-Allel isoliert werden. Die genauen Zahlenverhältnisse gibt die nachfolgende Tabelle wieder:

Gen	Ausgangs-P-Element	getestete Fliegen	erzeugte Allele
disembodied	*A72*	960	2
haunted	*neur*$^{[neo37]}$	23	1
rippchen	*E(Var)181*	313	-
shade	*K110*	1650	-
shadow	*S87*	710	-
spook	*Q114*	703	-
shroud	*D30*	1830	-

Tabelle 4: Übersicht über die Generierung neuer P-Element-Insertionen.

3.7 Charakterisierung der P-Element-Insertion in *haunted*

Die generierte P-Element-Insertion in das Gen *haunted*, *hau*^{P1} genannt, wurde mittels *in situ*-Hybridisierung an Speicheldrüsenchromosomen in den Bereich 85D kartiert. In dieser Region wurde *haunted* aufgrund der Defizienzenkartierung vermutet. Exzisionen dienten dem Nachweis, daß die Letalität über *haunted* durch die P-Element-Insertion verursacht wird. Sie ließ sich in 42 von 69 Fällen revertieren. Folglich handelt es sich um eine P-Element-induzierte Letalmutation in *haunted*. Im Gegensatz zu den anderen bekannten Allelen zeigt dieses nicht nur den beschriebenen Kutikula-Phänotyp, sondern auch Defekte im Nervensystem. Diese sind verschieden von denen der Ausgangsinsertion im Gen *neuralized*.

Die Analyse 13 letaler Exzisionen von *hau*^{P1} auf ihren Nervensystemphänotyp hin zeigte keine mit einem stärkeren Phänotyp als den Ursprungsinsertion. Dies deutet darauf hin, daß es sich bei der P-Element-Insertion um ein amorphes Allel handelt. Die an das P-Element angrenzenden genomischen Bereiche, insgesamt 3 kb, wurden mittels *plasmid rescue* mit den Restriktionsenzymen *BamH1*, *EcoR1* und *SalI* kloniert. Sie wurden von den Enden her ansequenziert und mit der Datenbank des *Berkeley Drosophila Genome Projects* verglichen. Es zeigten sich keine Homologien zu bekannten Sequenzen. Die weitere Analyse von *haunted* wurde zugunsten der Klonierung von *disembodied* aufgeschoben.

3.8 Analyse der *disembodied*-P-Element-Insertionen

3.8.1 A72 ist eine P-Element-Insertion bei *scratch*

Als Ausgangsstamm für die Insertionsmutagenese in *disembodied* diente die vitale P-Element-Insertion P{lwB}*A72*, die ß-Galaktosidase-Expression in allen embryonalen Neuronen zeigt. Dies wurde mittels konfokaler Mikroskopie durch die Kolokalisation mit dem neuronalen Antigen ELAV nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Klonierung der angrenzenden genomischen Bereiche und Sequenzvergleich mit der Datenbank des *Berkeley Drosophila Genome Projects* ergaben, daß es sich um eine Insertion 550 bp oberhalb des Gens *scratch* handelt, das panneural exprimiert ist (siehe unten).
Bei dem Versuch, embryonal-letale Exzisionsmutanten dieser Linie zu erzeugen, konnte unter 148 getesteten Exzisionen kein letales Ereignis festgestellt werden. Dieses Ergebnis entspricht den beschriebenen amorphen Allelen von *scratch*, da homozygot mutante Fliegen schlüpfen und subtile Augen- und Flügelphänotypen aufweisen (Roark *et al*., 1995). Da es das Ziel war, embryonal-letale Linien und evtl. eine Deletion zu erzeugen, die *disembodied* einschließt, wurden die Fliegen nicht näher analysiert.

3.8.2 Klonierung der *disembodied*-Region

Die zwei generierten *disembodied*-Allele wurden phänotypisch charakterisiert. Die Kutikula-Phänotypen sind identisch mit denen der bekannten *dib*-Allele (undifferenzierte Kutikula). Auch im Nervensystem zeigen sich die gleichen Defekte, wie sie für die EMS-induzierten Allele beschrieben wurden (s.o.). Diese treten auch in Heterozygose über EMS-induzierten *dib*-Allelen auf. Das *lac*Z-Expressionsmuster stimmt mit dem der Ursprungs-*Enhancer trap*-Linie *A72* überein.
In situ-Hybridisierung mit einer DIG-markierten *white*$^{+}$*-Probe* an Speicheldrüsen-chromosomen ergab, daß beide P-Element-Insertionen bei 64A kartieren; andere Signale (abgesehen vom endogenen *white*-Gen) waren auf den Chromosomen nicht detektierbar. Mittels P-Element-Mobilisierung ließ sich die Letalität von *dib*^{P1} in 3 von 74 Exzisionsereignissen revertieren. Vitale Exzisionen von *dib*^{P2} ließen sich unter 127 getesteten Fliegen nicht beobachten. Die geringe Zahl der Reversionen von *dib*^{P1} bzw. die nicht-mögliche Reversion von *dib*^{P2} sind Indizien dafür, daß es sich in beiden Fällen um Doppelinsertionen handelt (Diese Annahme konnte molekular bestätigt werden, s.u.).

Die an die P-Element-Insertionen *dib*^{P1} und *dib*^{P2} im 3´-Bereich angrenzenden genomischen

Bereiche wurden durch *plasmid rescue* und inverse PCR kloniert. Es wurden ausschließlich Fragmente der folgenden Größen isoliert:

	plasmid rescue		inverse PCR	
dib^{P1}	*Pst1*	1,9 kb	*Alu1*	0,3 kb
	Sac1	1,5 kb	*NdeII*	1,4 kb
	Sal1	3,8 kb	*Rsa1*	0,4 kb
dib^{P2}	*Pst1*	2,0 kb	*Alu1*	0,8 kb
	Sal1	3,0 kb	*NdeII*	0,5 kb
	Xho1	3,2 kb	*Rsa1*	0,6 kb

Tabelle 5: Zusammenstellung der an die *dib*-P-Element-Insertionen angrenzenden genomischen Fragmente.

Für die Klonierung von *disembodied* wurde verschiedenes genomisches Material dieser Region analysiert. Dazu wurde eine genomische Phagenbank (Kr/CyO, C. Klämbt) gesichtet. Mit genomischen dib^{P1}*-PstI-* und *A72-SalI-plasmid rescue*-Fragmenten wurden 4 bzw. 2 Phagen isoliert. Ebenso erfolgte die Analyse von 9 Cosmiden der Region 64A (Siden-Kiamos *et al*., 1990). Es handelt sich um die Cosmide 45D2, 47D2, 67H6, 82D2, 144F5, 161H11, 168G6, 171G8 und 197H9. Deren korrekte Lokalisation wurde durch *in situ*-Hybridisierung an Speicheldrüsenchromosomen überprüft. Vom *Berkeley Drosophila Genome Project* stammen P1-Klone des *contigs* DM2775. Er überspannt die Region 63F1-64A5 und umfaßt 15 P1-Klone (Karte siehe Anhang).

disembodied kartiert genetisch bei 64A3 (Harrison *et al*., 1995). Um diese Region molekular einzugrenzen, wurden zwei Marker gewählt, die auf jeden Fall auf verschiedenen Seiten von *dib* liegen sollten. Als distaler Marker wurde die P-Element-Insertion *A72* (64A1-3) gewählt, für den proximalen Bereich die P-Element-Insertion P{PZ}*rG166* (64A4-5).

Ein 0,7 kb großes genomisches *Alu1*-Fragment aus dem 3´-Bereich der Insertion *rG166* wurde durch inverse PCR isoliert und diente als Sonde. Es hybridisiert jeweils mit einem 3,8 kb-*EcoR1*-Fragment der Klone DS711, 1122, 3653, 4230 und 7018. Da die Größe des *EcoR1*-Fragmentes bei allen Klonen gleich ist, handelt es sich nicht um ein Randfragment. Somit konnte die Lokalisation der Insertion *rG166* auf 64A festgelegt werden. Das Fragment hybridisiert nicht mit den isolierten Phagen und den Cosmiden.

Aus der P-Elementlinie *A72* wurden durch *plasmid rescue* ein 0,8 kb großes genomisches *Pst1*- und ein 2,7 kb großes *Xho1*-Fragment isoliert. Sie hybridisieren, mit Ausnahme des Klons DS8290, mit allen Klonen, die im Bereich 64A2 liegen. Da die Lokalisation der Klone

durch STS bestätigt wurde, kartiert die P-Element-Insertion *A72* zwischen den STS-Markern DM1727 (64A1) und DM2005 (64A3). Die genomische *Pst1*-Sonde hybridisiert mit dem Cosmid 168G8, nicht aber mit Phagen, die mit der *dib*^{P1}-Sonde isoliert wurden.

Das *dib*^{P1}*-Pst1*-Fragment wurde auf die P1-Klone hybridisiert. Es hybridisiert jeweils mit einem ca. 9 kb *EcoR1*-Fragment der Klone DS 3653, 4701, 4946, 7018, 8290 und 8866 sowie mit einem 2,9 kb-*EcoR1*-Fragment des Klons DS 4230. Das P-Element in *dib*^{P1} liegt damit in der Region 64A2-3, distal des Markers DM 2005.

Das *dib*^{P2}*-Pst1*-Fragment hybridisiert mit den Klone DS 728, 3653, 4035, 4701, 4780 und 8290. Aufgrund dieser Hybridisierungen kartiert das P-Element bei 64A2-3, weiter distal der Insertion von *dib*^{P1}. Es gibt allerdings noch ein widersprüchliches Signal auf dem Klon DS1122, der in einer anderen Region kartiert (64A3-5, aber proximal von DM 2005).

Die durch *plasmid rescue* isolierten genomischen Fragmente wurden, ebenso wie Fragmente, die durch inverse PCR gewonnen wurden, mit Hilfe P-Element-spezifischer Primer (*Pry1*, *Pry2*) sequenziert. Aus den Sequenzdaten konnten an die P-Elemente angrenzenden genomische Sequenzen von 530 bp (für *dib*^{P1}) bzw. 400 bp (*dib*^{P2}) rekonstruiert werden. Das *dib*^{P1}*-Sac1*-Fragment wurde komplett durchsequenziert.

Der Sequenzvergleich zeigt für die Konsensussequenz von *dib*^{P2} Homologie mit dem Klon BACR48M07 (64A3-B6). Die Sequenz liegt etwa 600 bp unterhalb des Gens *masquerade (mas)*. Die *mas*-cDNA und *dib*^{P2}*-rescue*-Fragmente hybridisieren mit gleichen Fragmenten der P1-Klone.

Nach Vergleich der Sequenzdaten mit der Datenbank liegt das P-Element aus *dib*^{P1} bei *scratch*, und zwar direkt oberhalb der Insertion von *A72*, in inverser Orientierung, d.h. in 3´-5´-Richtung.

Bei den beiden P-Elementlinien handelt es sich um *disembodied*-Allele. Die beiden Gene *scratch* und *masquerade* liegen aber etwa 170 kb weit auseinander. Außerdem ist das Hybridisierungsmuster von *dib*^{P1} verschieden von dem von A72.

3.8.3 Lokalisation und Orientierung der P-Elemente

Um die Lokalisation und Orientierung der P-Element-Insertion A72 zu überprüfen, wurden zwei genomische Primer auf verschiedenen Seiten der Insertion (*scrt3´*und *scrt5´*) gewählt. Für das P-Element wurden die Primer *Plac1* für das 5´-Ende bzw. *Pry2* für das 3´-Ende ausgesucht. Für die Primerkombinationen *scrt5´-Plac1* und *scrt3´-Pry2* konnten an genomischer DNA des Stammes *A72* Fragmente der erwarteten Größen von 0,5 und 0,3 kb amplifiziert werden. Somit bestätigen sich Lokalisation und Orientierung der Insertion *A72*.

Mit der Primerkombination *scrt5´-Pry2* konnte ebenfalls ein ca. 0,4 kb großes Fragment an genomischer *A72*-DNA amplifiziert werden. Dies bedeutet, daß ca. 100 bp oberhalb der Insertion 3´-Reste eines P-Elementes liegen. Ein Fragment gleicher Größe konnte auch an genomischer dib^{P1}-DNA nachgewiesen werden. Ein entsprechendes 5´-Ende eines P-Elementes in dieser Region konnte durch PCR nicht nachgewiesen werden. Unter Verwendung eines nach Sequenzdaten des *Sac1-plasmid rescues* gewählten Primers (*dib1-3´*) und des Primers *Pry2* konnte durch PCR an genomischer dib^{P1}-DNA ein entsprechendes Fragment amplifiziert werden. Durch diese Ergebnisse wird die Authentizität der dib^{P1}-*plasmid rescues* bestätigt.

Mit Hilfe zweier Primer im 3´-Bereich von *mas* (*mas3´*, *mas5´*) und P-Element-Primern konnte die Lokalisation der Insertion dib^{P2} aus den Sequenzdaten bestätigt werden. Sie liegt, in *mas*-Transkriptionsrichtung gesehen, in 3´-5´-Orientierung. Zudem konnte mit den genomischen Primern *scrt3´*, *scrt5´* und P-Element-Primern *Plac1*, *Pry2* die Originalinsertion *A72* nachgewiesen werden. Bei dib^{P2} handelt es sich also um eine Doppelinsertion.

Durch PCR mit den Primern *BAC686rev*, *BAC9300rev* und *BAC709* und P-Element-Primern wurde die P-Element-Insertion dib^{P1} 2,8 kb unterhalb der *mas*-Transkriptionseinheit in 5´-3´-Orientierung kartiert. Da das dib^{P1}-*PstI-rescue*-Fragment mit gleichen Fragmenten aus genomischer DNA von *A72* und dib^{P2} hybridisiert, stammt das *rescue*-Fragment jedoch aus dem Insertionsbereich von *A72*.

In einem Bereich von ca. 11kb unterhalb des Gens *masquerade* ist keine weitere Transkriptionseinheit feststellbar (Murugasu-Oei *et al.,* 1996). Auch der Vergleich dieser Region mit Datenbanken zeigt keine Homologien zu bekannten Genen. In der Datenbank des *Berkeley Drosophila Genome Projects* sind keine cDNA-Klone in dieser Region bekannt.

3.9 *masquerade* ist allelisch zu *disembodied*

Das Gen *masquerade (mas)* wurde mittels *in situ*-Hybridisierung nach 64B kartiert (Murugasu-Oei *et al*., 1995). Durch Einschluß in die Defizienz *Df(3L)GN34* (63E6-9; 64A8-9) und Ausschluß aus der Defizienz *Df(3L)C175* (64A3; A6) konnte die Lokalisation von *mas* auf 64 A6-9 festgelegt werden.

Es gibt vier bekannte *masquerade*-Allele. mas^{64B}, die Original-P-Element-Insertion, kartiert ca. 500 bp unterhalb der *mas*-Transkriptionseinheit. Ferner gibt es drei Exzisionsallele, mas^{154}, mas^{x124} und mas^{xs76}. Die Exzisionsallele stellen kleine Deletionen dar, mas^{x124} und mas^{xs76} entfernen die ganze Transkriptionseinheit, mas^{154} betrifft nur den C-terminalen

Bereich der *mas*-Transkriptionseinheit und trägt noch eine weitere P-Element-Insertion (Murugasu-Oei *et al*., 1995, siehe Anhang).

Die *masquerade*-Allele wurden auf ihr Komplementationsverhalten bezüglich *disembodied* getestet. mas^{64B} ist eine vitale P-Element-Insertionslinie, die übrigen *mas*-Allele sind letal übereinander.

Das Allel mas^{154} komplementiert kein getestetes *dib*-Allel. mas^{x124} stellt eine relativ große Defizienz dar und komplementiert die beiden P-Element-induzierten Allele nicht, ist aber vital über EMS-induzierte *dib*-Allele. Das Allel mas^{xs76}, das eine komplexe Defizienz darstellen soll, lebt über alle *dib*-Allele.

	dib^{EMS}	dib^{P1}	dib^{P2}
mas^{154}	letal	letal	letal
mas^{x124}	vital	letal	letal
mas^{xs76}	vital	vital	vital

Tabelle 6: Zusammenfassung des Komplementationsverhaltens von *dib* und *mas.*

Die molekulare Analyse hat gezeigt, daß die P-Element-Insertion dib^{P2} in der Nähe der P-Element-Insertion mas^{64B} liegt, und zwei *mas*-Allele komplementieren *dib*-Allele nicht. Zur Überprüfung, ob es sich um ein einziges Gen handelt, wurde der meiotische Abstand zwischen der P-Element-Insertion mas^{64B} und dem EMS-induzierten *dib*-Allel *E2-70* bestimmt. Unter 1642 ausgezählten Fliegen fand sich keine Rekombinante: Der meiotische Abstand beträgt damit weniger als 0,06 cM. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß beide Gene identisch sind oder zumindest direkt benachbart liegen. Der Abstand zwischen *dib* und der zusätzlichen P-Element-Insertion des Allels mas^{154} beträgt 0,24 cM (± 0,14, 3 Rekombinanten in 1257 ausgezählten Fliegen).

3.10 Phänotypische Analyse von *masquerade*

mas^{64B} ist eine vitale P-Element-Insertionslinie. Sie zeigt keine embryonalen Defekte und weist keine spezifische ß-Galaktosidase-Expression auf. Die übrigen drei *mas*-Allele führen zu embryonaler Letalität.

Die beschriebenen Ausfallphänotypen für *masquerade* (Murugasu-Oei *et al*., 1996) können nur zum Teil bestätigt werden. Die einzelnen *mas*-Allele zeigen unterschiedliche und leicht variable Ausfallphänotypen.

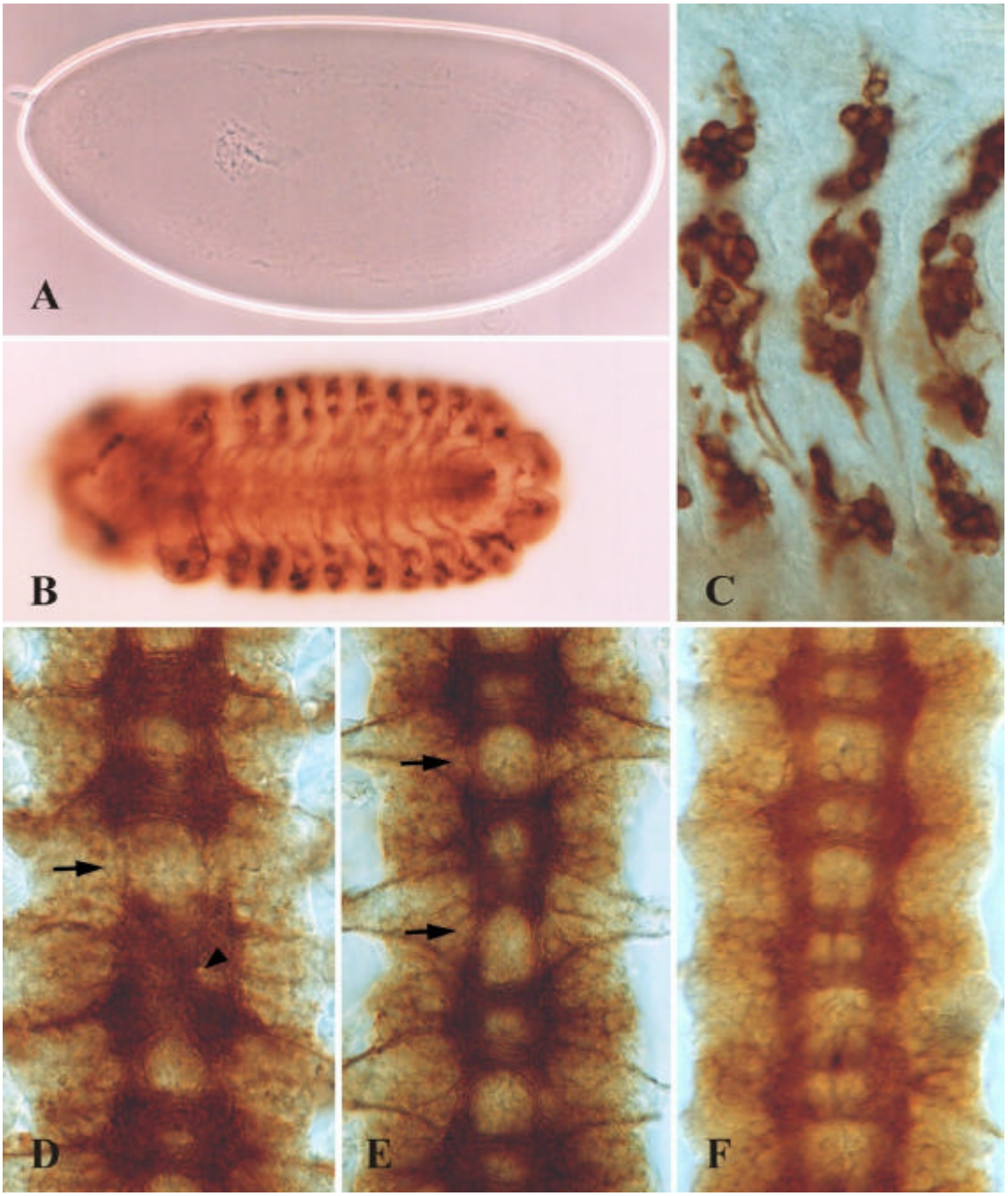


Abb. 30 Die *masquerade*-Phänotypen A) Kutikulapräparation eines mutanten *mas*^{154}-Embryos. B) Ventralansicht eines *mas*^{154}-Embryos. Die Morphologie entspricht der von Mutanten der *ttk*-Gruppe (vgl. Abb. 10, 11). C) PNS eines *mas*^{154}-mutanten Embryos, markiert mit mAb 22C10. Die Anordnung der Neurone ist gestört. D-F) Das ZNS verschiedener *mas*-Allele, jeweils mit mAb BP102 markiert. D) *mas*^{154}-mutanter Embryo, die Konnektive sind verdünnt (Pfeil), die Kommissuren erscheinen „fusioniert“. Eine Kommissur verläuft zwischen zwei Neuromeren (Pfeilspitze). E) Das Allel *mas*^{xs76} zeigt verdünnte Konnektive (Pfeile), die Kommissuren erscheinen leicht „fusioniert“. F) Beim Allel *mas*^{x124} sind die Axontrakte verdünnt.

In Kutikulapräparationen des *mas*-Allels *x124* zeigt sich kein Unterschied zum Wildtyp, bei dem Allel *xs76* sind die Zähnchenbänder dünner als beim Wildtyp. Das *mas*-Allel *154* führt zu einem Kutikulaphänotyp, der identisch zu dem von *dib* ist, die Kutikula differenziert nicht

mehr, und es entwickeln sich keine Mundhaken (Abb. 30A).

Im PNS *mas*^{154}-mutanter Embryonen kommt es zur Störung der Anordnung der Neurone (Abb. 30C). Das Allel *mas*^{154} zeigt im ZNS einen „fusionierten Kommissuren"-Phänotyp. Die Konnektive sind unterbrochen oder stark verdünnt. Im abdominalen Bereich kommt es oft zur Fusion zweier Neuromere (Abb. 30D). Auch das Allel *mas*^{xs76} zeigt einen „fusionierten Kommissuren"-Phänotyp, allerdings schwächer als beim Allel *154* (Abb. 30E). Die Konnektive sind dünner als im Wildtyp, und der Abstand einzelner Neuromere ist vergrößert. Das Allel *x124* zeigt dünnere Axontrakte als der Wildtyp (Abb. 30 F).

mas^{154} zeigt die gleichen Veränderungen der Gesamtmorphologie, wie sie für die *disembodied* beschrieben wurden (z. B: eingefallenes ZNS, Abb. 30B.). Auch treten vergleichbare Muskeldefekte auf.

Das Allel *mas*^{154} zeigt in den untersuchten Aspekten einen ähnlichen Ausfallphänotyp wie *dib*-Allele. Die beiden übrigen *mas*-Allele unterscheiden sich im Phänotyp vom Allel *mas*^{154}.

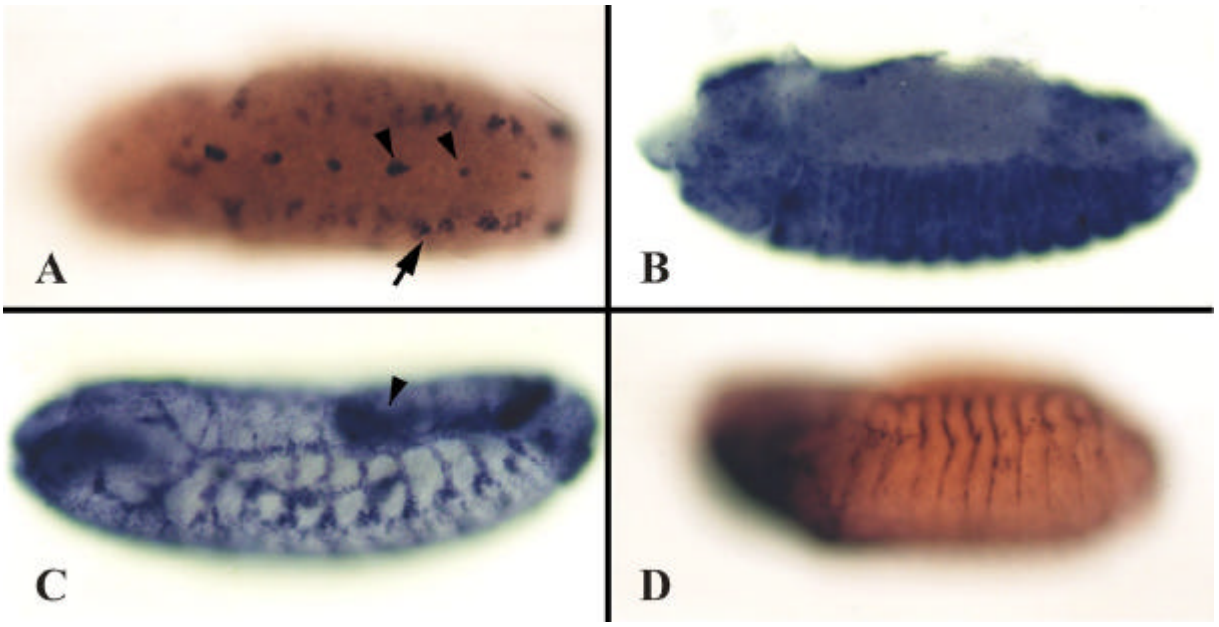


Abb. 31 Expressionsmuster der *mas*-RNA *in situ*-Hybridisierungen mit einer *mas*-cDNA-Sonde an wildtypischen Embryonen. A) Im Stadium 12 wird *mas* in Zellen der Mittellinie (Pfeilspitzen) und in den Muskelanheftungsstellen (Pfeil) exprimiert. B) *mas*-Expression in der Epidermis. C) Ab Stadium 14 wird *mas* in den Tracheen und später im Hinterdarm (Pfeilspitze) exprimiert. D) In *dib*^{P1}-mutanten Embryonen ist keine *mas*-Expression vorhanden.

Um zu untersuchen, ob die *mas*-Expression in den P-Element-induzierten *dib*-Allelen *P1* und *P2* betroffen ist, wurden *in situ*-Hybridisierungen mit einer DIG-markierten *mas*-cDNA-Sonde durchgeführt. Im Wildtyp ist *masquerade* in der Epidermis, dem Tracheensystem, den Muskelanheftungsstellen sowie wenigen Zellen im ZNS exprimiert (Abb. 31A-C, siehe

Murugasu-Oei *et al*., 1995). In Embryonen, die homozygot für die P-Element-Insertionen *dib*^{P1} *und dib*^{P2} sind, ist diese Expression nicht mehr nachweisbar (Abb. 31D).

3.11 Rettung des *dib*-mutanten Phänotyps durch *mas*-Expression

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen legen nahe, daß es sich bei *disembodied* und *masquerade* um Mutationen im gleichen Gen handelt. Zwei von drei letalen *mas*-Allelen komplementieren *dib*-Allele nicht. *dib*$^{E2\text{-}70}$ und *mas*^{64B} lassen sich durch meiotische Rekombination nicht trennen, das Allel *mas*^{154} zeigt den gleichen Ausfallphänotyp wie *dib*-Allele, und in den P-Element-induzierten *dib*-Allelen ist *mas*-Expression nicht mehr nachweisbar.

Zur weiteren Analyse der allelischen Beziehung wurde versucht, den *dib*-mutanten Phänotyp durch ektopische *mas*-Expression zu retten.

Daher wurden transgene UAS*mas*-Fliegen hergestellt. Es konnten sechs transgene Stämme aus drei unabhängigen Ansätzen etabliert werden. Das UAS*mas*-Konstrukt führt nach Einkreuzen einer *single-minded*-Gal4-Linie zu deutlicher *mas*-Expression im entsprechen Muster, wie durch *in situ*-Hybridisierungen an Embryonen mit einer DIG-markierten *mas*-Sonde nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Die Gal4-Aktivatorlinien 512 (*rho*-Gal4) und *sim*-Gal4 sowie eine *UASmas*-Effektorlinie wurden mit dem *dib*-Allel *E2-70* rekombiniert und gegeneinander gekreuzt. Die resultierenden Embryonen wurden phänotypisch untersucht.

dib$^{E2\text{-}70}$-mutante Embryonen zeigen im Stadium 16 im Nervensystem einen deutlichen „fusionierten Kommissuren"-Phänotyp (Abb. 32A) und eine drastische Veränderung der Gesamtmorphologie (s.o.). Die Expression von MAS mit Hilfe einer *sim*- oder *rho*-Gal4-Linie in *dib*–mutanten Embryonen führt zu keiner Veränderung der defekten Gesamtmorphologie. Im Nervensystem kommt es zur Trennung der Kommissuren (Abb. 32 B, C). Der *dib*-mutante Phänotyp wird also partiell gerettet.

Die Kutikula *dib*-mutanter Embryonen zeigt keine differenzierte Strukturen (Abb. 8D). Nach Expression von UAS*mas* mit einer *sim*-Gal4-Linie kommt es im ventralen Bereich wieder zur Differenzierung der Kutikula, es bilden sich Zähnchen (Abb. 32D, E). Der mutante Phänotyp wird zum Wildtyp hin revertiert. Dieser Effekt ist nicht zellautonom, da der gerettete Bereich 4-5 Zellreihen breit ist.

Diese Resultate zeigen, daß *masquerade* und *disembodied* identisch oder zumindest funktionell ersetzbar sind.

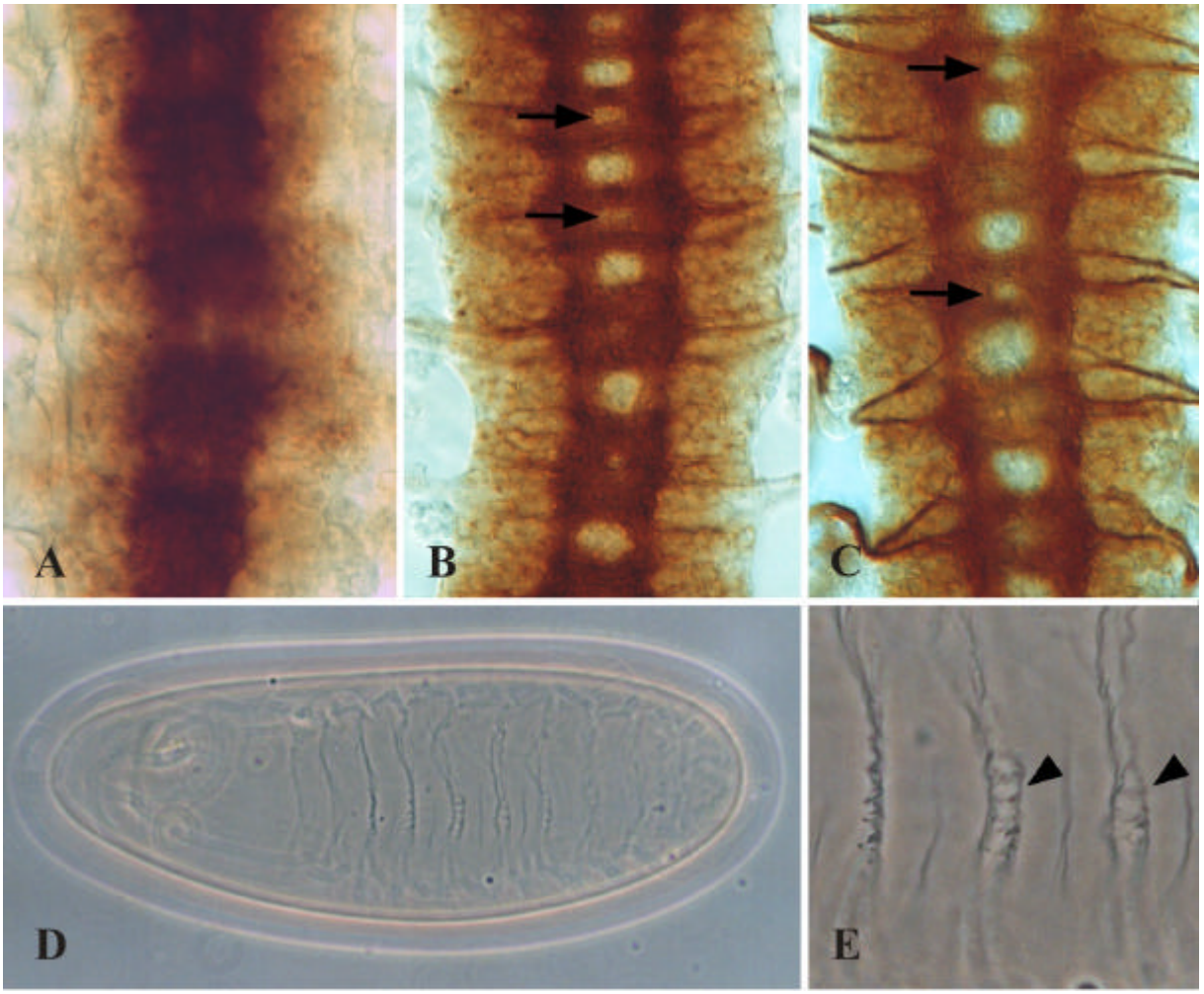


Abb. 32 Rettung des *dib*-mutanten Phänotyps durch ektopische *mas*-Expression A) ZNS eines $dib^{E2\text{-}70}$-mutanten Embryos. Die Kommissuren sind deutlich „fusioniert“. Expression von UAS*mas* im $dib^{E2\text{-}70}$-mutanten Hintergrund mit B) einer *sim*-Gal4-Linie oder C) einer *rho*-Gal4-Linie. Die Kommissuren werden getrennt (Pfeile). D) Kutikula-Präparation eines *sim*-Gal4, $dib^{E2\text{-}70}$/ UAS*mas*, $dib^{E2\text{-}70}$-Embryos. Es zeigt sich der *dib*-mutante Phänotyp. E) Vergrößerung von D); im ventralen Bereich entwickeln sich Zähnchen (Pfeilspitzen).

3.12 Überexpression von MAS

Die Expression von MAS im ZNS führt zu einem „fusionierte Kommissuren“-Phänotyp, und die Konnektive sind stark verdünnt. Um diesen Effekt zu erzielen, reicht es, MAS in den Zellen der Mittellinie zu exprimieren, da er bei Verwendung von *sim*- bzw. *sli*-Gal4-Aktivatorlinien auftritt (Abb. 33C). Wird MAS in ZNS-Neuronen z.B. durch Verwendung von *sca*-, *rho*- oder *Kr*-Gal4-Linien exprimiert, zeigt sich außer den „fusionierten Kommissuren“ und der Reduktion der Konnektive eine Verbreiterung des Abstands der Neuromere (Abb. 33D).

Das Auswachsen der Nerven ins PNS ist nicht betroffen (nicht gezeigt). Die Anordnung der PNS-Neurone ist gestört, sie kommen oft an abnormen Positionen zu liegen. Vereinzelt fehlen Neurone (Abb. 33A). Die Muskeln weisen Anheftungsdefekte auf (Abb. 33B).

Die Tracheen scheinen sich normal zu entwickeln.

Überexpression von *mas* im Komplexauge mit Hilfe einer *sevenless*-Gal4-Linie führt zu keiner sichtbaren Veränderung, das Auge erscheint wildtypisch (nicht gezeigt).

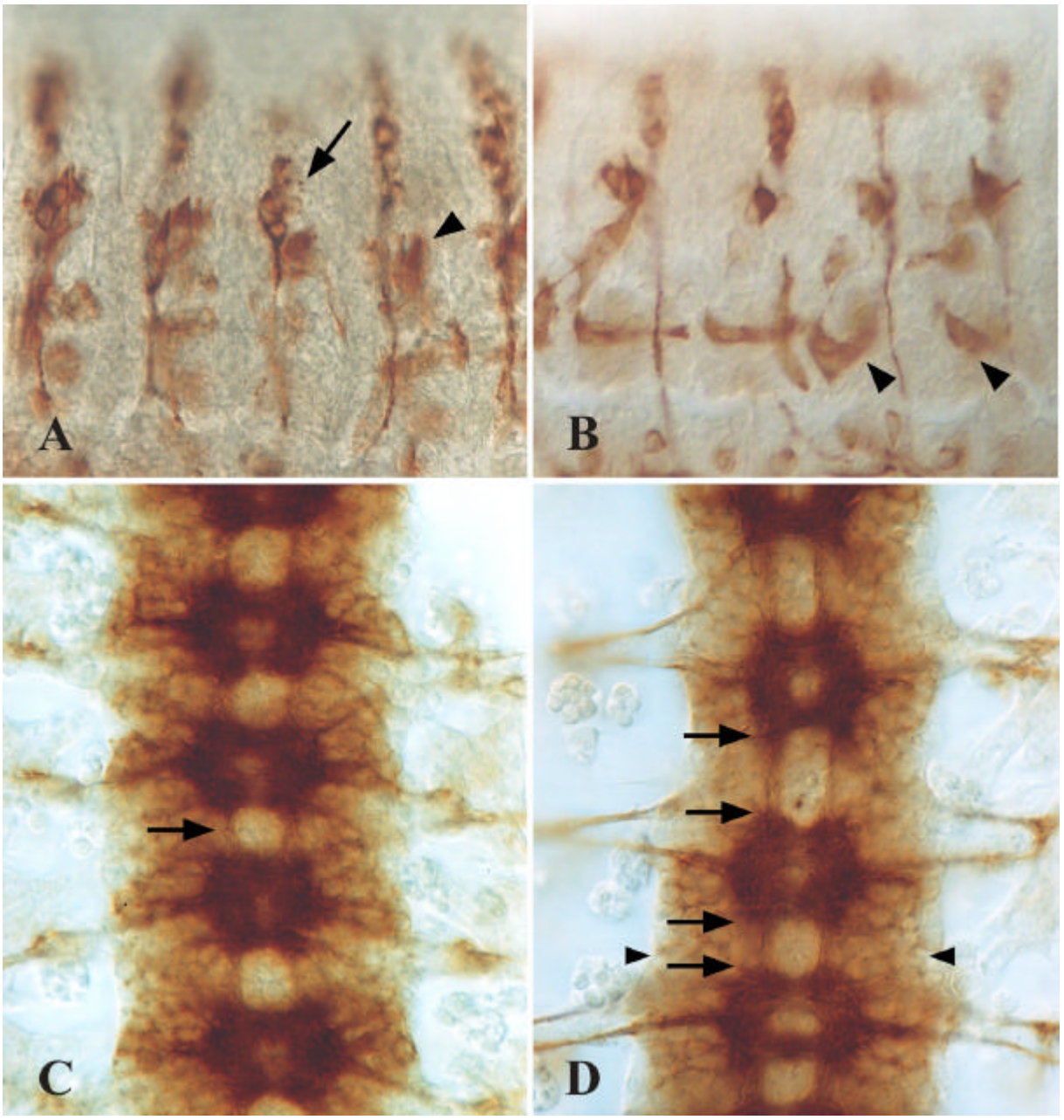


Abb. 33 Überexpression von *mas* A) Überexpression von *UASmas* mit einer *Kr*-Gal4-Linie. Im PNS kommt es zu variablen Organisationsdefekten. Das laterale Cluster ist nach ventral verschoben (Pfeil), einzelne Neurone Fehlen (Pfeilspitze). B) Überexpression von *mas* verursacht Muskelanheftungsdefekte (Pfeilspitzen).
C) Expression von UAS*mas* in der Mittellinie mit einer *sim*-Gal4-Linie führt zu „fusionierten Kommissuren“ und reduzierten Konnektiven. D) Die Expression von UAS*mas* in anderen Bereichen des ZNS (hier mir *Kr*-Gal4) verzögert die Kondensation des ZNS, der Abstand der Neuromere ist größer als im Wildtyp (Pfeile). Die Pfeilspitzen markieren die hintere Grenze der *Kr*-Expressionsdomäne. Außerhalb der Expressionsdomäne haben die Konnektive normale Dicke und der Abstand der Neuromere ist normal.

4. Diskussion

Im embryonalen ZNS von *Drosophila* gibt es zwei Arten von Gliazellen, die lateralen und die Mittelliniengliazellen. Sie unterscheiden sich durch ihre Herkunft und die Expression molekularer Marker. Die lateralen Gliazellen entwickeln sich aus dem ventralen Neuroektoderm. Sie sind für die axonale Wegfindung im ZNS und das Überleben von Neuronen wichtig. Defekte in diesen Zellen führen zu Brüchen in den Konnektiven (Hidalgo *et al*., 1995; Hidalgo und Booth, 2000; Booth *et al*., 2000). Ihre Entwicklung steht unter der Kontrolle des Schaltergens *glial cells missing (gcm)* (Hosoya *et al*., 1995; Jones *et al*., 1995; Vincent *et al*., 1996). *gcm* führt zur Aktivierung gliazellspezifischer Gene wie *repo* und *pointedP1*. Diese leiten die gliale Differenzierung ein (Xiong *et al*., 1994; Klaes *et al*., 1994; Halter *et al*., 1995; Campbell *et al*., 1994; Giesen *et al*., 1997).

Die Mittelliniengliazellen entwickeln sich unabhängig von den lateralen Gliazellen. Sie entstehen aus der ventralen Mittellinie des Embryos. Ihre Entwicklung hängt von der Aktivierung des EGF-Rezeptors und der nachgeschalteten Signaltransduktionskaskade ab. Diese führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors POINTEDP2, der die gliale Differenzierung einleitet (Klämbt, 1993; Klaes *et al*., 1994; Scholz *et al*., 1997). Die Mittelliniengliazellen haben zwei wichtige Funktionen bei der Nervensystementwicklung. Zunächst ziehen sie durch Expression von NETRINEN die kommissuralen Axone an und erlauben ihr Kreuzen der Mittellinie (Harris *et al*., 1996; Mitchell *et al*., 1996; Tear *et al*., 1996; Kidd *et al*., 1998b). Später sind sie für die Trennung der Kommissuren verantwortlich, die sich zunächst in enger räumlicher Nähe entwickeln (Klämbt *et al*., 1991). Defekte in den Mittelliniengliazellen verhindern die Trennung der Kommissuren und lassen sich an dem „fusionierten Kommissuren“-Phänotyp erkennen.

4.1 Die Funktion von *tramtrack* bei der Gliazellentwicklung

Beide Arten von ZNS-Gliazellen haben unterschiedlichen Ursprung und entwickeln sich unter dem Einfluß verschiedener Gene. Sie exprimieren jedoch alle TRAMTRACKp69. Der Ausfall von TRAMTRACK (TTK) führt zu Defekten in allen Gliazellen. TTK ist also für deren korrekte Differenzierung notwendig. Durch Überexpressionsstudien konnte gezeigt werden, daß TTKP69 in der Lage ist, neuronale Differenzierung zu unterdrücken (Li *et al*., 1997; Giesen *et al*., 1997). Die gliale Entwicklung ist davon nicht betroffen.

Die Gene *pointed* und *tramtrack* sind für die korrekte gliale Entwicklung notwendig. Die Analyse von Doppelmutanten der beiden Gene sowie von Koexpressionsstudien zeigen, daß

sie unabhängig voneinander wirken. *ttk* wird verschieden von *pointed* reguliert, da seine Expression über den *Notch*-Signalweg gesteuert wird (Guo *et al*., 1996).

Diese Resultate führten zur Erstellung eines dualen Modells der Gliazellentwicklung (Abb. 34). Die Wirkung von Schaltergenen wie *gcm* in den lateralen Gliazellen oder *faint little ball*, das den EGF-Rezeptor kodiert (Zak *et al*., 1990), in den Mittelliniengliazellen führt zur Aktivierung von Genen wie *pointed (pnt)* und *repo*, die die gliale Differenzierung einleiten. Gleichzeitig wird durch *ttk* die Expression neuronaler Gene und damit die neuronale Differenzierung verhindert. Das bedeutet, daß für den Differenzierungsprozeß sowohl aktivierende als auch reprimierende Prozesse notwendig sind. Dies scheint wichtig zu sein, da sich neuronale und gliale Zellen teilweise aus gleichen Vorläuferzellen entwickeln.

Bei der Repression neuronaler Gene während der Gliazellentwicklung scheint es sich um einen generellen Prozeß zu handeln, da auch aus anderen Organismen ähnlich wirkende Gene bekannt sind, z.B. lin-26 aus *C. elegans* oder das Vertebratenprotein REST/NRSF (Labouesse *et al*., 1996; Chong *et al*., 1995; Schoenherr und Anderson, 1995; Schoenherr *et al*., 1996; Chen *et al*., 1998)

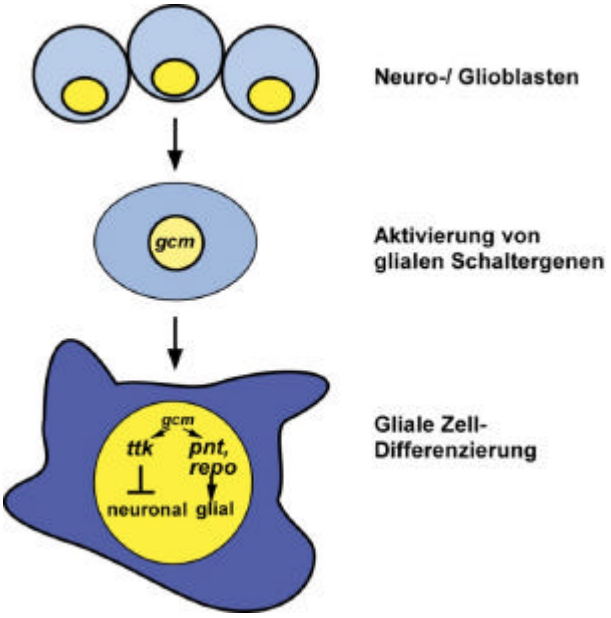


Abb. 34 Duales Modell der Gliazellentwicklung Die schematische Darstellung der Differenzierung lateraler Gliazellen. Die Wirkung glialer Schaltergene (*gcm* für die lateralen Gliazellen) führt zur Aktivierung von Differenzierungsgenen wie *pnt* oder *repo*. Gleichzeitig wird durch Gene wie *ttk* neuronale Entwicklung verhindert.

4.2 Der Funktionsmechanismus von *tramtrack*

tramtrack wirkt während der Entwicklung als transkriptioneller Repressor (z.B. Harrison und Travers, 1990; Read *et al*., 1992; Xiong und Montell, 1993, Lai *et al*., 1997). Der Vergleich mit *ttk*-Homologen aus anderen *Drosophila*-Spezies und anderen POZ-Proteinen (Lintermann *et al*., 1998) zeigt zwei besonders konservierte Domänen auf, die POZ-Domäne und den Bereich der Zink-Finger. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß beide Domänen für ein funktionelles Protein notwendig sind.

Die Zink-Finger sind ein DNA-bindendes Motiv. Über sie scheint TTK seine Zielgene zu erkennen. Die POZ/BTB-Domäne vermittelt Protein-Protein-Wechselwirkungen. Sie ist zur Homo- und Heterodimerisierung fähig (Bardwell und Treisman, 1994).

Punktmutationen in der POZ-Domäne führen zu deren Funktionsunfähigkeit. Es wurde schon für verschiedene Aminosäure-Austausche in der POZ-Domäne beobachtet, daß sie die Fähigkeit zur Dimerisierung zerstören (Chen *et al*., 1995). Dieser Effekt ist auch für andere Proteininteraktionsdomänen beschrieben, z.B. führt der Austausch einzelner Aminosäuren bei REST zur Störung der Proteinwechselwirkungen und damit zur Funktionsunfähigkeit des Proteins (Tapia-Ramirez *et al*., 1997).

Mit Hilfe des chimären PEP-Proteins konnte nachgewiesen werden, daß die reprimierende Funktion von TTK über die POZ-Domäne ausgeübt wird. Ähnliche Untersuchungen an BCL6 zeigen gleiche Ergebnisse (Seyfert *et al*., 1996). Auch dort konnte gezeigt werden, daß die POZ-Domäne für die transkriptionelle Repression verantwortlich ist. Die Fusion der POZ-Domäne mit einem DNA-bindenden Motiv bietet die Möglichkeit, den Ausfallphänotyp verschiedener Transkriptionsfaktoren zu simulieren, selbst wenn dieser nicht bekannt ist.

Die POZ-Domäne von TTK dimerisiert mit der von GAGA, einem chromatin-modifizierendem Protein (Bardwell und Treisman, 1994). Da weitere POZ-Proteine als chromatinbindend oder –modifizierend beschrieben worden sind (z.B. E(Var)3-93D, Dorn *et al*., 1993), könnte die transkriptionsreprimierende Wirkung von TTK über die Bindung solcher Cofaktoren durch eine Veränderung der Chromatinstruktur vermittelt werden.

Ein Hinweis darauf, daß die reprimierende Funktion von *tramtrack* durch Cofaktoren vermittelt wird, ergibt sich aus den Untersuchungen von Yu *et al*., 1999. Dort konnte in einem modifizierten Hefe-Zwei-Hybrid-Versuchsansatz eine transkriptionsaktivierende Wirkung von *tramtrack* nachgewiesen werden. Dies deutet auf ein Fehlen wichtiger Cofaktoren in der Hefe hin, die in *Drosophila* die reprimierende Funktion von *tramtrack* ausführen.

Es gibt zahlreiche Transkriptionsfaktoren, die ähnlich wie TRAMTRACK wirken, z.B. lin-26 in *C. elegans* oder die Vertebratenproteine HIC-1 (Deltour *et al*., 1999), LAZ3/BCL6

(Dhordain *et al*., 1997) oder C2H2-171 (Becker *et al*., 1997). Bei vielen dieser Faktoren handelt es sich um POZ-Proteine, die Corepressoren wie SMRT oder SIN3 binden. Diese führen durch Interaktion mit Histon-Deacetylasen zu einer Veränderung der Chromatinstruktur. Keiner der reprimierend wirkenden Faktoren weist jedoch eine Sequenzhomologie zu TRAMTRACK auf, die Ähnlichkeiten beschränken sich auf die funktionelle Ebene.

Einer dieser Transkriptionsfaktoren ist REST/NRSF (*RE1-silencing transcription factor/ neural-restrictive silencing factor*). Er ist in nicht-neuronalen Zellen exprimiert und dient der Repression neuronaler Gene wie dem TypII-Natrium-Kanal (Chong *et al*., 1995; Schoenherr und Anderson, 1995; Schoenherr *et al*., 1996; Chen *et al*., 1998). Die reprimierende Wirkung wird durch einen Corepressor, CoREST, ausgeübt (Andres *et al*., 1999). Dieser besitzt zwei SANT-Domänen, wie sie auch beim Corepressor SMRT vorkommen. Für das *Drosophila*-Homolog von CoREST (dCoREST) konnte gezeigt werden, daß es mit TRAMTRACK interagiert (J. Dallman, pers. Mitteilung). Diese Resultate führen zu dem in Abbildung 35 gezeigten Modell der Genrepression durch TTK.

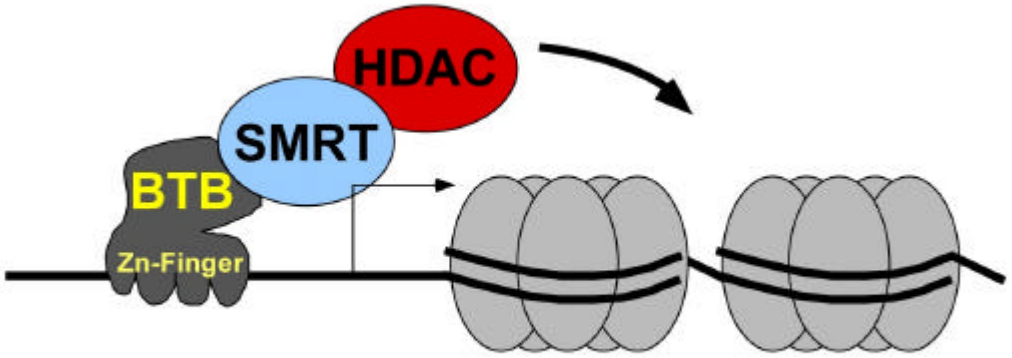


Abb. 35 Funktionsmechanismus der Genrepression von BTB/POZ-Transkriptionsfaktoren Nach DNA-Bindung durch die Zink-Finger rekrutieren die Transkriptionsfaktoren über die BTB/POZ-Domäne Cofaktoren wie SMRT. Diese interagieren mit Histon-Deacetylasen. Die Deacetylierung der Histon-Proteine führt zu einer stärkeren Histon-DNA-Wechselwirkung und damit zur Repression von Genaktivität. nach Xu *et al*., 1999.

4.3 Die *tramtrack*-Gengruppe: Corepressoren von TRAMTRACK?

Bei den Genen der *tramtrack*-Gruppe handelt es sich um eine gemeinsame Wirkgruppe. Sie umfaßt die Gene *disembodied, rippchen, phantom, shade, shadow, spook, shroud* und *tramtrack*. Der Ausfall dieser Gene betrifft in allen Fällen die gleichen Gewebe. Er führt zu identischen Kutikula-Phänotypen, und im Nervensystem und den Muskeln treten ähnliche

Defekte auf. Dies deutet auf eine gleiche Funktion dieser Gene hin. Auch das Fehlen neuer Phänotypen in Doppelmutanten innerhalb der Gruppe spricht für eine einzige Wirkgruppe.
Schließlich wurden genetische Interaktionen innerhalb der *tramtrack*-Gruppe nachgewiesen. Diese Befunde machen es wahrscheinlich, daß die Gene der *tramtrack*-Gruppe gleiche Prozesse betreffen, eventuell handelt es sich sogar um direkte Cofaktoren von *ttk*.

Bei genauerer Betrachtung der Phänotypen läßt sich die Gruppe in zwei Untergruppen unterteilen. Der Funktionsverlust von *tramtrack* führt im PNS zu einer neuronalen Hyperplasie und zu einer Deregulation der Expression des neuronalen Antigens 22C10. Die Gesamtmorphologie mutanter Embryonen bleibt aber im wesentlichen erhalten. Die übrigen Mitglieder der *tramtrack*-Gruppe zeigen davon leicht verschiedene Defekte. Besonders charakteristisch ist die Änderung der Gesamtmorphologie. Durch die Defekte in der somatischen Muskulatur scheint es den Embryonen nicht möglich zu sein, kontraktilen Kräften, evtl. bedingt durch die Kondensation des ZNS, Widerstand entgegenzusetzen.
Das Gen *haunted*, das nicht mit den übrigen Genen eingruppiert wurde, unterscheidet sich auch phänotypisch von diesen. Mutationen führen zwar zu einem gleichen Kutikula-Phänotyp, jedoch unterscheiden sich die übrigen beobachteten Defekte deutlich. Besonders typisch ist hier die verfrühte Kondensation des ZNS.
Die Mittelliniengliazellen (MLG) entwickeln sich aus 2 Mittellinienvorläuferzellen (Bossing und Technau, 1994). Diese teilen sich und bilden einen Pool von 8-12 Mittelliniengliazellen. Der Großteil dieser Zellen leitet die Apoptose ein. Dies führt zur Reduktion auf die wildtypische Anzahl von 2-4 Mittelliniengliazellen pro Segment (Sonnenfeld und Jacobs, 1995; Dong und Jacobs, 1997; Stemerdink und Jacobs, 1997). Alle Vorläuferzellen exprimieren den EGF-Rezeptor DER. Dessen Aktivität ist für die frühe Funktion der Mittelliniengliazellen, die Attraktion kommissuraler Axone, nicht notwendig. Die Reduktion auf die wildtypische Anzahl an Mittelliniengliazellen und deren Differenzierung hängt von der Aktivierung des EGF-Rezeptors und der Gene *pointed* und *argos* ab (Klämbt *et al*., 1991; Sonnenfeld und Jacobs, 1994; Golembo *et al*., 1996; Stemerdink und Jacobs, 1997).
Mutationen in den Genen der *ttk*-Gruppe beeinflussen nicht die Bildung der Kommissuren, lediglich ihre Trennung geschieht nicht mehr. Dies bedeutet, daß die Differenzierung der Mittelliniengliazellen betroffen ist. Dies führt normalerweise dazu, daß die Zellen Apoptose einleiten (Sonnenfeld und Jacobs, 1994). Mutationen in *tramtrack*, *phantom* und *rippchen* führen zu einer solchen Reduktion der Anzahl der Mittelliniengliazellen.

Einige Gene der *tramtrack*-Gruppe (*disembodied, shade, shadow, spook, shroud)* führen bei Ausfall zu zusätzlichen Gliazellen. Diese Zellen exprimieren gliaspezifische Marker (AA142, TTKP69). Sie sind dennoch nicht zur Trennung der Kommissuren fähig, also nicht ausdifferenziert. Allerdings sterben die Zellen nicht und sind bis zum Ende der Embryonalentwicklung vorhanden. Dies deutet auf eine Unterdrückung der Apoptose oder zusätzliche Zellteilungen hin. Diese müssen allerdings vor der Expression des Markers *AA142* stattfinden, da die ektopischen Gliazellen schon in frühen Embryonalstadien (Stadium 12/13) nachweisbar sind.

Der Ausfall von *rippchen* führt dazu, daß kommissurale Axone FASCICLINII exprimieren (Abb. 13E). Dieser Effekt scheint seine Ursache in den resultierenden Gliazelldefekten zu haben. Er tritt bei Mutationen in *roundabout* und *karussell,* aber auch bei der Überexpression von ARGOS auf (Seeger *et al*., 1993; Hummel *et al*., 1999b; Stemerdink und Jacobs, 1997).

Im PNS von Embryonen, die mutant für Gene der *ttk*-Gruppe sind, zeigen einige neuronale Zellen eine Koexpression der Marker ELAV und PROS. Während der Entwicklung der externen Sinnesorgane zeigt die PIII-Zelle, aus der sich Neuron und Hüllzelle entwickeln, diese Koexpression (Reddy und Rodrigues, 1999b). Im sich entwickelnden Neuron scheint die PROS-Expression nicht heruntergeregelt zu werden. Die Expression von *pros* wird durch *Notch* negativ reguliert (Reddy und Rodrigues, 1999a). Dies könnte auf eine Störung des *Notch*-Signalweges in Mutationen der *ttk*-Gene hindeuten.

Die gefundenen Resultate lassen die Aufstellung einiger formeller epistatischer Beziehungen innerhalb der *ttk*-Gruppe zu. *tramtrack* scheint epistatisch zu *disembodied* zu sein und negativ reguliert zu werden. Die Gene *rippchen, shade, shadow* und *spook* scheinen negativ durch *tramtrack* reguliert zu werden. Der Ausfall von *disembodied* hat allerdings keinen Einfluß auf TTK-Expression. Die Gene der *ttk*-Gruppe ließen sich in keinen der vorher untersuchten Signaltransduktionswege einordnen, allerdings zeigen Doppelmutanten mit *Notch* nur diesen Ausfallphänotyp (Daten nicht gezeigt), ein weiterer Hinweis auf eine solche Interaktion.

4.4 Ist *masquerade* allelisch zu *disembodied?*

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, daß es sich bei *disembodied (dib)* und *masquerade (mas)* um das gleiche Gen handelt:

Die P-Element-Insertion dib^{P2}, ein letales *dib*-Allel, kartiert in die gleiche Region wie die Insertion mas^{64B}. Der Abstand EMS-induzierter *dib*-Allele zur Insertion mas^{64B} ist nahezu Null, da sich keine Rekombinanten herstellen ließen.

Das *mas*-Allel *154* komplementiert kein getestetes *dib*-Allel, sowohl EMS-induzierte als auch die beide P-Element-induzierten Allele. Die im Allel mas^{154} vorhandene P-Element-Insertion scheint nicht die Ursache dafür zu sein, da ihr Abstand zum Gen *disembodied* 0,24 cM beträgt. Das Allel mas^{x124} komplementiert die P-Element-induzierten *dib*-Allele nicht.
Das Gen *mas* ist die einzige Transkriptionseinheit in einem Bereich von 20 kb um die Insertion mas^{64B} herum, innerhalb von 11 kb unterhalb von *mas* wurde keine weitere Transkriptionseinheit entdeckt (Murugasu-Oei *et al*., 1995; Murugasu-Oei *et al*., 1996).
Das Allel mas^{154} zeigt einen *dib*-ähnlichen Ausfallphänotyp: Die Kutikula differenziert nicht, im ZNS gibt es einen „fusionierten Kommissuren"-Phänotyp, das PNS zeigt die gleichen Positionierungsdefekte wie *dib*-mutante Embryonen. Es treten die identischen Muskeldefekte auf und mutante Embryonen zeigen die gleiche Änderung der Gesamtmorphologie.
In den beiden P-Element-induzierten *dib*-Allelen ist mas-Expression nicht mehr nachweisbar.
Die ektopische Expression der *mas*-cDNA ist in der Lage, den *dib*-mutanten Phänotyp partiell zu retten.

Ein nicht geklärter Widerspruch ist die unterschiedliche Kartierung der beiden Gene *dib* und *mas*. *dib* wurde auf 64A3 kartiert (Harrison *et al*., 1995), distal der Gene *ras* und *rop*. *mas* liegt etwa 25 kb proximal dieser beiden Gene (molekulare Daten des *Berkeley Drosophila Genome Projects*). Die genetische Kartierung von *dib* und den anderen Genen dieser Region wurde über das Komplementationsverhalten bezüglich verschiedener Defizienzen vorgenommen. Die relative Anordnung der Gene erfolgte aufgrund dieser Komplementationsdaten, eine Kartierung der Gene zueinander wurde nicht vorgenommen (Harrison *et al*., 1995). Die Komplementationsanalyse für *disembodied* wurde nur zum Teil wiederholt und bestätigt. Daher besteht die Möglichkeit einer Fehlkartierung von *disembodied*.

Das Gen *mas* wurde zuerst bei der Suche nach P-Element-Insertionen identifiziert, die chemosensorisches Verhalten beeinflussen. Es kodiert in seinem C-terminalen Bereich eine Serin-Protease, bei der das Serin des katalytischen Zentrums durch Glycin substituiert ist. Daher scheint sie nicht funktionell zu sein und könnte als Protease-Inhibitor dienen (Murugasu-Oei *et al*., 1995). Im N-terminalen Bereich befinden sich Signalsequenzen.
Die *mas*-Exzisionsallele deletieren unterschiedlich große Bereiche des Gens. mas^{154} deletiert nur den Protease-ähnlichen Bereich, mas^{x124} stellt eine größere Defizienz dar, und mas^{xs76} soll ebenso die komplette Trankriptionseinheit entfernen, aber ein Stück des 3´-UTR, in dem auch die P-Element-Insertionen mas^{64B} und dib^{P2} kartieren, belassen (Murugasu-Oei *et al*., 1995).

Im 5´-Bereich der Transkriptionseinheit befinden sich Signalsequenzen, die unter anderem für den Transfer des Proteins von der Epidermis oder den Mittellinienzellen auf die Axone der Konnektive zuständig sein können (Murugasu-Oei *et al*., 1996).
Phänotypisch zeigt sich eine negative Korrelation zur Größe der Deletion. Je größer der deletierte Bereich ist, desto schwächer ist der resultierende Phänotyp. Das Allel mas^{154} zeigt den stärksten Phänotyp. Dies legt nahe, daß zwar im 3´-Bereich die funktionelle Domäne des Gens liegt, die 5´-Region aber dennoch Einfluß auf den Phänotyp hat. Die Deletion dieses Bereiches führt zu einer Abschwächung des Phänotyps. Eine mögliche Erklärung ist die Wirkung von Genen, die diesen Phänotyp kompensieren können (Murugasu-Oei *et al*., 1996). Es ist möglich, daß die im Allel mas^{154} noch vorhandene Signalsequenz Transport-mechanismen blockiert, derer sich sonst diese potentiell kompensierenden Gene bedienen. Bei diesen Genen kann es sich um die übrigen Mitglieder der *ttk*-Gruppe handeln.
Schließlich ist nicht auszuschließen, daß die untersuchten *mas*-Allele nicht mehr identisch mit den publizierten sind, da sie teilweise nicht die beschriebenen Phänotypen zeigen. Eine Überprüfung dieser Daten wurde nicht vorgenommen.

Die zahlreichen Defekte, die mutante Embryonen der *ttk*-Gruppe aufweisen, deuten darauf hin, daß grundlegende Prozesse der Entwicklung gestört sind. Die Untersuchungen an *masquerade/ disembodied* zeigen, daß extrazelluläre Faktoren die Ursache dieser Phänotypen sein können. Eine Möglichkeit liegt in einer gestörten Wechselwirkung mit der extrazellulären Matrix (ECM). Die ECM beeinflußt viele zelluläre Prozesse wie Migration, Differenzierung oder Überleben (Schwartz und Baron, 1999; Howe *et al*., 1998; Edwards *et al*., 1998; Farelly *et al*., 1999; Lee und Streuli, 1999). Über zelluläre Rezeptoren, die Integrine, kann die ECM Einfluß auf intrazelluläre Prozesse nehmen.
Eine andere Möglichkeit ist direkte Interaktion von *mas/ dib* mit zellulären Rezeptoren, z.B. *Notch*. *tramtrack* ist ein Zielgen des *Notch*-Signalweges (Guo *et al*., 1996). *Notch* ist ebenfalls an der Myogenese und der Tracheenentwicklung beteiligt (Baker und Schubiger, 1996; Ruiz-Gomez und Bate, 1997; Steneberg *et al*., 1999; Llimargas, 1999; Ikeya und Hayashi, 1999). Die fehlende Herunterregulation von PROS in PNS-Neuronen und die doppelmutanten Phänotypen deuten ebenfalls auf eine solche Beziehung hin. Die Funktion der MASQUERADE-Proteinase kann z.B. in einem Schutz von NOTCH vor proteolytischer Spaltung bestehen.

4.5 Zusammenfassung

Die *tramtrack*-Gruppe umfaßt die Gene *disembodied, phantom, rippchen, shade, shadow, spook, shroud* und *tramtrack*. Diese definieren eine gemeinsame Wirkgruppe. Mutationen in diesen Genen führen zu zahlreichen Defekten während der Embryonalentwicklung.

tramtrack ist ein transkriptioneller Repressor, der unter anderem in Gliazellen exprimiert ist. Dort unterdrückt er neuronale Entwicklung. Die reprimierende Wirkung wird durch die POZ-Domäne, eine Protein-Interaktionsdomäne, vermittelt. Dafür ist die Bindung weiterer Cofaktoren nötig. Bei den übrigen Genen der *tramtrack*-Gruppe kann es sich um solche Faktoren handeln.

Die Gene *disembodied* und *masquerade* verhalten sich allelisch zueinander. *masquerade* kodiert eine proteolytisch inaktive Serin-Protease, die mit der extrazellulären Matrix oder Zelloberflächenproteinen interagiert. Dies legt die Vermutung nahe, daß wenigstens einige Gene der *tramtrack*-Gruppe durch inhibierende Interaktionen zelluläre Differenzierung beeinflussen.

5. Literaturverzeichnis

Andres, M. E., Burger, C., Peral, M. J., Battaglioli, E., Anderson, M. E., Grimes, J., Dallman, J., Ballas, N, und Mandel, G. (1999). CoREST: A functional corepressor required for regulation of neural-specific gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 9873-9878

Baker, R. und Schubiger, G. (1996). Autonomous and nonautonomous *Notch* functions for embryonic muscle and epidermis development in *Drosophila*. Development 122, 617-626

Bardwell, V. J. und Treisman, R. (1994). The POZ domain: A conserved protein-protein interaction motif. Genes Dev 8, 1664-1677

Bate, M. (1993). The mesoderm and its derivates. in The development of *Drosophila melanogaster*, Bate und Martinez-Arias, Cold Spring Harbor, NY, CSH Laboratory Press

Becker, K. G., Lee, I.. J., Nagle, J. W., Canning, R. D., Gado, A. M., Torres, R., Polymeropolous, M. H., Massa, P. T., Biddison, W. E. und Drew, P. D. (1997). C2H2-171: a novel human cDNA representing a developmentally regulated POZ domain/zinc finger protein preferentially expressed in brain. Int J Dev Neurosci.15, 891-899

Bier, E., Ackerman, L., Barbel, S., Jan, L. Y. und Jan, Y. N. (1988). Identification and characterisation of a neuron-specific nuclear antigen in *Drosophila*. Science 240, 913-916

Bilder, D. und Scott, M. P. (1995). Genomic regions required for morphogenesis of the *Drosophila* embryonic midgut. Genetics 141, 1087-1100

Booth, G. E., Kinrade, E. F. und Hidalgo, A. (2000). Glia maintain follower neuron survival during Drosophila CNS development. Development 127, 237-244

Bossing, T. und 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

Brand, A. H. und Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. Development 118, 401-415

Brown, J. L., Sonoda, S., Ueda, H., Scott, M. P. und Wu, C. (1991). Repression of the *Drosophila fushi tarazu (ftz)* segmentation gene. EMBO 10, 665-674

Brown, J. L. und Wu, C. (1993). Repression of *Drosophila* pair-rule segmentation genes by ectopic expression of *tramtrack*. Development 117, 45-58

Brunet, J. F. und Ghysen, A. (1999). Deconstructing cell determination: proneural genes and neuronal identity. Bioessays 21, 313-318

Brunner, D., Ducker, K., Oellers, N., Hafen, E., Scholz, H. und Klämbt, C. (1994). The ETS domain protein PointedP2 is a target of MAP kinase in the Sevenless signalling pathway. Nature 370, 386-389

Campbell, G., Goring, H., Lin, T., Spana, E., Anderson, S., Doe, C. und Tomlinson, A. (1994). RK2, a glial-specific homeodomain protein is required for embryonic nerve cord condensation and viability in *Drosophila*. Development 120, 2957-2966

Campos-Ortega, J. A. und Hartenstein, V. (1985). The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York

Chen, Z., Brand, N. J., Chen, A., Chen, S. J., Tong, J. H., Wang, Z. Y., Waxman, S. und Zelent, A. (1993). Fusion between a novel Kruppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor-alpha locus due to a variant translocation associated with acute promyelocytic leukaemia. EMBO 12, 1161-1167

Chen, J. D. und Evans, R. M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. Nature 377, 454-457

Chen, W., Zollman, S., Couderc, J.-L. und Laski, F. (1995). The BTB Domain of *bric à brac* mediates dimerization in vitro. Mol. Cell. Biol. 15, 3424-3429

Chen, Z. F., Paquette, A. J. und Anderson, D. J. (1998). NRSF/REST is required in vivo for repression of multiple neuronal target genes during embryogenesis. Nat Gen. 20, 136-142

Chong, J. A., Tapia-Ramirez, J., Kim, S., Toledo-Aral, J. J., Zheng, Y., Boutros, M. C., Altshuller, Y., Frohman, M., Kraner, S. D. und Mandel, G. (1995). REST: a mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. Cell 80, 949-957

Chou, T. B., Noll, E. und Perrimon, N. (1993). Autosomal P[ovoD1] dominant female-sterile insertions in Drosophila and their use in generating germ-line chimeras. Development. 119, 1359-1369

Crawford, H. C., Fingleton, B. M., Rudolph-Owen, L. A., Goss, K. J. H., Rubinfeld, B., Polakis, P. und Matrisian, L. M. (1999). The metalloproteinase matrilysin is a target of ß-catenin transactivation in intestinal tumors. Oncogene 18, 2883-2891

Crews, S. T., Thomas, J. und 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

Croston, G. E., Kerrigan, L.A., Lira, L. M., Marshak, D. R. und Kadonaga, J. T. (1991). Sequence-specific antirepression of histone H1-mediated inhibition of basal RNA polymerase II transcription. Science 251, 643-649

Deák, P., Omar, M. M., Saunders, R., Pál, M., Komonyi, O., Szidonya, J., Maróy, P., Zhang, Y., Ashburner, M., Benos, P., Savakis, C., Siden-Kiamos, L., Louis, C., Bolshakov, V. N., Kafatos, F. C., Madueno, E., Modolell, J. und Glover, D. M. (1997). P-Element insertion alleles of essential genes on the third chromosome of *Drosophila melanogaster*: correlation of physical and cytogenetic maps in the chromosomal region 86E-87F. Genetics 147, 1697-1722

Deltour, S., Gueradel, C. und Leprince, D. (1999). Recruitment of SMRT/N-CoR-mSin3A-HDAC-repressing complexes is not a general mechanism for BTB/POZ transcriptional repressors: the case of HIC-1 and γFBP-B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 14831-14836

Dhordain, P., Albagli, O., Lin, R. J., Ansieau, S., Quief, S., Leutz, A., Kerckaert, J. P., Evans, R. M. und Leprince, D. (1997). Corepressor SMRT binds the BTB/POZ repressing domain of the LAZ3/BCL6 oncoprotein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 10762-10767

DiBello, P. R., Withers, D. A., Bayer, C. A., Fristrom, J. W. und Guild, G. M. (1991). The *Drosophila* Broad-Complex encodes a family of related proteins containing zinc fingers. Genetics 129, 385-397

Dong, R. und Jacobs, J. R. (1997). Origin and differentiation of supernumerary midline glia in *Drosophila* embryos deficient for apoptosis. Dev Biol 190, 165-177

Dorn, R., Krauss, V., Reuter, G. und Saumweber, H. (1993). The enhancer of position-effect variegation of *Drosophila*, *E(var)3-93D,* codes for a chromatin protein containing a conserved domain common to several transcriptional regulators. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 11376-11380

Dorn, R., Szidonya, J., Korge, G., Sehnert, M., Traubert, H., Archoukieh, E., Tschiersch, B., Morawietz, H., Wustmann, G., Hoffmann, G. und Reuter, G. (1993b). P-Transposon-induced dominant enhancer mutations of position-effect variagation in *Drosophila melanogaster*. Genetics 133, 279-290

Edwards, G. M., Wilford, F. H., Liu, X. W., Hennighausen, L., Dijane, J. und Streuli, C. (1998). Regulation of mammary differentiation by extracellular matrix involves protein-tyrosine phosphotases. Biol. Chem. 273, 9495- 9500

Farelly, N., Lee, Y. J., Oliver, J., Dive, C. und Struli, C. H. (1999). Extracellular matrix regulates apoptosis in mammary epithelium through a control on insulin signaling. Cell-Biol. 144, 1337-1348

Finkelstein, R., Smouse, D., Capaci, T. M., Spradling, A. C. und Perrimon, N. (1990). The *orthodenticle* gene encodes a novel homeodomain protein involved in the development of the *Drosophila* nervous system and ocellar visual structures. Genes Dev 4, 1516-1527

Freeman, M. (1994). The *spitz* gene ist required for photorezeptor determination in the *Drosophila* eye where it interacts with the EGF receptor. Mech. Dev. 48, 25-33

Fujita, C. S., Zipursky, S., Benzer, S., Ferrus, A. und Shotwell, S. L. (1982). Monoclonal antibodies against the *Drosophila* nervous system. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79, 59-69

Giesen, K., Hummel, T., Stollewerk, A., Harrison, S., Travers, A. und Klämbt, C. (1997). Glial development in the *Drosophila* CNS requires concomitant activation of glial and repression of neuronal differentiation genes. Development 124, 2307-2311

Gho, M., Bellaiche, Y. und Schweisguth, F. (1999). Revisiting the *Drosophila* microchaete lineage: a novel intrinically asymmetric cell division generates a glial cell. Development 126, 3573-3584

Glise, B., Bourbon, H. und Noselli, S. (1995). *Hemipterous* encodes a novel *Drosophila* MAP kinase, required for epithelial cell sheet movement. Cell 83, 451-461

Golembo, M., Raz, E. und Shilo, B. Z. (1996). The *Drosophila* embryonic midline is the site of Spitz processing, and induces activation of the EGF receptor in the ventral ectoderm. Development 122, 3363-3370

Guo, M., Bier, E., Jan, L. Y. und Jan, Y. N. (1995). *tramtrack* acts downstream of *numb* to specify distinct daughter cell fates during asymmetric cell divisions in the *Drosophila* PNS. Neuron 14, 913-925

Guo, M., Jan, L. Y. und Jan, Y. N. (1996). Control of daughter cell fates during asymmetric division: interaction of Numb and Notch. Neuron 17, 27-41

Halter, D., Urban, J., Rickert, C., Ner, S., Ito, K., Travers, A. und 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

Harbecke, R. und Lengyel, J. A. (1995). Genes controlling posterior gut development in the *Drosophila* embryo. Roux´s Arch Dev Biol 204, 308-329

Harris, R., Sabatelli, L. M. und Seeger, M. A. (1996). Guidance cues at the *Drosophila* midline: Identification and characterization of two *Drosophila* netrin/unc6 homologs. Neuron 17, 217-228

Harrison, S. D. und Travers, A. (1990). The *tramtrack* gene encodes a *Drosophila* finger protein that interacts with the *ftz* transcriptional regulatory region and shows a novel embryonic expression pattern. EMBO 9, 207-216

Harrison, S. D., Solomon, N. und Rubin, G. M. (1995). A genetic analysis of the 63E-64A genomic region of *Drosophila melanogaster*: Identification of mutations in a replication factor C subunit. Genetics 139, 1701-1709

Heinzel, T., Lavinsky, R. M., Mullen, T.-M., Soderstrom, M., Laherty, C. D., Torchia, J., Yang, W.-M., Brard, G., Ngo, S. D., Davie, J. R., Seto, E., Eisenman, R. N., Rose, D. W., Glass, C. K. und Rosenfeld, M. G. (1997). A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. Nature 387, 43-48

Hess, N., Kronert, W. A. und Bernstein, S. I. (1989). Transcriptional and post-transcriptional regulation of *Drosophila* myosin heavy chain gene expression. Cellular and molecular biology of muscle development (ed. Kedes und Stockdale) Alan R. Riss, NY

Hidalgo. A., Urban, J. und Brand, A. (1995). Targeted ablation of glia disrupts axon tract formation in the *Drosophila* CNS. Development 121, 3702-3712

Hidalgo, A. und Booth, G. E. (2000). Glia dictate pioneer axon trajectories in the Drosophila embryonic CNS. Development 127, 393-402

Horlein, A. J., Naar, A. M., Heinzel, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M. und Glass, C.K. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. Nature 377, 397-404

Horowitz, H. und Berg, C. A. (1996). Sequence-specific antirepression of histone H1-mediated inhibition of basal RNA polymerase II transcription. Development 122, 1859-1871

Hosoya, T., Takizawa, K., Nitta, K. und Hotta, Y (1995). *Glial cells missing*: A binary switch between neuronal and glial determination in *Drosophila*. Cell 82, 1025-1036

Hou, X. S., Goldstein, E. S. und Perrimon, N. (1997). *Drosophila* Jun relays the Jun amino-terminal kinase signal transduction pathway to the Decapentaplegic signaling pathway in regulating epithelial cell sheet movement. Genes Dev. 11, 1728-1737

Howe, A., Aplin, A. E., Alahari, S. K. und Juliano, R. L. (1998). Integrin signaling and cell growth control. Curr. Opin. Cell Biol. 10, 220-231

Hummel, T., Schimmelpfeng, K. und Klämbt, C. (1999). Commissure formation in the embryonic CNS of *Drosophila*. I. Identification of the required gene functions. Dev Biol 209, 381-398

Hummel, T., Schimmelpfeng, K. und Klämbt, C. (1999b). Commissure formation in the embryonic CNS of *Drosophila*. II. Function of the different midline cells. Development 126, 771-779

Ikeya, T. und Hayashi, S. (1999). Interplay of Notch and FGF signaling restricts cell fate and MAPK activation in the Drosophila trachea. Development 126, 4455-4463

Jack, J. und Myette, G. (1999). Mutations that alter the morphology of the malpighian tubules in *Drosophila*. Dev Genes Evol 209, 546-554

Jan, Y. N. und Jan, L. Y. (1994). Neuronal cell fate specification in *Drosophila*. Curr. Opin. Neurobiol.4, 8-13

Jimenez, G., Paroush, Z. und Ish-Horowicz, D. (1997). Groucho acts as a corepressor for a subset of negative regulators, including hairy and engrailed. Genes Dev 11, 3072-3082

Jones, R. S. und Gelbart, W. M. (1993). The Drosophila Polycomb-group gene *Enhancer of zeste* contains a region with sequence similarity to trithorax. Mol Cell Biol. 13, 6357-6366.

Jones, B. W., Fetter, R. D., Tear, G. und Goodman, C. S. (1995). *Glial cells missing*: A genetic switch that controls glial versus neuronal fate. Cell 82, 1013-1023

Jürgens, G., Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C. und Kluding, H. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticule in *Drosophila melanogaster*. II. Zygotic loci on the third chromosome. Roux´s Arch Dev Biol 193, 283-195

Kadonaga, J. T. (1998). Eukaryotic transcription: an interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines. Cell 92, 307-317

Kennedy, T. E., Serafini, T., de la Torre, J. R. und Tessier-Lavigne, M. (1994). Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. Cell 78, 425-435

Kidd, T., Brose, K., Mitchell, K. J., Fetter, R. D., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S. und Tear, G. (1998a). *roundabout* controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. Cell 92, 205-215

Kidd, T., Russell, C., Goodman, C. S. und Tear, G. (1998b). Dosage sensitive and complementary functions of *roundabout* and *commissureless* control axon crossing of the CNS midline. Neuron 20, 25-33

Klaes, A., Menne, T., Stollewerk, A., Scholz, H. und Klämbt, C. (1994). The ETS transcription factors encoded by the *Drosophila* gene *pointed* direct glial cell differentiation in the embryonic CNS. Cell 78, 149-160

Klämbt, C. (1993). The *Drosophila* gene *pointed* encodes two ETS-like proteins which are involved in the development of the midline glia cells. Development 117, 163-176

Klämbt, C., Jacobs, J. R. und Goodman, C. S. (1991). The midline of the *Drosophila* central nervous system: A model for the genetic analysis of cell fate, cell migration, and growth cone guidance. Cell 64, 801-815

Klämbt, C. und Goodman, C. S. (1991). The diversity and pattern of glia during axon pathway formation in the *Drosophila* embryo. Glia 4, 205-213

Klämbt, C., Hummel, T., Menne, T., Sadlowski, E., Scholz, H. und Stollewerk, A. (1996). Development and function of embryonic CNS glial cells in *Drosophila*. Dev. Gen. 18, 40-49

Klämbt, C., Schimmelpfeng, K. und Hummel, T. (1997). Genetic analysis of axon pattern formation in the embryonic CNS of *Drosophila*. Invertebrate Neuroscience 3, 165-174

Kockel, L., Zeitlinger, J., Staszewski, L. M., Mlodzik, M. und Bohmann, D. (1997). Jun in *Drosophila* development: redundant and nonredundant functions and regulation by two MAPK signal transduction pathways. Genes Dev. 11, 1748-1758

Kolodkin, A. L., Pickup, A. T., Lin, D. M., Goodman, C. S. und Banerjee, U. (1994). Characterization of *Star* and its interactions with *sevenless* and EGF receptor during photoreceptor development in *Drosophila*. Development 120, 1731-1745

Kulkarni, S. J., Newby, L. M. und Jackson, F. R. (1994). *Drosophila* GABAergic system. II. Mutational analysis of chromosomal segment 64AB, a region containing the glutamic acid decarboxylase gene. Mol. Gen. Gent. 243, 555-564

Labouesse, M., Hartwieg, E. und Horvitz, H. R. (1996). The *Caenorhabditis elegans* LIN-26 protein is required to specify and/or maintain all non-neuronal ectodermal cell fates. Development 122, 2579-2588

Lai, Z.-C., Harrrison, S. D., Karim, F., Li, Y. und Rubin, G. M. (1996). Loss of *tramtrack* gene activity results in ectopic R7 cell formation, even in a *sina* mutant background. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 93, 5025-5030

Lai, Z.-C., Fetchko, M. und Li, Y. (1997). Repression of *Drosophila* cell fate through cooperative action of two transcriptional repressor Yan and Tramtrack. Genetics 147, 1131-1137

Lee, Y.-J. und Streuli, C. (1999). Extracellular matrix selectively modulates the response of mammary epithelial cells to different soluble signaling ligands. Biol. Chem. 274, 22401-22408

Li, S., Li. Y., Carthew, R. und Lai, Z.-C. (1997). Photoreceptor cell differentiation requires regulated proteolysis of the transcriptional repressor Tramtrack. Cell 90, 469-478

Lintermann. K.-G., Roth, G. E., King-Jones, K., Korge, G. und Lehmann, M. (1998) Comparison of the GAGA factor genes of *Drosophila melanogaster* and *Drosophila virilis* reveals high conservation of GAGA factor structure beyond the BTB/POZ and DNA-binding domains. Dev Genes Evol 208, 447-456

Llimargas, M. (1999). The Notch pathway helps to pattern the tips of the Drosophila tracheal branches by selecting cell fates. Development 126,2355-2364

Mayer, U. und Nüsslein-Volhard, C. (1988). A group of genes required for pattern formation in the ventral ectoderm of the *Drosophila* embryo. Genes Dev 2, 1496-1511

Mitchell, K. J., Doyle, J. L., Serafini, T., Kennedy, T. E., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S. und Dickson, B. J. (1996). Genetic analysis of netrin genes in *Drosophila*: Netrins guide CNS commissural axons and peripheral motor axons. Neuron 17, 203-215

Mohan, R., Rinehart, W. B., Bargagna Mohan, P. und Fini, M. E. (1998). Gelatinase B/lacZ transgenic mice, a model for mapping gelatinase B expression during developmental and injury-related tissue remodeling. Biol Chem, 273, 25903- 25914

Morin, P. J., Sparks, A. B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B. und Kinzler, K. W. (1997). Activation of ß-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in ß-catenin or APC. Science 275, 1787-1790

Munaut, C., Salonurmi, T., Kontusaari, S., Reponen, P., Morita, T., Foidart, J. M. und Tryggvason, K. (1999). Murine matrix metalloproteinase 9 gene. 5´- upstream region contains cis-acting elements for expression in osteoclasts and migrating keratinocytes in transgenic mice. Biol Chem 274, 5588-5596

Murugasu-Oei, B., Rodrigues, V., Yang, X. und Chia, W. (1995). Masquerade: a novel secreted serine protease-like molecule is required for somatic muscle attachment in the *Drosophila* embryo. Genes Dev 9, 139-154

Murugasu-Oei, B., Balakrishnan, R., Yang, X., Chia, W. und Rodrigues, V. (1996). Mutations in *masquerade*, a novel serine-protease-like molecule, affect axonal guidance and taste behavior in *Drosophila*. Mech. Dev. 57, 91-101

Nagy, L., Kao, H.-Y., Chakravarti, D., Lin, R. J., Hassig, C. A., Ayer, D. E., Schreiber, S. L., und Evans, R. M. (1997). Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. Cell 89, 373-380

Nambu, J. R., Lewis, J. O., Warthon Jr, K. A. und Crews, S. T. (1991). The *Drosophila single minded* gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. Cell 67, 1157-1167

Numoto, M., Niwa, O., Kaplan, J., Wong, K. K., Merrell, K., Kamiya, K., Yanagihara, K. und Calame, K. (1993). Transcriptional repressor ZF5 identifies a new conserved domain in zinc finger proteins. Nucleic Acids Res. 21, 3767-3775

Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E. und Kluding, H. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticule in *Drosophila melanogaster*. I. Zygotic loci on the second chromosome. Roux´s Arch Dev Biol 193, 267-282

O´Neill, E. M., Rebay, I., Tjian, R. und 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, 137-147

Paro, R (1990). Imprinting a determined state into the chromatin of Drosophila. Trends Genet. 6,416-421

Paroush, Z., Finley, Jr., R. L., Kidd, T., Wainwright, S., M., Ingham, P. W., Brent, R. und Ish-Horowicz, D. (1994). Groucho is required for *Drosophila* neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with hairy-related bHLH proteins. Cell 79, 805-815

Patel, N. H., Martin-Blanco, E., Coleman, K. G., Poole, S. J., Ellis, M. C., Kornberg, T. B. und Goodman, C. S. (1989). Expression of *engrailed* proteins in arthropods, annelids, chordates. Cell 58, 955-968

Patel, N. H., Condron, B.G. und Zinn, K. (1994). Pair-rule expression patterns of even-skipped are found in both short- and long-germ beetles. Nature 367, 429-434

Pilcher, B. K., Dumin, J. A., Sudbeck, B. D., Krane, S. M. und Welgus, H. G. (1997). The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. Cell Biol. 137, 1445-1457

Pilcher, B. K., Dumin, J., Schwartz, M. J., Mast, B. A., Schultz, G. S., Parks, W. C. und Welgus, H. G. (1999). Keratinocyte collagenase-1 expression requires an epidermal growth factor receptor autocrine mechanism. Biol. Chem. 274, 10372-10381

Prockop, D. J., Sieron, A. und Li, S. W. (1998). Procollagen N-proteinase and procollagen C-proteinase. Two unusual metalloproteinases that are essentiell for procollagen processing probably have important roles in development and cell signaling. Matrix Biol. 16, 399-408

Rawls, A. und Olson, E. (1997). MyoD meets its maker. Cell 89, 5-8

Raz, E. und Shilo, B. Z. (1992). Dissection of the *faint little ball (flb)* phenotype: determination of the development of the *Drosophila* nervous system by early interactions in the ectoderm. Development 114, 113-123

Read, D. und Manley, J. L. (1992). Alternatively spliced transcripts of the *Drosophila tramtrack* gene encode zinc finger proteins with distinct DNA binding specificities. EMBO 11, 1035-1044

Read, D., Levine, M. und Manley, J. L. (1992). Ectopic expression of the *Drosophila tramtrack* gene results in multiple embryonic defects, including repression of *even-skipped* and *fushi tarazu*. Mech. Dev. 38, 183-195

Reddy, G. V. und Rodrigues, V. (1999a). Sibling cell fate in the *Drosophila* adult external sense organ lineage is specified by Prospero function, which is regulated by Numb and Notch. Development 126, 2083-2092

Reddy, G. V. und Rodrigues, V. (1999b). A glial cell arises from an additional division within the mechanosensory lineage during development of the microchaete on the *Drosophila* notum. Development 126, 4617-4622

Riesgo-Escovar, J. R., Jenni, M., Fritz, A. und Hafen, E. (1996). The *Drosophila* Jun-N-terminal kinase is required for cell morphogenesis but not for Djun-dependent cell fate specification in the eye. Genes Dev. 10, 2759-2768

Roark, M., Sturtevant, M. A., Emery, J., Vaessin, H., Grell, E. und Bier, E. (1995). *scratch*, a pan-neural gene encoding a zinc finger protein related to *snail*, promotes neuronal development. Genes Dev 9, 2384-2398

Robertson, H. M., Preston, C. R., Phillis, R. W., Johnson-Schlitz, D. M., Benz, W. K. und Engels, W. R. (1988). A stable source of P-Element transposase in *Drosophila melanogaster*. Genetics 118, 6341- 6351

Rogers, S., Wells, R. und Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. Science 234, 364-368

Rudolph-Owen, L. A., Chan, R., Muller, W. J. und Matrisian, L. M. (1998). The matrix metalloproteinase matrilysin influences early-stage mammary tumorgenesis. Cancer Res 58, 5500-5506

Ruiz Gomez, M. und Bate, M. (1997). Segregation of myogenic lineages in *Drosophila* requires *numb*. Development 124, 4857-4866

Rutledge, B. J., Zhang, K., Bier, E., Jan, Y. N. und Perrimon, N. (1992). The *Drosophila spitz* gene encodes a putative EGF-like growth factor involved in dorsal-ventral axis formation and neurogenesis. Cell 81, 967-978

Salzberg, A., D´Evelyn, D., Schulze, K., Lee, J.-K., Stumpf, D., Tsai, L. und Bellen, H. J. (1994). Mutations affecting the pattern of the PNS in *Drosophila* reveal novel aspects of neuronal development. Neuron 13, 269-287

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. 2. Auflage. CSH press

Schoenherr, C. J. und Anderson, D. (1995). The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron- specific genes. Science 267, 1360-1363

Schoenherr, C. J., Paquette, A. und Anderson, D. (1996). Identification of potential target genes for the neuron-restrictive silencer factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 9881-9886

Scholz, H., Sadlowski, E., Klaes, A. und Klämbt, C. (1997). Control of midline glial development in the embronic *Drosophila* CNS. Mech. Dev. 64, 137-151

Schwartz, M. A. und Baron, V. (1999). Interactions between mitogenic stimuli, or a thousand and one connections. Curr. Opin. Cell Biol. 11, 197-202

Seeger, M., Tear, G., Ferres-Marco, D. und Goodman, C. S. (1993). Mutations affecting growth cone guidance toward or away from the midline. Neuron 10, 409-426

Serafini, T., Kennedy, T. E., Galko, M. J., Mirzayan, C., Jessell, T. M. und Tessier-Lavigne, M. (1994). The netrins define a family of axon outgrowth promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC 6. Cell 78, 409-424

Serafini, T., Colamarino, S. A., Leonardo, E. D., Wang, H., Beddington, R., Skarnes, W. C. und Tessier-Lavigne, M. (1996). Netrin 1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. Cell 87, 1001-1014

Seyfert, V. L., Allman, D., He, Y. und Staudt, L.M. (1996). Transcriptional repression by the proto-oncogene BCL-6. Oncogene 12, 2331-2342

Siden-Kiamos, I., Saunders, R. D. C., Spanos, L., Majerus, T., Treanear, J., Savakis, C., Louis, C., Glover, D. M., Ashburner, M. und Kafatos, F. C. (1990). Towards a physical map of the *Drosophila melanogaster* genome: mapping of cosmid clones within defined genomic divisions. Nucl. Acid Research 18, 6261-6270

Sluss, H. K., Han, Z., Barrett, T., Goberdhan, D., Wilson, C., Davis, R. J. und Ip, Y. T. (1996). A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in *Drosophila*. Genes Dev. 10, 2745-2758

Sonnenfeld, M. J. und Jacobs, J. R. (1994). Mesectodermal cell fate analysis in *Drosophila* midline mutants. Mech. Dev. 46, 3-13

Sonnenfeld, M. J. und Jacobs, J. (1995). Apoptosis of the midline glia during *Drosophila* embryogenesis: A correlation with axon contact. Development 121, 569-578

Spana, E. P. und Doe, C. Q. (1995). The *prospero* transcription factor is asymmetrically localized to the cell cortex during neuroblast mitosis in *Drosophila*. Development 121, 3187-3195

Stetler-Stevenson, W. G. (1999). Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. Clin Invest 103, 1237- 1241

Stemerdink, C. und Jacobs, J. (1997). Argos and Spitz group function to regulate midline glia cell number in *Drosophila* embryos. Development 124, 3787-3796

Steneberg, P., Hempala, J. und Samakovlis, C. (1999). Dpp and Notch specify the fusion cell fate in the dorsal branches of the *Drosophila* trachea. Mech Dev 87, 153-163

Streuli, C (1999). Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. Curr. Opin. Cell Biol. 11, 634-640

Struhl, K. (1998). Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisma. Genes Dev 12, 599-606

Sturtevant, M. A., Roark, M. und Bier, E. (1993). The *Drosophila rhomboid* gene mediates the localized formation of wing veins and interacts genetically with components of the EGF-R signaling pathway. Genes Dev. 7, 961-973

Sturtevant, M., Roark, M., O'Neill, J. W., Biehs, B., Colley, N. und Bier, E. (1996). The *Drosophila* rhomboid protein is concentrated in patches at the apical cell suface. Dev. Biol. 174, 298-309

Tajbakhsh, S., Rocancourt, D., Cossu, G. und Buckingham, M. (1997). Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD. Cell 89, 128-138

Tapia-Ramirez, J., Eggen, B. J. L., Peral-Rubio, M. J.,Toledo-Aral, J. J. und Mandel, G. (1997). A single zinc finger motif in the silencing factor REST represses the neural-specific type II sodium channel promoter. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1177-1182

Tear, G., Harris, R., Sutaria, S., Kilomanski, K., Goodman, C. S. und Seeger, M. (1996). *commissureless* controls growth cone guidance across the CNS midline in *Drosophila* and encodes a novel membrane protein. Neuron 16, 501-514

Tearle, R. und Nüsslein-Volhard, C. (1987). Tübingen mutants and stock list. D.I.S. 66, 209

Thomas, J. B., Crews, S. T. und Goodman, C. S. (1988). Moleclular genetics of the *single minded* locus: a gene involved in the development of the *Drosophila* nervous system. Cell 52, 133-141

Tower, J., Karpen, G. H., Graig, N. und Spradling, A. (1993). Prefential transposition of *Drosophila* P-elements to nearby chromosomal sites. Genetics 133, 347-359

Tsukiyama, T., Becker, P. und Wu, C. (1994). ATP-dependent nucleosome disruption at a heat-shock promotor mediated by binding of gaga transcription factor. Nature 367, 525-532

Upton, C. und McFadden, G. (1986). Tumorigenic poxviruses: Analysis of viral DNA sequences implicated in the tumorigenicity of Shope fibroma virus and malignant rabbit virus. Virology 152, 308-321

Vincent, S., Vonesch, J.-L. und Giagrande, A. (1996). *glide* directs glial fate commitment and cell fate switch between neurones and glia. Development 122, 131-139

Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C. und Jürgens, G. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticule in *Drosophila melanogaster*. III. Zygotic loci on the X-chromosome and the fourth chromosome. Roux´s Arch Dev Biol 193, 296-307

Xiong, W.-C. und Montell, C. (1993). *Tramtrack* is a transcriptional repressor required for cell fate determination in the *Drosophila* eye. Genes Dev 7, 1085-1096

Xiong, W.-C., Okano, H., Patel, N. H. und Montell, C. (1994). *repo* encodes a glial-specific homeo domain protein required in the *Drosophila* nervous system. Genes Dev 8, 981-994

Xu, L., Glass, C. K. und Rosenfeld, M. G. (1999). Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. Curr. Opin. Gen. Dev. 9, 140-147

Yamamoto, D., Nihonmatsu, I., Matsuo, T., Miyamoto, H., Kondo, S., Hirata, K und Ikegami, Y. (1996). Genetic interactions of *pokkuri* with *seven in absentia, tramtrack* and downstream components of the *sevenless* pathway in R7 photoreceptor induction in *Drosophila melanogaster*. Roux´s Arch Dev Biol 205, 215-224

Yip, M. L., Lamka, M. L. und Lipshitz, H. D. (1997). Control of germ-band retraction in Drosophila by the zinc-finger protein HINDSIGHT. Development 124, 2129-2141

Yu, Y., Yussa, M., Song, J., Hirsch, J. und Pick, L. (1999). A double interaction screen identifies positve and negative *ftz* gene regulators and Ftz-interacting proteins. Mech. Dev. 83, 95-105

Yun, K. und World, B. (1996). Skeletal muscle determination and differentiation: story of a core regulatory network and its context. Curr. Opin. Cell Biol. 8, 877-889

Zak, N. B., Wides, R. J., Schejter, E. D., Raz, E. und Shilo, B.-Z. (1990). Localisation of the DER/*flb* protein in embryos: Implications on the *faint little ball* lethal phenotype. Development 109, 865-874

Zhang, P. und Spradling, A. C. (1993). Efficient and dispersed local P-element transposition from *Drosophila* females. Genetics 133, 361-373

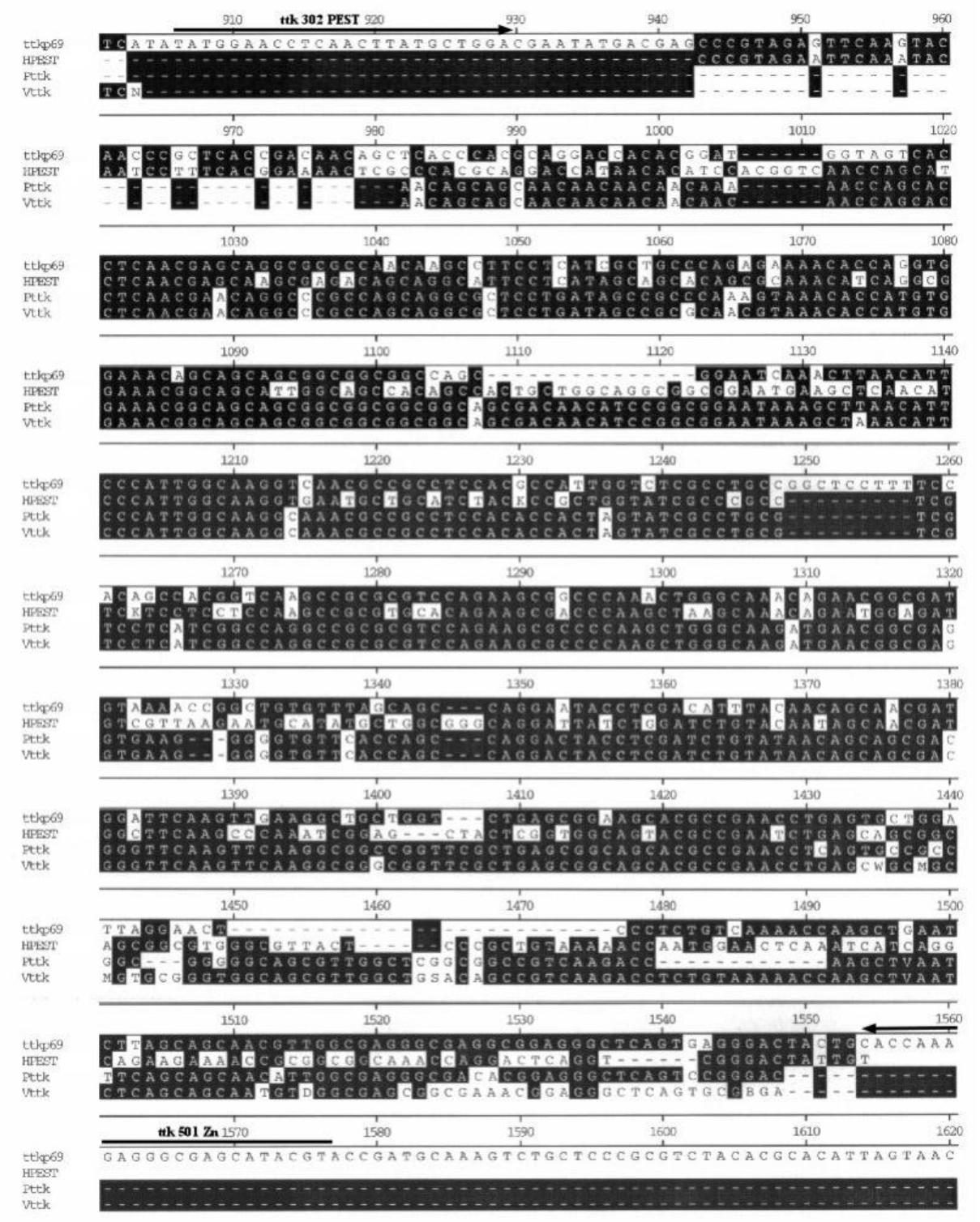
Zhou, L., Hashimi, H., Schwartz, L. M. und Nambu, J. R. (1995). Programmed cell death in the *Drosophila* central nervous system midline. Curr Biol 5, 784-790

Zhu, Y., Oganesian, A., Keene, D. R. und Sandell, L. J. (1999). Type IIA procollagen containing the cysteine-rich amino propeptide is deposited in the extracellular matrix of prechondrogenic tissue and binds to TGF-ß 1 and BMP-2. Cell Biol. 144, 1069-1080

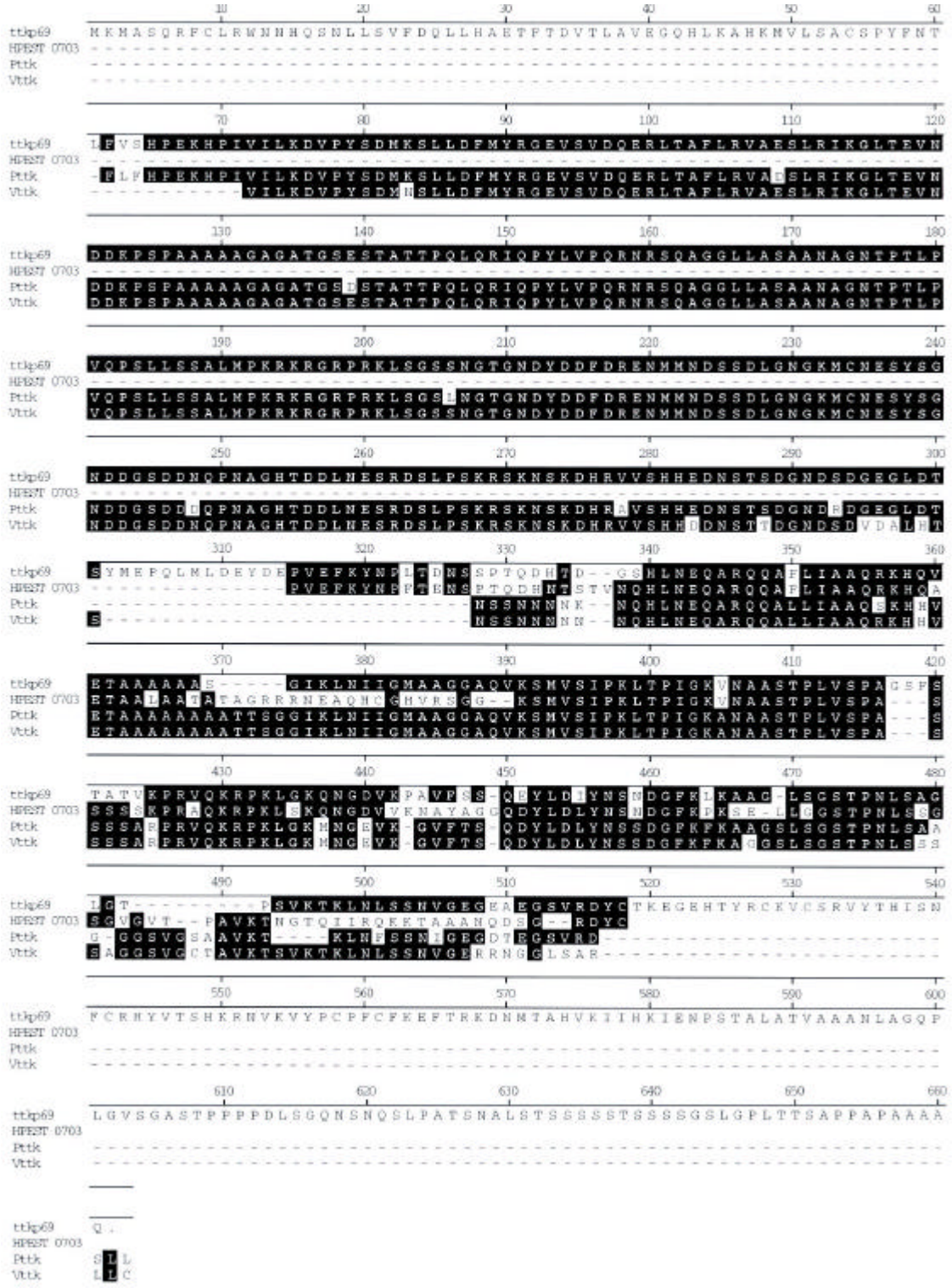
Zollman, S., Godt, D., Prive, G. G., Couderc, J. L. und Laski, F. (1994). The BTB domain, found primarily in zinc finger proteins, defines an evolutionary conserved family that includes several developmentally regulated genes in *Drosophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 10717-10721

Abkürzungsverzeichnis

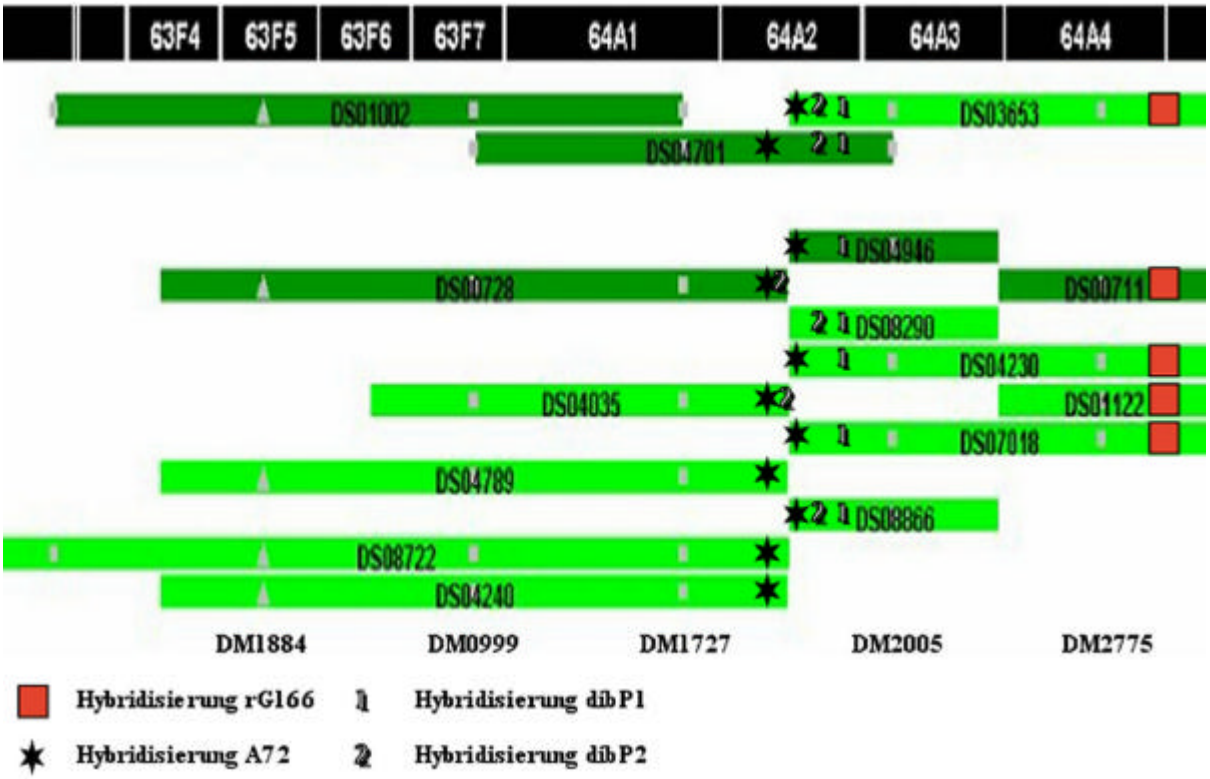
AMP	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoylphosphat (X-Phosphat)
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
cM	centi-Morgan
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynukleotide
ECM	extrazelluläre Matrix
EMS	Ethylmethylsulfat
GS	*goat*-(Ziegen)-Serum
HRP	Meerrettich-Peroxidase
kb	Kilobase
mAb	monoklonaler Antikörper
MLG	Mittelliniengliazellen
NBT	Nitroblau-Tetrazolium-Chlorid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pBS	Bluescript-Vektor (*Stratagene*)
PNS	peripheres Nervensystem
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease A
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
STS	*Sequence tag site*
ü.N.	über Nacht
UAS	*upstream activating sequence*
UTR	untranslatierter Bereich
ZNS	zentrales Nervensystem



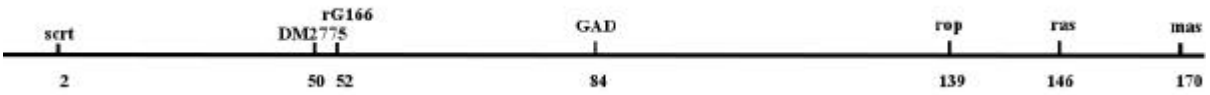
Sequenzvergleich der *tramtrack*-Gene aus *D. melanogaster* (ttkp69), *D. hydei* (HPEST), *D. pseudobscura* (Pttk) und *D. virilis* (Vttk). Dargestellt ist der Bereich zwischen der PEST-Sequenz und den Zinkfingern mit den verwendeten Primern.



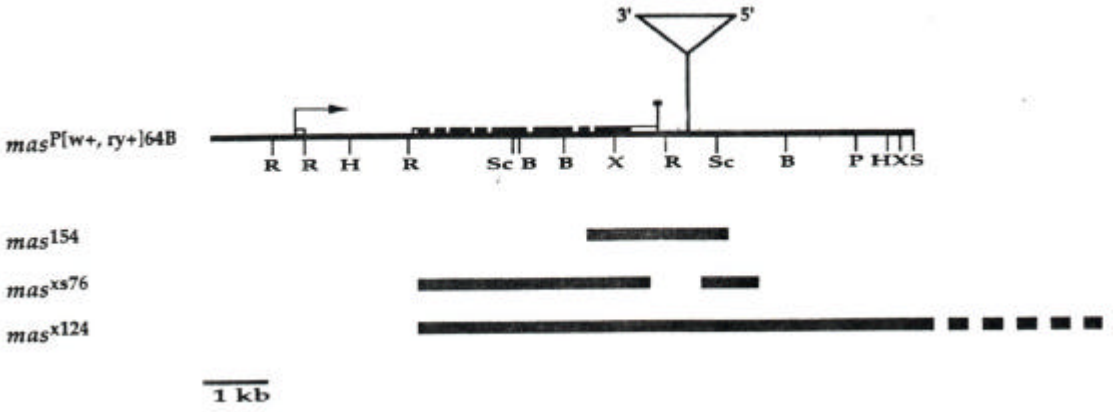
Vergleich der *tramtrack*-Proteine aus *D. melanogaster* (ttkp69), *D. hydei* (HPEST), *D. pseudobscura* (Pttk) und *D. virilis* (Vttk).



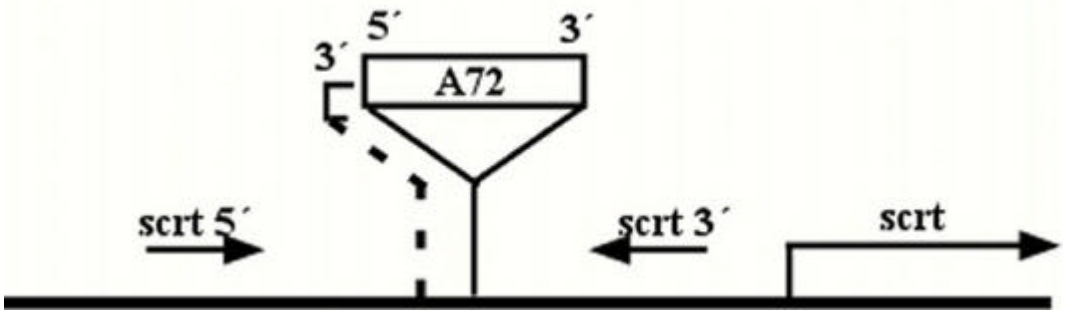
Karte der P1-Klone der Region 64A3. Dargestellt sind die Hybridisierungsmuster verschiedener molekularer Sonden. nach *Berkeley Drosophila Genome Project*



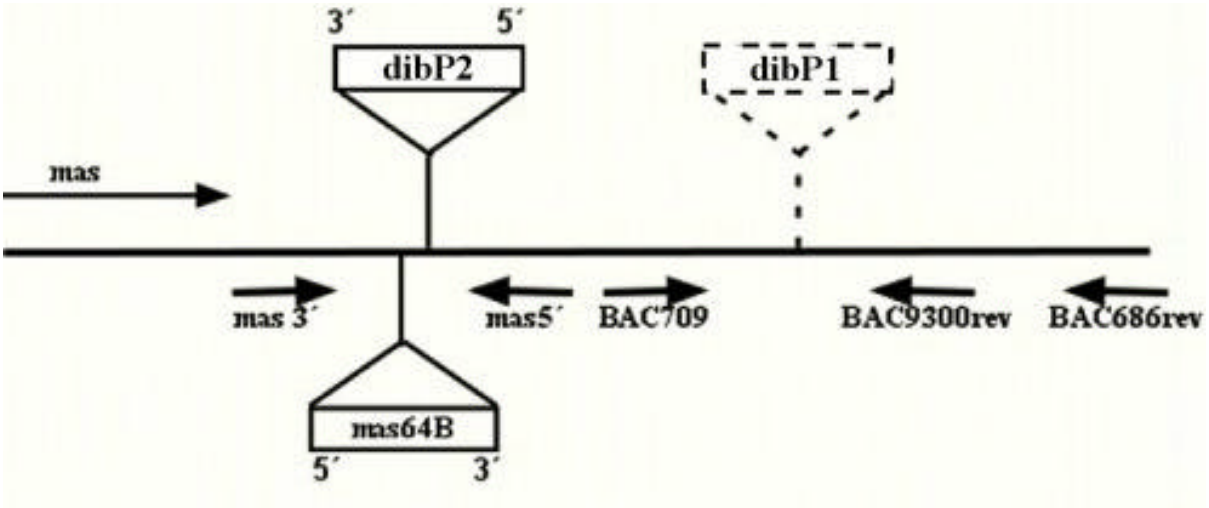
Schematische Darstellung der genomischen Region zwischen *scratch* und *mas*. Grundlage sind die Daten des *Drosophila genome projects.*



Genomische Region um *masquerade.* Dargestellt ist die P-Element-Insertion 64B und die in den Exzisionsallelen deletierten Bereiche. aus Murugasu-Oei *et al, 1996.*



Genomische Region um die P-Element-Insertion A72



Genomische Region unterhalb von *mas*. dib^{P1} ist wegen der unklaren Lokalisation gestrichelt dargestellt.

genomische Sequenz *A72* 3´:

TCATGGACAC TTATAAGCG GGCTCTCGGG CCGCAAGACT CTCATAAGCA
TTCAAGAGTT GCTTACGTTC GGTTCGTTCG CATTTCTTCT CTATCTTATA
TAATATTATA TTTTCTCCTA AGTCAATTTT TTCACTACCA ACAACAACAA
CAATAATAAC AACTCAACTA TTCTCAACTC GCGTCAACCT TAACTTAACT
TTCTCAAAAA CAACAAACTA CAACTCTACA ACTACCAATC TGTCAACTTT
CCGTTTTTAA ACTGAAACTG CAAACCAAAA CATTTATTTT CGTCTCGACG
GCCATTGACA AAGTTTTGTT TGCAAAAAAC CCGAGGAGA

genomische Sequenz *dib*^{P1}*:*

TTCTTTGCCG ACGGGACCA CCTTATGTTA TWWCATCTG GGGTGGTCAC
CCCAGCATAA CGACAGCCAG CCGAAGCGCG TCGCCTTGCA GCCGAAACGA
GCCGAAGGGA AGAGCGAGAG CACTGGAGCG CCAGAGAGCG GAACGCTGAG
AGCGGCACAG CCCCTAAGTTC CAACCCCCAG AAAGGAAGCG CATAGCTGTT
GCTATTGCTG TTGCTCGTCCT GTGGGCTGGT ACACACGATG GAATATGCTC
AGAAACCTAA ATCACTGAAA TAACATAAGG TAATAGCGGC CAAAAGAATA
AAACATAACT TAGTGCTGGC CTTCATGCCT AAAATACCAG TGAAACCCTT
AAAAACAAA GAGTTTTCTA ACATATCTTC TAAGAAATCG CATCGTGTGC
CAGCGCCCTA RAGCAAAGGC AMMATCAGGA AGTGTTTCATT GCCAAAACAT
TCCCCGCTGT TGCTTTCCCC GATTAAAATT GTGCGCTCTC CTTTCAATTC
CCACTTCCCC ATCCGGTCCT TTCTTCGAGT GGGG

genomische Sequenz *dib*^{P2}*:*

ACGAAAAAAT GCAGTTGCAT AATGATTCAT TTGACATGGG AAAAGGGTTA
TGCAATCTTA TACAACCTAT TTTTTTTTTG TGAAATTTG AATATTCCCA
ACAGATTTAA CGGAATTCTT CACCAAAAAA ACATTAAAA GGATCTTTTG
GGAAAKTCCC CKCCGGAMAT TCCGAAWCTT TGAKTGCTTC CCAACGAGGT
GGGGCACAAA AACCACACNC AATGTCCCCC AATTGCAAAA AGATAGAGAA
AATGATTGTT CACTAAAAAA AACTTGACCA GTCGGGAGAA AAAAAGTAMC
CCACAAATCY GGAAACCAA TGTCCTACGT TCCAAACCCT CCGAAAAATT
TGTTTGGTTT TGTTTTTAGC CCCGATTTTA ACCCTTTTTT TTTTTTACCC
CCAGCAATNA AAAAAAA

genomische Sequenz *hau*^{P1}*:*

TAGCCAAGCT CTAAATCAAC CTCACTAAAG GGAACAAAA GCTGGAGCTC
CACCGCGGTG GCGGCCGCTC TAGAACTAGT GGATCCCCCG GGCTGCAGCC
GCCCAGGCGG GCGGTTTAAG ACCGGCTGCA CGGCGCTCCA TCGTTTCACG
GACCTGCTGG GCAAAAATTT CCTGATAGTC GTCACCGCGT TTTGCGCACT
CTTTCTCGTA GGTACTCAGT CCGGCTTCTA TCAGCATCAC CGCTTCCTGA
ACTTCTTTCA GACCATCGAT GGCCATACGA CCGGAGCCTA TCCAGTCGCA
GTTCCCCCAG GCACTGCGGG CTTCCTGAAA ACTGAAGCGC GCTTTTGAAG
GTAACGTCAC CACGCGGAGA ACGATGGCTC TTCCAGCCAG ACAGAAACAT
CTGGCTCGCC TGACGGGATG CGACGAATTT TCGCCGCCCC CATAAAGTAC
GCCCACGATA CGTT

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Campos-Ortega für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit. Christian Klämbt danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit durchzuführen sowie kluge Ratschläge in entscheidenden Situationen.
Ich bedanke mich bei sehr vielen Freunden, Arbeits- und Studienkollegen und sonstigen Wegbegleitern, ohne die diese Zeit eine ziemliche Durststrecke geworden wäre.

Ein besonderer Dank meinen Eltern, die dieses alles ermöglicht haben.

Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzen Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen – die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mit bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. José Campos-Ortega betreut worden.
Die Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Christian Klämbt am Institut für Neurobiologie der Universität Münster durchgeführt.

Teilpublikationen:

Giesen, K., Hummel, T., Stollewerk, A., Harrison, S., Travers, A. und Klämbt, C. (1997). Glial development in the *Drosophila* CNS requires concomitant activation of glial and repression of neuronal differentiation genes. Development 124, 2307-2311

Hummel, T., Menne, T., Scholz, H., Granderath, S., Giesen, K. und Klämbt, C. (1997). CNS midline development in *Drosophila*. Pers. Dev. Neur. 4, 357-368

Granderath, S., Giesen, K. und Klämbt, C. (1998). Genetische Analyse der Gliaentwicklung in *Drosophila*. Neuroforum 1/98, 158-166

LEBENSLAUF

09.06.1970	geboren in Bonn Eltern: Dr. med. Albert Giesen und Dr. med. Ilse Giesen, geb. Schmitz Staatsangehörigkeit deutsch
1976-1980	Besuch der Grundschule Schleiden
1980-1989	Besuch des Städtischen Gymnasiums Schleiden, dort
Mai 1989	Abitur
Juni 1989- August 1990	Ableistung eines 15-monatigen Grundwehrdienstes bei der Bundeswehr in Hannover
Oktober 1990	Beginn eines Biologiestudiums an der Universität zu Köln
September 1992	Vordiplom in Biologie
März 1995- Februar 1996	Diplomarbeit im Institut für Entwicklungsbiologie an der Universität zu Köln unter der Anleitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. Klämbt
29.02.1996	Diplom in den Fächern Entwicklungsbiologie, Genetik, Organische Chemie
März 1996- März 2000	Anfertigung der Doktorarbeit unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Campos-Ortega, Institut für Entwicklungsbiologie an der Universität zu Köln unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Klämbt am Institut für Neurobiologie der Universität Münster