

Suche nach funktionellen Interaktionspartnern von
crumbs mit Hilfe eines *crumbs*-induzierten rauhen
Augenphänotyps

Inaugural – Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Nicola Andrea Grzeschik
aus Münster

Düsseldorf, 2003

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

Referentin: Prof. E. Knust

Korreferent: Prof. J.H: Hegemann

Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2003

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung.....	1
1.1 Kontrolle der Zellpolarität in epithelialen Zellen.....	1
1.1.1 Epithelien.....	1
1.1.2 Polarität epithelialer Zellen.....	2
1.1.3 Zell-Zell-Kontaktstrukturen.....	4
1.1.3.1 Undurchlässige Verbindungen, <i>tight junctions</i>	4
1.1.3.2 Haftverbindungen	5
1.1.3.3 Kommunizierende Verbindungsstrukturen, <i>gap junctions</i>	6
1.2 Epithelien in <i>Drosophila</i>.....	7
1.2.1 Primäre und sekundäre Epithelien.....	7
1.2.2 Zelluläre Kontakte in <i>Drosophila</i>	7
1.2.3 Die Bildung der ZA in <i>Drosophila</i>	8
1.3 Die Rolle von Crumbs bei der Etablierung und Aufrecht- erhaltung von epithelialer Polarität in <i>Drosophila</i>.....	8
1.3.1 Das Gen <i>crumbs</i>	8
1.3.2 Das embryonale Expressionsmuster von Crumbs und der Phänotyp <i>crumbs</i> -mutanter Embryonen.....	11
1.3.3 Überexpression von <i>crb</i> -Konstrukten	12
1.3.4 Bislang bekannte Interaktionspartner und postulierte Funktion von Crumbs.....	13
1.4 Rolle von Crumbs in der Augenentwicklung von <i>Drosophila</i>.....	15
1.4.1 Mutation von humanem und <i>Drosophila crumbs</i> führen zu retinaler Degeneration.....	15
1.4.2 Augenentwicklung in <i>Drosophila melanogaster</i>	16
1.4.3 Rolle von Apoptose (Zelltod) bei der Entstehung des Facettenauges	19
1.4.4 Die Expression von <i>crumbs</i> während der Augenentwicklung von <i>Drosophila</i>	21
1.4.5 Funktion von Crumbs während der Augenentwicklung und mutante Phänotypen.....	22

1.5 Aufgabenstellung.....	23
2. Material.....	24
2.1 Chemikalien und sonstige Materialien.....	24
2.1.1 Reagenssätze.....	24
2.1.2 Bakterienstämme.....	24
2.1.3 Vektoren.....	25
2.1.4 Fotoarbeiten und Bildverarbeitung.....	25
3. Methoden.....	26
3.1 Molekularbiologische Methoden.....	26
3.1.1 Stammhaltung und Kultivierung von Bakterien.....	26
3.1.2 Isolierung von DNA.....	27
3.1.2.1 Mikromethode zur Präparation genomischer DNA aus <i>Drosophila melanogaster</i>	27
3.1.2.2 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	27
3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (,PCR‘).....	30
3.1.4 Lokalisation von P-Elementen mittels Inverser PCR.....	31
3.1.4.1 Präparation genomischer DNA	32
3.1.4.2 Restriktionsspaltung genomischer DNA.....	33
3.1.4.3 Ligation der restriktionsgespaltenen DNA.....	33
3.1.4.4 Polymerasekettenreaktion (,PCR‘).....	34
3.1.5 Herstellung elektrokompenter Bakterien.....	36
3.1.6 Transformation elektrokompenter Bakterien.....	36
3.1.7 Herstellung von transgenen UAS- <i>crb</i> -Konstrukten für die Analyse des rauhen Augenphänotyps.....	37
3.1.7.1 Klonierungsvektoren und <i>crumbs</i> -Konstrukte.....	38
3.1.7.2 Klonierung der Vektoren und Konstrukte.....	39
3.2 Genetische Methoden.....	40
3.2.1 Fliegenzucht und Stammhaltung von <i>Drosophila</i>	40
3.2.2 Eiablagen.....	40
3.2.3 Fliegenstämme, Chromosomen und Allele.....	41
3.2.3.1 ‚Balancer‘-Chromosomen.....	41
3.2.3.2 Mutante Fliegenstämme zur näheren Kartierung ausgewählter	

Defizienzen aus der Defizienzenkollektion.....	42
3.2.3.3 Mutante Fliegenstämme, deren Embryonen einen unvollständigen Rückenschluss aufweisen.....	45
3.2.3.4 <i>crumbs</i> -, <i>stardust</i> - und <i>bazooka</i> -Mutationen.....	46
3.2.3.5 GAL4-Aktivatorlinien.....	47
3.2.3.6 UAS- <i>crumbs</i> -Konstrukte.....	48
3.2.4 Das UAS/Gal4-System.....	48
3.2.5 Suche nach Modifikatoren eines <i>crumbs</i> -induzierten rauhen Augenphänotyps („Modifier-Screen“).....	51
3.2.6 Abschwächung eines mutanten <i>crumbs</i> -Phänotyps durch Defizienzen.....	53
3.3 Mikromanipulation von <i>Drosophila melanogaster</i>.....	55
3.3.1 Keimbahntransformation.....	55
3.3.1.1 Herstellung des Injektionsmixes.....	55
3.3.1.2 Herstellung der Injektionskapillaren.....	55
3.3.1.3 Mikroinjektion.....	56
3.3.1.4 Isolierung und Balancierung transgener Fliegen.....	57
3.3.2 Etablierung transgener Linien der Konstrukte pGMR- <i>crb</i> ^{intra} 38.1, pGMR-CD2- <i>crb</i> ^{intra} und pBD466- <i>crb</i> ^{intra} 38.1.....	58
3.4 Histologische Methoden.....	58
3.4.1 Verwendete primäre und sekundäre Antikörper.....	58
3.4.2 Antikörperfärbungen an Embryonen.....	59
3.4.3 Antikörperfärbungen an Imaginalscheiben.....	60
3.4.3.1 Nachweis mit einem HRP-gekoppelten Antikörper.....	61
3.4.4 X-Gal-Färbung an Embryonen.....	62
3.4.5 X-Gal-Färbungen an Imaginalscheiben.....	63
3.4.6 Präparation embryonaler Kutikula.....	64
3.4.7 Versuche an pupalen Augenimaginalscheiben.....	64
3.4.7.1 Altersbestimmung und zeitliches Synchronisieren von pupalen Imaginalscheiben.....	64
3.4.7.2 Cobaltsulfid-Färbungen pupaler Augenimaginalscheiben.....	65
3.4.7.3 Antikörperfärbungen an pupalen Augenimaginalscheiben.....	66
3.4.8 Osmium-Fixierung adulter Augen und anschließende Herstellung von Semidünnschnitten	66
3.4.9 Analyse adulter Augen mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops (REM)	67

3.4.10 Nachweis von Zelltod an Imaginalscheiben bestrahlter und unbestrahlter L3-Larven.....	68
3.4.10.1 Acridin-Orange-Färbungen an unbestrahlten Imaginalscheiben.....	68
3.4.10.2 Acridin-Orange-Färbungen an bestrahlten Imaginalscheiben.....	68
4. Ergebnisse.....	69
4.1 Charakterisierung des <i>crumbs</i> -induzierten „rauhes“ Augenphänotyps.....	69
4.1.1 Voruntersuchung der Gal4-Treiberlinien: Temperaturabhängigkeit der verwendeten Stämme.....	70
4.1.2 Phänotypische Analyse nach Überexpression verschiedener UAS- <i>crumbs</i> -Transgene unter der Kontrolle von <i>elav</i> -Gal4, Gal4 ^{sev} und GMR-Gal4 im Auge von <i>Drosophila</i>	71
4.1.3 Rasterelektronenmikroskopische Analyse verschiedener UAS- <i>crb</i> -induzierter Augenphänotypen.....	73
4.1.3.1 Zusammenfassung der rasterelektronenmikroskopischen Analysen.	83
4.1.4 Semidünnschnitte der Augen von Tieren ausgewählter UAS- <i>crb</i> ^{intra} -Kreuzungen.....	86
4.1.4.1 Semidünnschnitte adulter Augen, in denen verschiedene UAS- <i>crb</i> -Konstrukte unter der Kontrolle von Gal4 ^{sev} ektopisch exprimiert wurden	87
4.1.4.2 Semidünnschnitte adulter Augen, in denen verschiedene UAS- <i>crb</i> -Konstrukte unter der Kontrolle von GMR-Gal4 ektopisch exprimiert wurden.....	92
4.1.4.3 Zusammenfassung: Semidünnschnitte adulter Augen	96
4.1.5 Cobaltsulfid-Färbungen an pupalen Augenimaginalscheiben.....	98
4.1.5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse der Cobaltsulfidfärbungen.....	110
4.1.6 Untersuchung des Zelltods in der Augenimaginalscheibe des 3. Larvalstadiums und pupaler Imaginalscheiben.....	111
4.1.6.1 Zelltod in wildtypischen larvalen Augenimaginalscheiben.....	112
4.1.6.2 Auswirkungen von ektopischer <i>crumbs</i> -Expression auf den Zelltod in larvalen (L3-)Augenimaginalscheiben.....	114
4.1.6.2.1 Überexpression der transgenen Konstrukte UAS- <i>crb</i> ^{intra} und UAS- <i>crb</i> ^{intra} Y ₁₀ E ₁₆ führt zu einer Unterdrückung des Zelltods posterior zur morphogenetischen Furche.....	114
4.1.6.2.2 Überexpression des transgenen Konstruktes UAS- <i>crb</i> ^{intr} ΔERLI liefert ein fast wildtypisches Zelltodmuster.....	115

4.1.6.2.3	Überexpression von UAS- <i>crb</i> ^{intra} und UAS- <i>crb</i> ^{intra} Y ₁₀ E ₁₆ unter der Kontrolle von Gal4 ^{sev} und GMR-Gal4 resultiert in einem nahezu identischen Muster.....	115
4.1.6.3	Auswirkungen von ektopischer <i>crumbs</i> -Expression auf den natürlichen programmierten Zelltod pupaler Augenimaginalscheiben.....	119
4.1.7	Zusammenfassung der in 4.1 analysierten Überexpressionsphänotypen	124
4.2	Suche nach Modifikatoren eines Crumbs-induzierten „rauhem“ Augenphänotyps („Modifier Screen“)	128
4.2.1	Ergebnisse des „Modifier Screens“.....	129
4.2.1.1	„Modifier Screen“ mit Gal4 ^{sev} - <i>crb</i> ^{intra} 38.1.2b.....	129
4.2.1.2	„Modifier-Screen“ mit GMR-Gal4- <i>crb</i> ^{intra} 38.1.2b und dem „Defizienzen-Kit“.....	130
4.2.1.3	Tests der gefundenen Enhancer in einer Kreuzung mit GMR-Gal4-UAS- <i>crb</i> ^{intra} ΔERLI zeigen keine Modifikation des rauhen Augenphänotyps.....	143
4.2.2	Nähere Kartierung der im Modifier-Screen gefundenen Defizienzen	143
4.2.2.1	Abschwächung des mutanten <i>crumbs</i> -Phänotyps der Linien <i>crb</i> ^{11A22} und <i>crb</i> ^{8F105} durch starke Enhancer des rauhen Augenphänotyps.....	144
4.2.2.2	Abschwächung der Kutikula-Fehlbildungen bei <i>sdt</i> ^{XD96} -, <i>sdt</i> ^{XN05} - und <i>baz</i> ^{Xi106} -Mutanten durch starke Enhancer des rauhen Augenphänotyps	151
4.2.2.3	Auswahl von Kandidatenregionen für weitere Untersuchungen.....	154
4.2.3	Abschließende Kartierung der gefundenen Kandidatenregionen.....	155
4.2.3.1	Region 07D1-6 (Df(1)C128, Linien # 2894 und # 949).....	156
4.2.3.2	Region 29C-30C (Df(2L)N22-14, Linie # 2892).....	166
4.2.4	Testen von Genen, welche am Prozess des „dorsalen Rückenschlusses“ beteiligt sind.....	173
4.2.5.	Zusammenfassung der Ergebnisse des Modifier-Screens und anschließender Kartierungen.....	177
5.	Diskussion	188
5.1	Analyse des „rauhem“ Augenphänotyps.....	188
5.1.1	Abhängigkeit der Crumbs-induzierten Defekte vom Ort der Überexpression.....	190
5.1.2	Funktion der Subdomänen des Crumbs-Proteins bei der Erzeugung des Crumbs-induzierten rauhen Augenphänotyps.....	194

5.1.3	Vergleich der beobachteten Phänotypen mit bereits beschriebenen Effekten von ektopischer <i>Crumbs</i> -Expression in Auge und Embryo	195
5.1.4	Ein Modell für die Rolle von <i>Crumbs</i> während der Etablierung der zellulären Geometrie in der Retina von <i>Drosophila</i>	197
5.2	Modifikatoren der Genwirkung von <i>crumbs</i>	206
5.2.1	Die Kartierung von Region 07D1-6 läßt keinen eindeutigen Schluss auf ein einziges Kandidatengen zu.....	206
5.2.2	In Region 29C-30C kann <i>raw</i> ein möglicher Interaktionspartner von <i>Crumbs</i> sein.....	210
5.2.3	<i>Rho1</i> , <i>faint sausage</i> und ein unbekanntes Gen in Region 08A-09A sind mögliche Interaktionspartner von <i>Crumbs</i>	212
5.2.4	Betrachtung der mit unterschiedlichen Strategien gefundenen Kandidaten für eine Interaktion mit <i>Crumbs</i>	215
6.	Zusammenfassung.....	219
7.	Literatur.....	220
8.	Anhang.....	235
8.1	Abkürzungen.....	235
8.2	Kartierungen.....	236
8.2.1	Df(1)A113;Dp(1;2)64b (Linie #940).....	236
8.2.2	Df(2L)b87e25 (Linie #3138) und Df(2L)TE35BC-24 (Linie #3588)....	239
8.2.3	Df(2L)cact-255rv64 (#2583).....	244
8.2.4	Df(2R)en-A (#190).....	245
8.3	Defizienzenkollektion.....	251

Erklärung

Lebenslauf

1. Einleitung

Die meisten Zellen eines Organismus sind polar aufgebaut. Diese Polarität und Asymmetrie erlaubt es ihnen, bestimmte Aufgaben auszuführen, wie z.B. vektoriellen Transport, direkte Migration oder auch Weiterleitung von Signalen.

Polarität manifestiert sich in Zellen in Form verschiedener charakteristischer Aspekte wie einer polarisierten Organisation des Zytoskeletts, asymmetrischer Lokalisation zellulärer Komponenten und Organellen sowie in einer polarisierten Organisation von Membran und Membran-assoziierten Komponenten. Hierdurch kommt es, wie z.B. bei Neuronen oder Epithelzellen, zu einer sehr ausgeprägten Zellpolarität, verbunden mit einer morphologischen und funktionellen Trennung bestimmter Oberflächendomänen.

Genauere Untersuchungen beschäftigen sich derzeit mit der Suche nach den Faktoren sowie Mechanismen, die zur Etablierung der Zellpolarität führen und diese im Anschluss daran stabil aufrecht erhalten. Hierbei ist im Hinblick auf die verschiedenen Aspekte, die zur Zellpolarität beitragen, vor allem von Interesse, wie die Asymmetrie der Plasma-Membran sowie die asymmetrische Verteilung der Organellen kontrolliert und die asymmetrische Organisation des Zytoskeletts reguliert werden. Zudem stellt sich die Frage, wie all diese Abläufe zeitlich und räumlich während der Bildung des Epithels koordiniert werden, d.h. in welcher Reihenfolge welche Aspekte der Polarität in der Zelle realisiert werden.

Um diese Vorgänge aufklären zu können, ist es notwendig, ein geeignetes System zu finden oder zu etablieren, in welchem sie mit vertretbarem zeitlichen oder experimentellen Aufwand untersucht werden können. Ein solches System stellen beispielsweise epitheliale Gewebe (von *Drosophila*) dar.

Eines der Gene, das in Epithelzellen an der Ausbildung der Zellpolarität sowie ihrer Aufrechterhaltung mitwirkt, ist das *Drosophila*-Gen *crumbs*, das im Rahmen dieser Arbeit näher analysiert wurde.

1.1 Kontrolle der Zellpolarität in epithelialen Zellen

1.1.1 Epithelien

Eines der bislang am besten untersuchten und verstandenen Beispiele für die Kontrolle und Etablierung von Zellpolarität sind Epithelzellen.

Epithelzellen schließen sich zu zusammenhängenden Zellschichten zusammen, die als Epithelien oder Abschlussgewebe bezeichnet werden. Sie üben unterschiedlichste Funktionen aus und können dem

Schutz (Epidermis der Haut), der Sekretion (organisiert in Drüsen), der Resorption (Epithel der Darmzotten) oder der Reizaufnahme (Sinneszellen von Sinnesepithelien) dienen.

Die meisten Epithelien ruhen, vermittelt durch Zell-Matrix-Haftverbindungen, auf einer Basallamina, einer speziellen Form der extrazellulären Matrix, die sie vom darunterliegenden Bindegewebe abgrenzt und in den meisten Fällen von den Epithelzellen selbst sezerniert wird.

Abhängig von ihrer Form kann man Platten-, Zylinder- und kubische Epithelien unterscheiden, welche ein- oder mehrschichtig organisiert sein können.

Allen Epithelzellen gemein ist trotz diverser Unterschiede in Gestalt und Funktion innerlich und äußerlich eine polare apiko-basale Organisation. Gleichzeitig sind die Zellen eines Epithels eng miteinander verbunden. Diese Adhäsivität gewährleistet die Integrität und mechanische Stabilität des gesamten Gewebeverbandes, und die Zell-Zell-Kontakte sind in der Regel so eng, dass das Epithel auch für kleine Moleküle undurchlässig ist.

Hierdurch stellen Epithelien molekulare Diffusionsbarrieren dar. Gerichteter Transport von Wasser, Ionen und verschiedenen anderen Stoffen in oder aus einem umschlossenen Kompartiment wird durch die epithelialen Zellen kontrolliert.

Zwischen beiden Eigenschaften, Polarisation der Zellen und Bildung von Zellkontakten zueinander, besteht eine enge Wechselbeziehung, und sie sind Voraussetzungen für die Integrität eines epithelialen Gewebeverbandes, welcher ständig durch morphogenetische Bewegungen, Zellteilungen und Zelltod bedroht wird.

1.1.2 Polarität epithelialer Zellen

An der Polarität von Zellen sind drei verschiedene Aspekte beteiligt: Membranpolarität, eine polare Organisation des Zytoskeletts sowie eine polare Organisation und Sortierung von Zellorganellen und membranassoziierten Komponenten.

Die Plasmamembran einer typischen Epithelzelle ist in eine apikale und eine basolaterale Domäne unterteilt, die sich nicht nur funktionell, sondern auch in ihrer Protein- und Lipidzusammensetzung unterscheiden. So sind in der apikalen Membrandomäne, welche nach außen oder in ein Lumen hinein gerichtet ist, vor allem Glycosphingolipide angereichert, wohingegen in der basolateralen Membrandomäne, welche den Kontakt zur Basallamina und benachbarten Zellen herstellt, bevorzugt Phosphatidylcholine zu finden sind (Eaton und Simons, 1995; Simons, 1995).

Die basolateralen Membrandomänen zeichnen sich zudem durch Zell-Zell-Kontaktstrukturen aus, welche je nach ihrer ultrastrukturellen Zusammensetzung der Adhäsion, als Diffusionsbarrieren oder der intrazellulären Kommunikation dienen.

Auch die zytoplasmatische Organisation von Epithelzellen ist polar ausgerichtet.

Komponenten des Aktinzytoskeletts (z.B. Villin & Fimbrin), konzentrieren sich im apikalen Bereich der Epithelzellen. Ein aus kreisförmigen Bündeln von Aktinfilamenten zusammengesetzter Adhäsionsgürtel (*zonula adherens* oder ZA) ist am apikalen Ende von Epithelzellen lokalisiert (Übersichtsartikel von Mays et al., 1994; Eaton und Simons, 1995).

β _H-Spektrin, eine Komponente des kortikalen Zytoskeletts, welche essentiell für die Morphogenese epithelialer Zellen ist, ist ebenfalls apikal lokalisiert (McKeown et al., 1998; Thomas und Kiehart, 1994). Spektrine sind lange, zu Tetrameren verbundene Proteine, welche aus je zwei α - und zwei β -Untereinheiten bestehen (Übersichtsartikel Bennett und Baines, 2001).

Das auf Spektrin basierende Membran-Zytoskelett (SBMS = *spectrin based membrane skeleton*) ist ein verästeltes Netzwerk, welches ein Geflecht aus Spektrin und F-Aktin mit verschiedenen Membran-Kompartimenten der Zelle verbindet. Jedes dieser SBMSs wird hierbei über integrale Membranproteine und Phospholipide mit der Zellmembran verbunden (De Matteis and Morrow, 2000). Spektrin und F-Aktin stellen hierdurch, mit der Plasmamembran verbunden, die Basis für Zellformveränderungen sowie für die Stabilität von epithelialen wie auch nicht-epithelialen Zellen dar. Spektrine werden generell über Adapter-Proteine an die Zellmembranen rekrutiert, die so das SBMS an integrale Membranproteine koppeln (Bennett und Baines, 2001). Bislang sind zwei Familien von Adapter-Proteinen näher untersucht worden: die Ankyrine und die Proteine der Protein-4.1-Familie. Letztere bilden einen Komplex zwischen der Aktin-bindenden Domäne von β -Spektrin und F-Aktin (Marfatia et al., 1997). Protein-4.1 ist Teil einer größeren Protein-Familie, welche die sogenannte FERM-Domäne (4.1/Ezrin/Radixin/Moesin) (Chishti et al., 1998) besitzen, die kortikales F-Aktin an eine Vielzahl integraler Membranproteine binden kann (Tsukita and Yonemura, 1999).

Neben dem Aktin-Zytoskelett sind auch Zentriolen in Zellen meist in einer apikalen Position lokalisiert, und es wird angenommen, dass das apikale Zytoskelett in Verbindung mit Spindelorientierung und (asymmetrischer) Verteilung bestimmter Proteine bei einer späteren (asymmetrischen) Zellteilung involviert ist..

Zusätzlich sind auch Tubulinfasern, die eine interne Polarität besitzen, apiko-basal in Zellen ausgerichtet, wobei ihre Plus-Enden basal liegen (Übersichtsartikel Nelson, 1992).

Für die Etablierung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität ist ein gerichteter Transport der apikal und basolateral lokalisierten Proteine sowie damit zusammenhängend eine differenzielle Proteinsortierung erforderlich. Dieser Prozess schließt den Golgi-Apparat, das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN), das Zytoskelett und die Plasmamembran ein. Hinzu kommen auch in den Proteinen selbst enthaltene Lokalisierungssignale (Übersichtsartikel von Matter und Mellman, 1994).

1.1.3 Zell-Zell-Kontaktstrukturen

Epithelien zeichnen sich durch spezialisierte, ultrastrukturell erkennbare Zell-Zell-Verbindungen (*junctions*) entlang ihrer basolateralen Zelloberfläche aus. Diese Kontakte zwischen epithelialen Zellen untereinander wie auch zwischen Zellen und einem Substrat sind Voraussetzung für die Ausbildung der Polarität sowie Integrität und Funktion von Epithelien.

Einige Verbindungen vermitteln hierbei Adhäsion zwischen den Plasmamembranen benachbarter Zellen, andere ermöglichen den Transfer von Ionen und kleinen Molekülen von Zelle zu Zelle. Für einige Zell-Zell-Kontaktstrukturen ist auch eine Beteiligung an Signalprozessen, die Differenzierung, Wachstum und Bewegung kontrollieren, nachgewiesen..

Grundsätzlich lassen sich drei Klassen von Zellverbindungen unterscheiden:

- Undurchlässige Verbindungen (*tight junctions* oder *zonula occludens*)
- Haftverbindungen (z.B. *zonula adherens* und Desmosomen)
- Kommunizierende Verbindungen (z.B. *gap junctions*).

1.1.3.1 Undurchlässige Verbindungen, *tight junctions*

Tight junctions („Verschlusskontakte“, TJ) sind in den Epithelien von Vertebraten die am weitesten apikal gelegenen Zellverbindungen und werden auch als *zonula occludens* (ZO) bezeichnet. Sie befinden sich in Vertebratenzellen an der Nahtstelle von apikaler und basolateraler Membrandomäne und besitzen zum einen eine Barriere-Funktion (*barrier function*), indem sie Flüssigkeiten mit unterschiedlicher Zusammensetzung trennen (z.B. im Darmepithel), zum andern kommt ihnen eine Rolle bei der biochemischen Trennung von Membranbestandteilen von apikalen und basolateralen Plasmamembran-kompartimenten zu (*fence function*) (Übersichtsartikel: Eaton und Simons, 1995; Gumbiner, 1996; Nelson, 1992; Simons, 1995; Yeaman et al., 1999a).

Mehrere integrale Bestandteile der *tight junctions* konnten bislang molekular charakterisiert werden. Occludin (Furuse et al., 1993) sowie die Proteine der Claudin-Familie (Furuse et al., 1998; Morita et al., 1999) sind jeweils durch vier Transmembrandomänen gekennzeichnet, wobei N- und C-Terminus jeweils intrazellulär lokalisiert sind (Übersichtsartikel von Tsukita und Furuse, 1999).

Gemäß einem aktuellen Modell sind Occludin und Claudine direkt an der Bildung von *tight junctions* beteiligt (Tsukita and Furuse, 2000). Occludin und eine je nach Gewebe unterschiedliche Kombination von Claudinen polymerisieren hierbei zum Grundgerüst einer jeden *tight junction*. Dieser Grundstruktur intrazellulär angelagert befindet sich ein Multi-Proteinkomplex, welcher die *tight junction* mit dem Aktin-Zytoskelett verbindet (Übersichtsartikel von Tsukita, 1999).

Ein weiteres Molekül, JAM (**J**unctional **A**dhesion **M**olecule), kodiert für ein integrales Membranprotein der Immunglobulin-Superfamilie, welches mit der *tight junction* assoziiert ist (Martin-Padura et al., 1998). Ihm wird eine bislang putative Rolle bei der Regulation der Etablierung der *tight junctions* zugeschrieben (Liu et al., 2000).

1.1.3.2 Haftverbindungen

Haftverbindungen verknüpfen die Zytoskelett-Bestandteile einer Zelle mit denen der angrenzenden Zelle und/oder mit der extrazellulären Matrix (ECM). Nach Struktur und Funktion lassen sich zwei Typen solcher Kontaktstrukturen unterscheiden:

- Adhäsive Verbindungen
- Desmosomen und Hemidesmosomen.

Beide Gruppen von Kontaktstrukturen zeichnen sich durch eine ultrastrukturell erkennbare elektronendichte, zytokortikale Auflagerung aus, die in Kontakt mit Mikrofilamenten steht. Sie bestehen aus Transmembranproteinen, deren extrazelluläre Anteile in der Lage sind, calciumabhängige homophile Bindungen miteinander einzugehen und so eine adhäsive Bindung von Zellen untereinander herzustellen. Ihre intrazellulären Domänen binden zytoplasmatische Proteine, die wiederum einen Kontakt zum Zytoskelett herstellen. Während adhäsive Verbindungen Anheftungspunkte für Aktinfilamente (Mikrofilamente) sind, dienen Desmosomen/Hemidesmosomen der Bindung von Intermediärfilamenten.

Adhäsive Verbindungen (*adherens junctions*, AJ) treten in vielen Zelltypen, auch in nicht-epithelialen Geweben auf. Man findet sie dort meist in Form von vereinzelt, punktförmigen Kontaktstellen (*spot adherens junctions*, SAJ). In Epithelien vereinigen sie sich zum sogenannten Adhäsionsgürtel (*zonula adherens*, ZA). Dessen gerichtete Kontraktion ermöglicht morphogenetische Bewegungen, wie etwa die Faltung von Epithelien zu Röhren, z.B: bei der Bildung des Neuralrohres aus der Neuralplatte.

Eine zentrale Komponente der *zonula adherens* stellt das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin dar. Es geht in einer Ca^{2+} -abhängigen Weise homophile Interaktionen ein und verknüpft so benachbarte Zellen. Mit seiner zytoplasmatischen Domäne bindet es an β -Catenin, welches dann über α -Catenin den Kontakt zum Aktinzytoskelett herstellt (Übersichtsartikel von Steinberg und McNutt, 1999).

Desmosomen (*macula adherens*) halten Epithelzellen zusammen, indem sie als Verankerungspunkte für Intermediärfilamente wie Keratin oder Desmin dienen. Desmogleine und Desmocolline, Mitglieder aus der Cadherin-Superfamilie, fungieren hier als Vermittler für die Adhäsion zwischen Zellen.

Ihre Verbindung zu den Intermediärfilamenten erfolgt dabei über zytoplasmatische Proteine, wie Desmoplakin und Plakoglobin.

Hemidesmosomen schließlich verbinden die Basallamina mit den zellulären Keratin-Intermediärfilamenten. Ein spezielles Integrin vermittelt hierbei die Adhäsion mit Mikrofilamenten und bindet extrazellulär an verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM), wie z.B. Fibronectin und Laminin (Hynes, 1992). Seine intrazelluläre Domäne steht in Kontakt mit Aktin-assoziierten Proteinen wie Vinculin und Paxilin.

Die in vielen Epithelien durch Cadherine vermittelte Zell-Zell-Verbindung sowie der Integrin-abhängige Zellkontakt zur extrazellulären Matrix sind gemeinsam an der Generierung, Aufrechterhaltung und Weitergabe einer äußeren und inneren Polarität der Epithelzellen beteiligt (Übersichtsartikel von Eaton und Simons, 1995; Drubin und Nelson, 1996).

1.1.3.3 Kommunizierenden Verbindungsstrukturen, *gap junctions*

Gap junctions („Kontaktzonen“) sind eine der häufigsten Zellverbindungen und in fast allen Geweben vorhanden. Sie gehören zur Gruppe der kommunizierenden Verbindungen und verbinden Zellen sowohl elektrisch als auch metabolisch miteinander. Der Transport von Ionen und kleineren, wasserlöslichen Molekülen von Zelle zu Zelle wird durch eine porenähnliche Struktur ermöglicht, welche durch Connexine gebildet wird.

Connexine sind Transmembranproteine. Je sechs von ihnen bilden einen als Connexon bezeichneten Hohlzylinder, und Connexonen benachbarter Zellen wiederum bilden einen durchgehenden Kanal zwischen den Plasmamembranen der beiden Zellen. In *gap junctions* können Hunderte von Connexonen zusammengefasst sein (Übersichtsartikel von Bryant, 1997).

1.2 Epithelien in *Drosophila*

1.2.1 Primäre und sekundäre Epithelien

In *Drosophila* lassen sich primäre und sekundäre Epithelien unterscheiden.

Im Blastoderm sind zunächst alle Zellen mit Ausnahme der Polzellen als einschichtiges Epithel organisiert. Durch Invagination bilden sich im Verlauf der Embryogenese weitere Epithelien, deren Zellen ihre ursprüngliche polare, epitheliale Organisationsform beibehalten. Diese Art von Epithelien werden als „primäre Epithelien“ bezeichnet.

Sie schließen das Ektoderm und einige seiner Derivate, z.B. die Epidermis oder das Auge, ein und sind durch gemeinsame Eigenschaften, wie die Ausbildung einer *zonula adherens* und die apikale Expression des Crumbs-Proteins, gekennzeichnet (Abb. 1.1 B).

Zellen des Endoderms und Mesoderms verlassen den Verband des primären Epithels im Verlauf der Gastrulation oder zu späteren Entwicklungsstadien (z.B. das posteriore Endoderm im Stadium 11). Diese Zellen verlieren ihre epitheliale Organisation und werden mesenchymal. Sie besitzen keine ZA, weisen keine Crumbs-Expression auf und werden durch basolaterale Signale polarisiert. In späteren Entwicklungsstadien nehmen sie wieder Epithelstruktur an (Übersichtsartikel von Tepass, 1997).

Im Gegensatz zu den primären Epithelien werden diese, z.B. der Mitteldarm mit mesenchymaler Abstammung, als „sekundäre Epithelien“ bezeichnet.

1.2.2 Zelluläre Kontakte in *Drosophila*

Arthropoden, wie *Drosophila melanogaster*, besitzen, ebenso wie Vertebraten, *gap junctions* und *adherens junctions*, jedoch keine Desmosomen oder *tight junctions*. (Übersichtsartikel von Tepass, 1997; Müller, 2000).

Stattdessen findet man in Arthropoden *septate junctions* (SJs), von denen angenommen wird, dass sie die Funktion der *tight junctions* übernehmen können. Sie verteilen sich jedoch, anders als *tight junctions*, die in Vertebraten noch oberhalb der ZA lokalisiert sind, über einen größeren Bereich der lateralen Membran unterhalb der *zonula adherens* (ZA). Bei *Drosophila* lassen sich diese septierten Zellverbindungen auf elektronenmikroskopischer Ebene ab Stadium 14 erkennen, und es lassen sich zwei Klassen von Septen unterscheiden. Epithelien ektodermalen Ursprungs weisen *pleated septate junctions* auf, wohingegen die *smooth septate junctions* überwiegend im Endoderm auftreten.

1.2.3 Die Bildung der ZA in *Drosophila*

Die Position der *zonula occludens* bei Vertebraten an der Nahtstelle zwischen apikaler und basaler Membrandomäne nimmt in *Drosophila melanogaster* die *zonula adherens* ein.

Die *zonula adherens* ist die erste Zell-Zell-Kontaktstruktur, die während der Embryogenese gebildet wird. Ihre Entstehung lässt sich in drei Phasen gliedern, die an die Expression distinkter Gene gebunden sind.

Im Verlauf der Zellularisierung (Stadium 5) lassen sich auf den lateralen Zelloberflächen *spot adherens junctions* (SAJ) identifizieren, die einen Cadherin-Catenin-Komplex aus DE-Cadherin (Shotgun, Shg), $D\alpha$ -Catenin und $D\beta$ -Catenin (Armadillo, Arm) enthalten (Grawe et al., 1996; Müller und Wieschaus, 1996; Tepass, 1996).

Im weiteren Verlauf der Entwicklung konzentrieren sich diese *spot adherens junctions* an der apikalen Grenze der lateralen Membranen (ab Gastrulation, Stadium 6/7) und bilden dort in Epithelien ektodermalen Ursprungs ab Stadium 11 die durchgehende *zonula adherens* (ZA, Müller und Wieschaus, 1996; Tepass und Hartenstein, 1994), welche die Zellen apikal wie ein Ring umschliesst. In *crumbs*-Mutanten ist die Bildung dieser ZA gestört, was in einem Verlust von Zellpolarität und Gewebeintegrität resultiert. In *stardust*-Mutanten ist hingegen bereits die apikale Konzentration der SAJs gestört, weshalb der mutante *stardust*-Phänotyp etwas stärker ausfällt und früher erkennbar wird als der von *crumbs* (Grawe et al., 1996).

1.3 Die Rolle von Crumbs bei der Etablierung und Aufrechterhaltung von epithelialer Polarität in *Drosophila*

1.3.1 Das Gen *crumbs*

Das Gen *crumbs*, welches auf dem rechten Arm des 3. Chromosoms (95F) von *Drosophila* lokalisiert ist, wurde Mitte der achtziger Jahre bei einer systematischen Suche nach zygotisch letalen Mutationen identifiziert, die zu Defekten im Kutikulamuster des späteren Embryos führen (Jürgens et al., 1984; Wieschaus et al., 1984). Isoliert wurde es schließlich im Rahmen einer Durchmusterung von cDNA-Bibliotheken mit Proben aus Nukleotidsequenzen der Gene *Notch* (N) und *Delta* (DI) unter reduzierten Stringenzbedingungen (Knust et al., 1987).

Crumbs kodiert für ein Transmembranprotein von 2146 Aminosäuren (AS), dessen extrazelluläre Domäne durch 30 EGF-ähnliche (EGF = Epidermaler Wachstums-Faktor) Wiederholungen charakterisiert ist, sowie vier Motive, die mit der globulären Domäne (G-Domäne) von Laminin-A verwandt sind (Abb.1.1A; Patthy, 1991; Tepass et al., 1990).

Trotz ihrer Größe und obwohl ihre Subdomänen identifiziert und bekannt sind, konnte der extrazellulären Domäne bislang während der embryonalen Epithelentwicklung keine spezifische Funktion nachgewiesen werden (Engelbert, 1997). Neueste Studien, die sich mit der Funktion von *Crumbs* während der Augenentwicklung von *Drosophila* befassen, geben jedoch Grund zur Annahme, dass die extrazelluläre Domäne hier sowohl in der Etablierung und Aufrechterhaltung der apiko-basalen Polarität der Photorezeptorzellen sowie der Integrität der ZA eine Rolle spielt (Pellikka et al., 2002; Izaddoost et al., 2002; Johnson et al., 2002). Jedoch existieren noch keine näheren Erkenntnisse, welche Bereiche der extrazellulären Domäne genau für diese Funktionen verantwortlich sind.

Aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse zur Funktion von *Crumbs* in Epithel- und Augenentwicklung ist fraglich, ob sich die am Auge gewonnenen Befunde ohne Einschränkungen auf das embryonale Epithel übertragen lassen.

Essentiell und für die Funktion des Crumbs-Proteins in Epithelzellen maßgeblich ist die nur 37 Aminosäuren lange intrazelluläre (zytoplasmatische) Domäne.

So zeigte die Analyse des Nullallels *crb*^{8F105}, bei dem die Einführung eines vorzeitigen Stopcodons in einem Fehlen der 23 C-terminalen Aminosäuren resultiert, dass es durch diese Deletion des carboxyterminalen Bereiches der zytoplasmatischen Domäne zu einem vollständigen Funktionsverlust kommt, obgleich noch ein Restprotein gebildet wird, (Wodarz et al., 1993).

Desweiteren vermag eine membrangebundene Form der intrazellulären Domäne den *crb*-mutanten Phänotyp in Überexpressionsstudien im gleichen Ausmaß abzuschwächen wie das vollständige Crumbs-Protein (Wodarz et al., 1995).

Durch detaillierte Funktionsanalysen der zytoplasmatischen Domäne konnten drei für eine Abschwächung des Phänotyps entscheidende Bereiche identifiziert werden, deren Bedeutung durch die Konservierung ihrer Sequenz in *Tribolium castaneum* (Hülsmann-Volkert, 1999), *Homo sapiens* (den Hollander et al., 2001) und *Caenorhabditis elegans* (Bossinger et al., 2001) unterstrichen wird.

Einer dieser Bereiche, das carboxyterminale Aminosäuremotiv „-ERLI“, interagiert mit Stardust (Sdt), einem Protein der MAGUK-Familie (**M**embrane **A**ssociated **G**uanylate **K**inase), und mit dem PDZ (**P**SD-95/**D**LG/**Z**O-1)-Protein Discs lost (Dlt) (Bachmann et al., 2001; Hong et al., 2001). Beide Proteine sind wie Crumbs selbst an der Aufrechterhaltung der epitheliären Polarität beteiligt.

Über Sequenzvergleich verschiedener Crumbs-Homologer (Abb.1.1 A) konnte eine zweite hoch konservierte Region ermittelt werden. Spezifisch sind dort die beiden Aminosäuren in den Positionen 10 und 16 der zytoplasmatischen Domäne, welchen eine Funktion bei der Unterdrückung des Crumbs-induzierten Zelltods im Embryo zugesprochen wird (Klebes und Knust, 1999).

Die dritte Domäne, welche teilweise mit der vorherigen überlappt, ist eine sogenannte FERM-Domäne (**4**.1-Protein/**E**zrin/**R**adixin/**M**oesin) (Chishti et al., 1998), für deren Funktion speziell ein Arginin in Position 7 und das Tyrosin in Position 10 der zytoplasmatischen Domäne verantwortlich sind. FERM-Domänen sind in der Regel an der Bindung kortikalen F-Aktins an verschiedene integrale Membranproteine beteiligt (Tsukita und Yonemura, 1999).

Die FERM-Domäne von Crumbs ist essentiell für die Rekrutierung von Dmoesin und β -Heavy-Spektrin (β_H), einer Komponente des apikal lokalisierten und auf **S**pektrin **b**asierenden **M**embran**s**keletts (SBMS = „spectrin-based membrane skeleton“).

Ob die Komponenten des vom ERLI-Motiv organisierten subapikalen Komplexes (SAC), Sdt und Dlt, direkt mit DMOESIN und β_H -Spektrin interagieren oder nur auf dem Umweg über Crumbs, wurde bislang nicht eindeutig entschieden (Pellikka et al., 2002; Medina et al., 2002b).

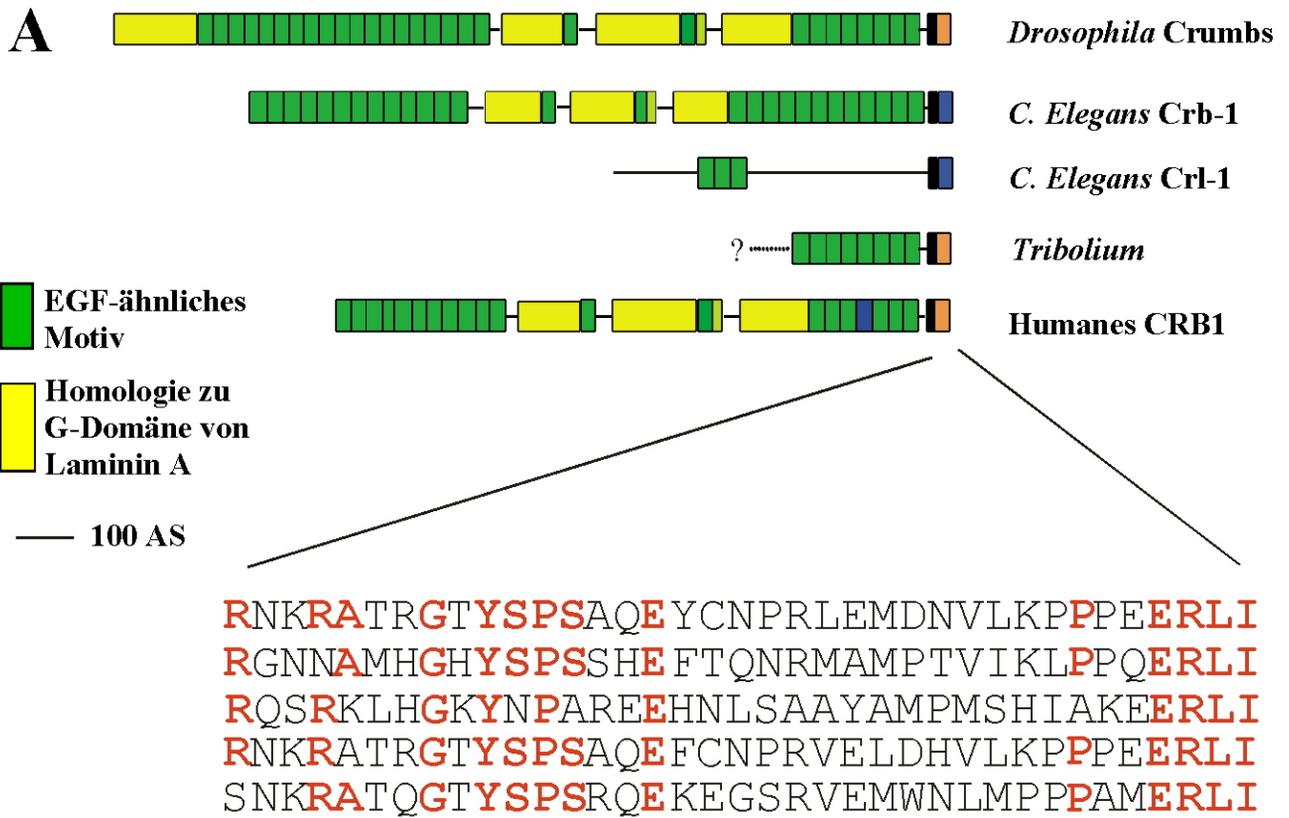
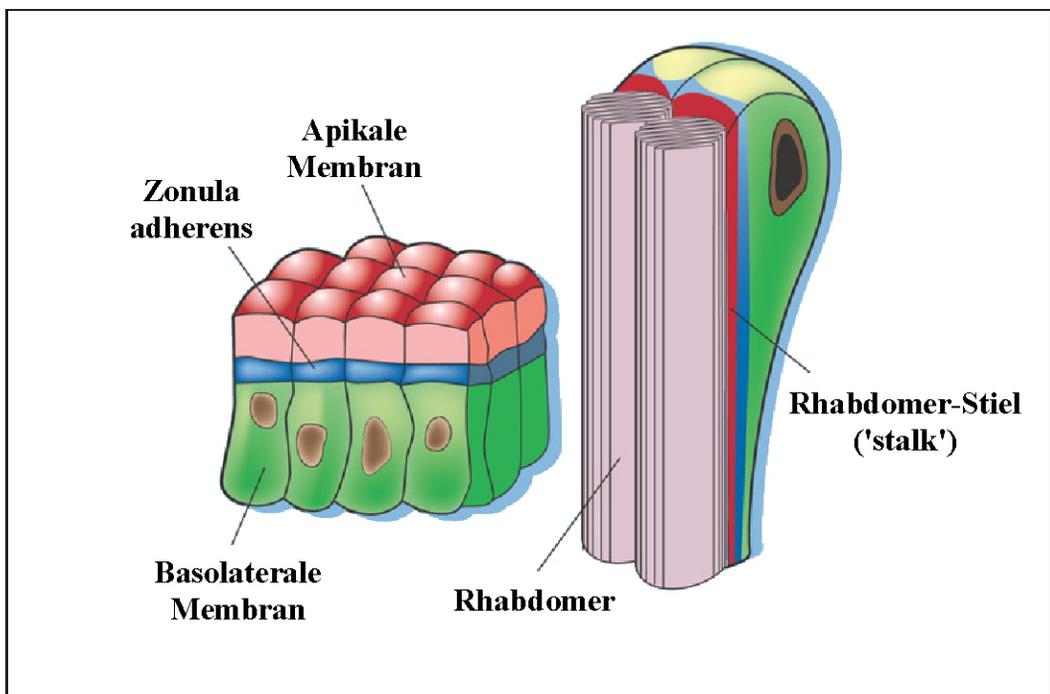
**B**

Abb. 1.1: (A) Struktur des Crumbs Proteins von *Drosophila* und bekannten Homologen sowie Sequenzvergleich der zytoplasmatischen Domänen. Die zwischen den verschiedenen Organismen konservierten Aminosäuren sind in rot gekennzeichnet.

(B) Vergleich der Morphologie von Epithelzellen (links) und Photorezeptorzellen des Auges (rechts)
 (Bild übernommen aus Pichaud und Desplan, 2002).

1.3.2 Das embryonale Expressionsmuster von Crumbs und der Phänotyp *crumbs*-mutanter Embryonen

Homozygot mutante *crb*-Embryonen zeichnen sich durch embryonale Letalität und einen charakteristischen Kutikulaphänotyp aus. Die Embryonen zeigen nicht mehr die wildtypische, zusammenhängende, strukturierte Kutikula, sondern nur einzelne kleine Fragmente, „Krümel“ (engl. *crumbs*; vgl. Ergebnisse, Abb 4.31B/C).

Die larvale Kutikula wird gegen Ende der Embryogenese von ektodermalen Epithelien, wie z.B. der Epidermis und den Tracheen sezerniert. Daher gibt eine Analyse der Struktur der Kutikula meist Aufschluss über den Zustand des sezernierenden Epithels. Der weitgehende Verlust von strukturierter Kutikula in *crumbs*-mutanten Embryonen weist auf schwerwiegende Defekte der Epidermis und anderer kutikulasezernierender Gewebe hin.

Die Defekte in verschiedenen epithelialen Geweben von *crumbs*-Mutanten sind unterschiedlich ausgeprägt, wobei die Epidermis am stärksten betroffen ist. Sie verliert durch Verlust oder Fehllokalisation der *zonula adherens* ihren Gewebeverband. Die epithelialen polaren Zellen nehmen daraufhin eine abgerundete Gestalt an und massiver ektopischer Zelltod eliminiert schließlich die meisten der epithelialen Zellen (Tepass & Knust, 1993; Tepass & Knust, 1990; Tepass et al., 1990; White et al., 1994). Die in der Eihülle verbleibenden Kutikularesten sind überwiegend Sezernierungsprodukte des Tracheensystems oder des Vorderdarms, welche nicht ganz so stark betroffen sind (Tepass & Knust, 1990).

Die zeitliche und räumliche Expression von *crumbs*, insbesondere in Bezug auf seine Rolle bei der Bildung der ZA, stimmt mit dem mutanten Phänotyp überein.

Das Crumbs Protein wird ab Stadium 6 in allen Epithelien ektodermaler Herkunft im apikalen Bereich der Plasmamembran exprimiert und definiert als Schlüsselkomponente eines Subapikalen Komplexes (SAC) die apikobasale Grenze (Tepass, 1996). Seine Expressionsdomäne liegt direkt oberhalb des Bildungsortes der ZA, und Crumbs ist durch seine Interaktion mit dem SBMS („spectrin based membrane skeleton“) an der korrekten Lokalisierung der ZA beteiligt (Übersichtsartikel von Yeaman et al., 1999b; Rashbass und Skaer, 2000, Medina et al., 2002b).

In frühen Entwicklungsstadien findet man das Protein im Endoderm und Ektoderm, jedoch nie im Mesoderm. Später, ab Stadium 11, findet man die *crb*-Expression auf epitheliale Zellen ektodermalen Ursprungs beschränkt: Epidermis, Vorderdarm, Hinterdarm, Tracheensystem, Speicheldrüsen, Malpighische Gefäße sowie die optischen Loben (Tepass & Knust, 1990; Tepass et al., 1990).

Auch in den larvalen Imaginalscheiben, aus denen sich ein grosser Teil der adulten kutikularen Strukturen ableitet, ist *crb*-Expression zu finden. Bei diesen Geweben handelt es sich ebenfalls um Epithelien ektodermalen Ursprungs, welche früh in ihrer Entwicklung aus dem Epithelverband

ausgegliedert und mit einer neuen Identität versehen werden (vgl. Augenentwicklung 1.4.2) (Tepass & Knust, 1990).

1.3.3 Überexpression von *crb*-Konstrukten

Die subzelluläre Lokalisation und der Funktionsverlust-Phänotyp von Crumbs deuten darauf hin, dass die Funktion von Crumbs für die Entwicklung von Epithelien und besonders für die Aufrechterhaltung der Polarität epithelialer Zellen benötigt wird. Um mehr Informationen über die Funktion zu gewinnen, wurden Konstrukte, die für die vollständige *crb*-Sequenz kodieren, mittels UAS/Gal4-System (Brand und Perrimon, 1993; vgl. Methoden 3.2.4) überexprimiert.

Ektopische Expression starker UAS-*crb* Transgene resultiert in embryonaler Letalität (Wodarz et al., 1995). Die betroffenen Embryonen lassen in Kutikulapräparaten Kopfdefekte, einen unvollständigen dorsalen Rückenschluss sowie eine stark zerfurchte ventrale Epidermis mit reduzierten Zähnchenbändern erkennen.

Immunohistochemische und histologische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Überexpression von *crb* zu einer Störung des epithelialen Zellverbandes und der zellulären Polarität führt.

So bleibt beispielsweise das apikale Markerprotein Stranded at Second (Sas, Schonbaum et al., 1992) nicht mehr auf seine apikale Membrandomäne beschränkt, sondern findet sich nun auch in ektopischen Positionen. Diese Fehlverteilung ist Ausdruck einer Apikalisierung der Plasmamembran zu Lasten basolateraler Anteile (Wodarz et al., 1995)

Mit der Störung der epithelialen Struktur durch die Überexpression geht eine Fehlverteilung von Komponenten der *zonula adherens* einher. So werden beispielsweise DE-Cadherin und Armadillo (Oda et al., 1994; Pfeifer und Wischhaus, 1990), zwei Bestandteile der ZA, auf basolaterale Positionen fehlverteilt (Grawe et al., 1996). Im weiteren Verlauf runden sich die epithelialen Zellen ab und das zunächst einschichtige Epithel wird mehrschichtig. Hier zeigt sich ein deutlicher Unterschied zur Situation bei Funktionsverlust. Zwar wird die epitheliale Struktur in beiden Fällen gestört und epitheliale Zellen verlieren ihre Polarität, doch wird im Falle des Funktionsverlustes die Zell-Zell-Adhäsion durch den Verlust der ZA und *spot adherens junctions* geschwächt, wohingegen ektopische Expression zu einer Fehlverteilung der ZA-Komponenten und einer Ausweitung der apikalen Plasmamembran führt. Ebenso findet man im Vergleich zum mutanten *crumbs*-Phänotyp bei ektopischer Expression keinen Zelltod (Grawe et al., 1996; Tepass, 1996; Wodarz et al., 1995).

1.3.4 Bislang bekannte Interaktionspartner und postulierte Funktion von Crumbs

Die Identifizierung und Charakterisierung von Interaktionspartnern ist von großem Nutzen, da dieses Wissen Aufschluss über die Funktion von Crumbs in seiner Rolle bei der Etablierung von Zellpolarität sowie der korrekten Lokalisation und Aufrechterhaltung der ZA geben kann.

Bei der Suche nach embryonal letalen Mutationen, bei der auch *crumbs* ursprünglich isoliert wurde, fand sich ein weiterer Locus, der bei Mutation einen dem *crumbs*-Phänotyp sehr ähnlichen Phänotyp hervorrief. Dieser Locus betrifft das Gen *stardust* (*sdt*). Der embryonale Phänotyp durch Verlust des MAGUK-Proteins Std ist von dem von Crumbs kaum zu unterscheiden (vgl. Ergebnisse, Abb 4.31D). und der veränderte Phänotyp *crumbs*-mutanter Embryonen läßt sich durch eine Duplikation von *sdt* partiell korrigieren (Grawe et al., 1996; Jürgens et al., 1984; Tepass und Knust, 1993; Wieschaus et al., 1984). Diese Befunde beweisen, dass Crb und Sdt an der Regulation der gleichen Prozesse beteiligt sind.

Bindungsstudien im Rahmen eines 2-Hybrid-Screens zeigten, dass Stardust über seine PDZ-Domäne direkt mit dem C-terminalen ERLI-Motiv von Crumbs interagiert. Stardust selbst bindet wiederum an das 4-PDZ-Domänen-Protein Discs lost, und über seine L27-Domäne an das bislang wenig erforschte Protein Lin7 (Ö. Kilinc und A. Bachmann, pers. Mitteilung).

Dieser Komplex aus Crumbs, Stardust, Discs lost, Lin7 und möglicherweise weiteren, bislang unbekanntem Partnern, wird als „Subapikaler Komplex“ (SAC) bezeichnet, welcher durch Crumbs organisiert und in epithelialen Zellen oberhalb der *zonula adherens* lokalisiert wird (Abb. 1.2).

Die FERM-Domäne von Crumbs ist essentiell für die Rekrutierung von DMoesin und β -Heavy-Spektrin (β_H), einer Komponente des apikal lokalisierten und auf Spektrin basierenden Membranskeletts (SBMS = „*spectrin-based membrane skeleton*“), an die apikale Plasmamembran (Medina et al., 2002b). Es wird postuliert, dass Crumbs über diese Interaktion mit DMoesin das apikal gelegene SBMS und Aktin stabilisiert, welches wiederum stützend/verstärkend auf die ZA einwirkt. Letztendlich könnte Crumbs somit eine Verbindung von epithelialer Morphogenese und Zellpolarität herstellen (Medina et al., 2002b).

Weitere 2-Hybrid-Versuche weisen darauf hin, dass das Protein Par-6 entweder mit Stardust (pers. Mitteilung Ö. Kilinc) oder direkt mit Crumbs (pers. Mitteilung A. Lebevic) interagiert.

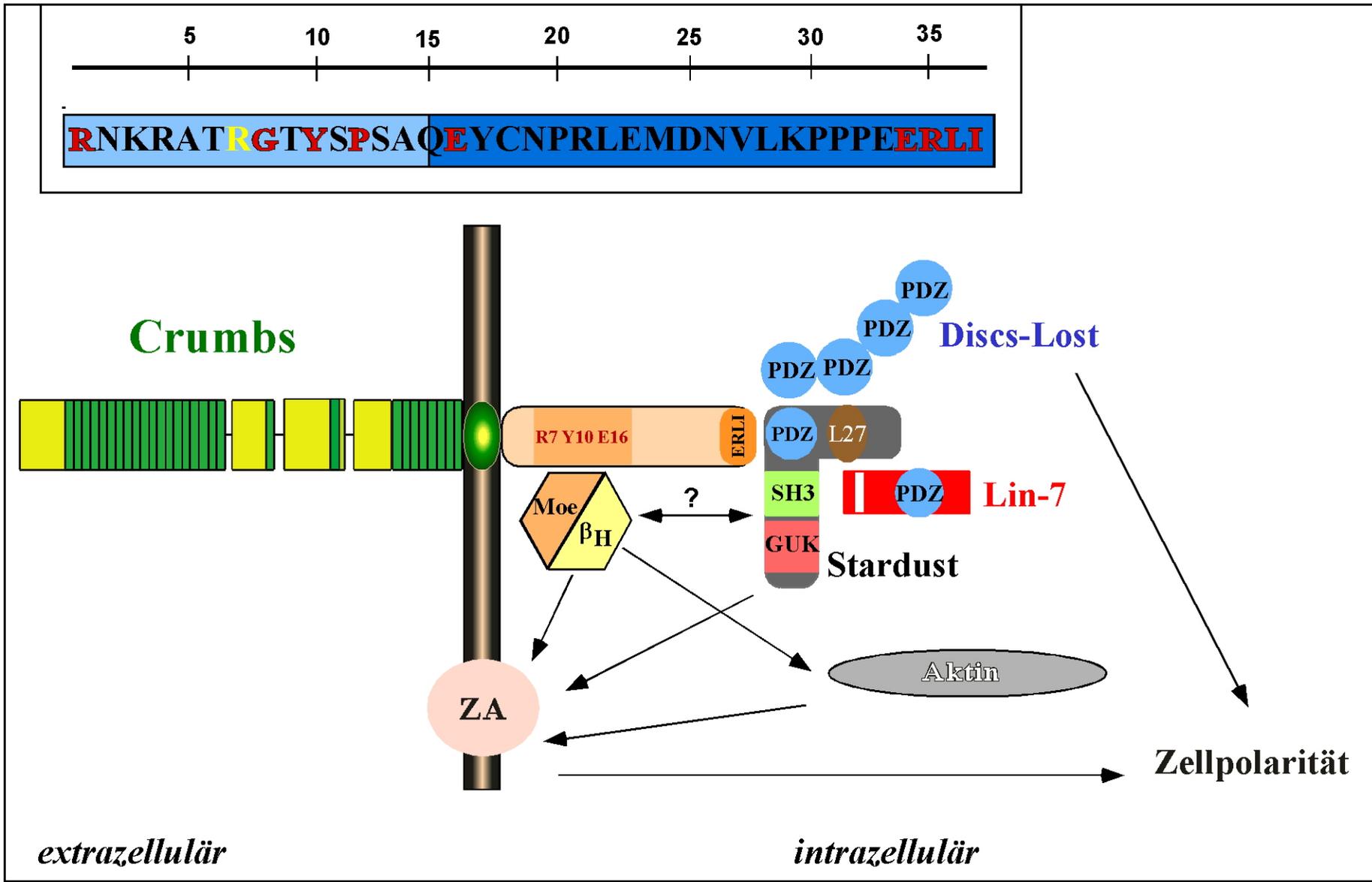


Abb. 1.2: Derzeitiges Modell des von Crumbs organisierten Subapikalen Komplexes (SAC) und weiterer Interaktionspartner. Die Aminosäuresequenz der zytoplasmatischen Domäne und der beiden funktionellen Subdomänen sind im Rahmen detailliert dargestellt. Die beteiligten Faktoren und die möglichen Interaktionen sind im Text beschrieben.

Par-6 ist eine Komponente des Bazooka-Komplexes, zu welchem außer Bazooka, einem PDZ-Domänen-Protein mit Ähnlichkeiten zum Par-3 Gen aus *C. elegans* (Kuchinke et al., 1998) und Par-6 noch die atypische Proteinkinase-3 gehören (Wodarz et al., 2000). Ebenso wie Crumbs und der SAC ist der Bazooka-Komplex apikal in Epithelzellen lokalisiert und in frühen Embryos an der Bildung der ZA beteiligt (Müller und Wieschaus, 1996; Wodarz et al., 2000; Petronczki et al., 2001).

1.4. Rolle von Crumbs in der Augenentwicklung von *Drosophila*

Ein weiteres Gewebe, an dessen Entwicklung und Aufrechterhaltung Crumbs beteiligt ist, und welches im Rahmen der vorliegenden Arbeit näher analysiert wurde, ist das Facettenauge von *Drosophila*

1.4.1 Mutation von humanem und *Drosophila crumbs* führen zu retinaler Degeneration

Aufmerksam wurde man auf die Funktion von Crumbs während der Augenentwicklung vor allem durch die Identifikation von Crumbs Homologen in verschiedenen Spezies (Maus, *C. elegans*, *Tribolium castaneum*, *Homo sapiens*), welche, vor allem in Hinblick auf die Sequenz ihrer zytoplasmatischen Domänen, untereinander hoch konserviert sind (vgl. Abb 1.1 A).

Speziell für die zytoplasmatische Domäne von CRB1, dem humanen Crumbs-Homolog, konnte sowohl eine strukturelle als auch eine funktionelle Konservierung nachgewiesen werden. Sie ist in der Lage, den mutanten *crb*-Phänotyp in *Drosophila* Embryonen im gleichen Maße abzuschwächen wie es die *Drosophila*-eigene zytoplasmatische Domäne vermag. Zudem sind beide Domänen in der Lage, bei Überexpression im Embryo von *Drosophila* einen vielschichtigen Epithelphänotyp zu erzeugen (den Hollander et al., 2001).

Mutationen des humanen Transmembranproteins CRB1 wurden bereits früher mit schweren Formen von retinaler Dystrophie, „retinitis pigmentosa 12“ (RP 12), und „Lebers congenital amaurosis“ (LCA) assoziiert (den Hollander et al., 1999; den Hollander et al., 2001; Lotery et al., 2001).

Charakteristisch für sowohl RP12 wie für LCA ist eine retinale Degeneration, welche jedoch je nach Art der Dystrophie unterschiedlich stark ausfällt. Die Effekte reichen von Blindheit von Geburt oder den ersten Lebensmonaten an (LCA) bis hin zu einer fortschreitenden Erblindung über Jahre hinweg (RP12) .

Die Tatsache, dass das humane Crumbs Protein und das DCrb sowohl strukturell als auch funktionell konserviert sind, führte zur näheren Analyse *crumbs*-mutanter Augen in *Drosophila* und der Frage, ob auch hier entsprechende retinale Degenerationsphänotypen zu finden sind. (Johnson et al., 2002; Pellikka et al., 2002).

In der Tat führt Überexpression von *crumbs* (des vollständigen Gens oder auch der zytoplasmatischen Domäne alleine) im Auge von *Drosophila* zu einem dominanten Phänotyp. Augen mit diesem Phänotyp sind unregelmässig organisiert und werden als „rauh“ bezeichnet (Pellikka et al., 2002; Izaadoost et al., 2002; diese Arbeit). Die Mechanismen, die diesen Phänotyp hervorrufen, wurden in dieser Arbeit näher analysiert.

1.4.2 Augenentwicklung in *Drosophila melanogaster*

Um die Rolle von Crumbs während der Augenentwicklung und später bei der Aufrechterhaltung der Zellpolarität in den Photorezeptorzellen verstehen zu können, ist es notwendig, die grundlegenden Schritte der Augenentwicklung von *Drosophila* genauer zu betrachten.

Das Auge von *Drosophila* ist ektodermaler Herkunft und entsteht aus einer epithelialen Struktur, die als „Augenimaginalscheibe“ bezeichnet wird.

Bei holometabolen Insekten, zu denen auch *Drosophila melanogaster* gehört, werden zahlreiche adulte Strukturen bereits im Embryo in Form solcher Imaginalscheiben angelegt. Dazu werden Zellen aus der embryonalen Epidermis ausgegliedert und mit einer anderen Identität versehen. Während der larvalen und pupalen Entwicklung proliferieren sie, differenzieren sich und bilden schliesslich, mit Ausnahme des Abdomens, alle äusseren Strukturen der Imago, inklusive Körperanhänge, wie z.B. Flügel oder Beine. Für diese Arbeit von besonderem Interesse war die Entwicklung der Augenimaginalscheiben von ihren frühen Stadien bis hin zum adulten Auge.

Embryonale Augenentwicklung

Die frühe Augenentwicklung von *Drosophila* beginnt bereits während des Stadiums des zellulären Blastoderms, in welchem eine Domäne dorsolateralen Ektoderms spezifiziert wird, aus welcher später die Augen-Antennen-Imaginalscheibe gebildet wird. Aus dieser wiederum entsteht später das adulte Auge, die Antennen und ein Teil des adulten Kopfes (García-Bellido und Merriam 1969, Wieschaus und Gehring, 1976).

Während des Stadiums der Kopf-Involution wird diese dorsolaterale Domäne nach innen gefaltet, und die dadurch entstehende sackförmige Struktur aus einschichtigem Epithel wird zur Augen-Antennen-Imaginalscheibe. (Abb. 1.3 A-B) Apikale und basale Oberflächen bleiben bei dieser Involution topologisch intakt (Wolff und Ready, 1991b).

Larvale Augenentwicklung

Die anschliessenden beiden Larvalstadien sind allein dem Wachstum der Augen-Antennenscheibe gewidmet, was durch die „erste mitotische Welle“ proliferativer Zellteilungen erreicht wird.

Etwa 4-5 Zellteilungen sind während dieser ersten Welle mitotischer Aktivität notwendig, um die mindestens notwendige Anzahl von 9700 Zellen zu erreichen, die für einen kompletten Satz ommatidialer Vorläuferzellen eines Auges notwendig ist (Wolff und Ready, 1991b).

Während des frühen dritten Larvalstadiums, etwa 70 Stunden vor der Verpuppung, wandelt sich das zuvor rein proliferative Epithel der Imaginalscheibe zu einem sich differenzierenden um.

Optisches Zeichen dieses Übergangs von Proliferation zu Differenzierung/Organisation ist eine dorso-ventral orientierte „Einbuchtung“ der apikalen Zelloberflächen, die sogenannte „Morphogenetische Furche“, welche die Augenimaginalscheibe von hinten (posterior) nach vorne (anterior) durchläuft, in der jedoch selbst keine Zellteilungen stattfinden (Abb. 1.3 C, vgl. Ergebnisse, Abb 4.21).

Unmittelbar hinter dieser morphogenetischen Furche, beginnend am posterioren Ende der Scheibe, bildet sich die „zweite mitotische Welle“, welche schmaler als die erste und dadurch definiert ist, dass sich viele Zellen entlang derselben teilen. In dieser Zone beginnen die entstandenen Zellen sich zu ommatidialen Vorläufern zu organisieren/gruppieren. Die Determination der einzelnen Zelltypen ist hierbei einer Reihe induktiver Prozesse sowie dem Prozess der lateralen Inhibition unterworfen (Cagan und Ready, 1989a; Rubin, 1989; Dickson und Hafen, 1993). Die Gruppierung der so entstehenden Zellen geht von Photorezeptorzelle R8 aus, um welche sich die weiteren sieben Photorezeptorzellen (zuerst R3&4, dann R2&5, dann R1&6 und zuletzt R7) der Reihe nach anordnen, gefolgt von den vier Vorläufern der linsensezernierenden Zellen (Semperzellen, engl. *Cone Cells*). Um diese ommatidialen Vorläufer herum liegen in diesem Stadium noch undifferenzierte, interommatidiale Vorläuferzellen, welche später die interommatidialen Pigmentzellen und Borsten bilden (Wolff und Ready, 1991b). Um eine korrekte Augenentwicklung zu gewährleisten, werden zu Anfang mehr Zellen als für das adulte Auge notwendig produziert. Diese werden später mittels Apoptose wieder eliminiert.

Pupale Augenentwicklung

Früh in der Pupalentwicklung wird die Augenimaginalscheibe evertiert. Die während der frühen Embryonalentwicklung durchgeführte Faltung des Epithels nach innen wird umgekehrt, so dass die apikalen Oberflächen des Retinaepithels nun wieder außen zu liegen kommen. (Abb. 1.3 D)

Die weitere Pupalentwicklung besteht aus zwei Phasen. Während der ersten, welche etwa das erste Drittel umfasst, wird die in der späten L3-Scheibe begonnene Zellorganisation fortgesetzt. Mittels induktiver Prozesse (Cagan und Ready, 1989a) werden die noch undifferenzierten Zellen der Retina zu Pigmentzellen, linsensezernierenden Zellen und Borsten differenziert und zu einem regelmäßigen hexagonalen Wabenmuster organisiert. Überschüssige Zellen werden mittels Zelltod eliminiert, und die Linse des Auges wird von den vier Semperzellen sezerniert (Wolff und Ready, 1991a; Hay et al., 1994). Am Ende dieser ersten Phase ist das zelluläre Muster (Anzahl & Position der Zellen) des Auges vollständig.

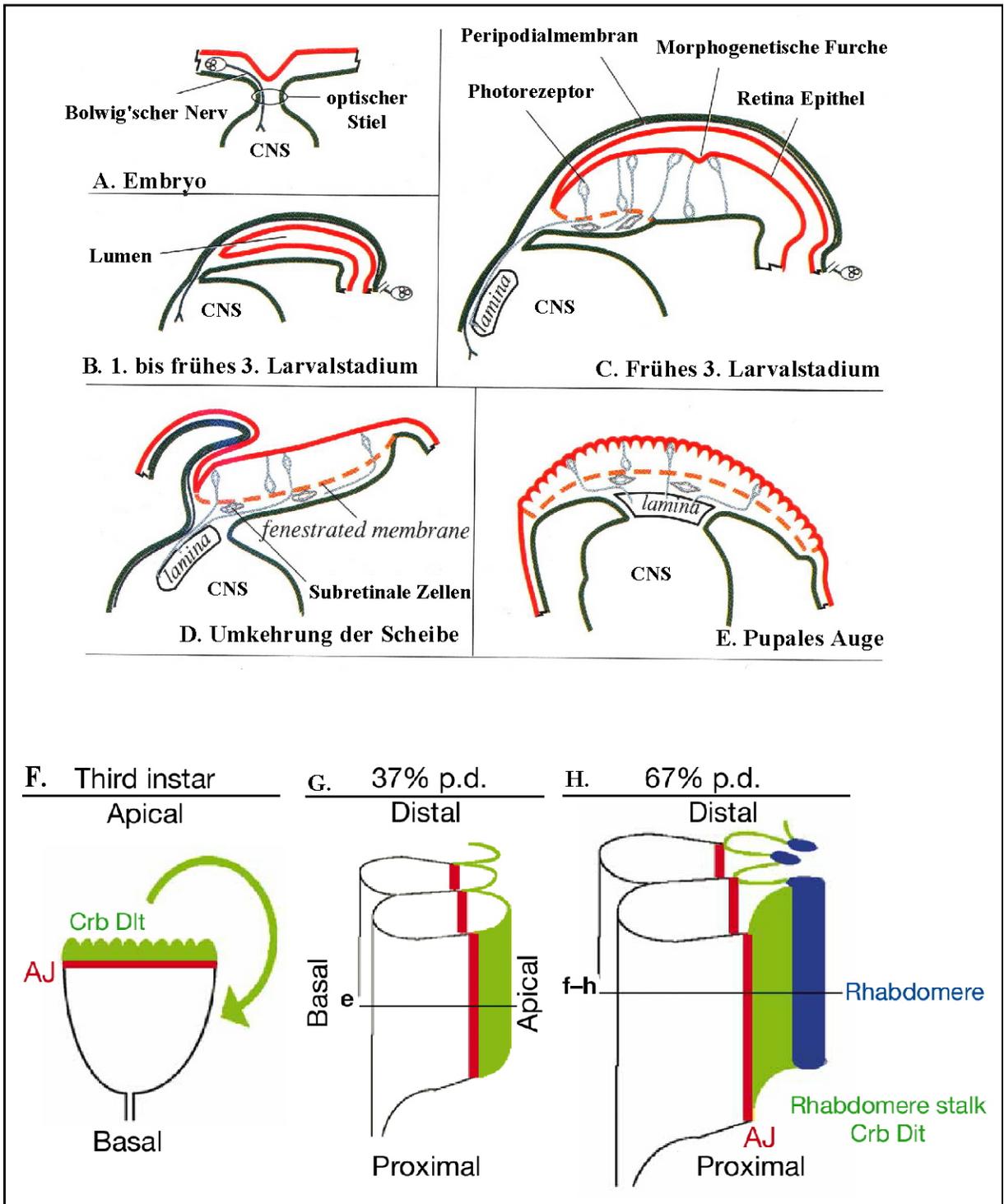


Abb. 1.3 (A-E): Schematische Darstellung der larvalen und frühen pupalen Entwicklung der Augenimaginalscheibe (Bilder übernommen aus Cagan und Ready, 1989a). Details siehe Text.

(F-H) Schematische Darstellung der Photorezeptorzellentwicklung während der späten Larval- und Pupalentwicklung (Bild übernommen aus Izaddoost et al., 2002).

Während der Determination der Photorezeptorzellen zeigen die Zellen noch eine apiko-basale Ausrichtung. Crb und Dlt sind wie in Epithelzellen apikal zur *adherens junction* (AJ) angeordnet. Während des frühen Pupalstadiums neigt sich die Zelle um 90°, die apikalen Seiten der Photorezeptorzellen kommen im Inneren der sich bildenden Ommatidien zu liegen und bilden dort sowohl licht-sensitive Rhabdomere als auch die Stiel-Membran ('stalk'), welche die Rhabdomere mit der AJ und dem basolateralen Teil der Zelle verbinden.

Die zweite Phase umfasst die „Reifung“ der pupalen Ommatidien. Hierbei neigen sich die Photorezeptorzellen um 90° zur Seite, so dass ihre apikalen Membranen im „Inneren“ des Ommatidiums zueinander ausgerichtet sind, umschlossen von den eigentlichen Körpern der Photorezeptorzellen (vgl. Abb. 1.3 F-H).

Durch starkes Wachstum der apikalen Domänen entstehen zum einen die sogenannten Rhabdomere (Membranstapel), die das photosensitive Rhodopsin beinhalten. Außerdem wird der Rhabdomerstiel (*rhabdomere stalk / stalk membrane*) ausgebildet, ein Teil der apikalen Membran, welcher das Rhabdomer mit der *adherens junction* und dem basolateralen Anteil der Zelle verbindet. (Abb. 2.3 H). Im Anschluss an diesen Prozess machen die Photorezeptorzellen/Ommatidien ein extremes Wachstum in proximo-distaler Ausrichtung durch. Sie strecken sich und wachsen von einer Länge von ca. 15 µm (bei 50% Pupalentwicklung) zu einer adulten Länge von ca. 100 µm heran (Pellikka et al., 2002; Izaddoost et al., 2002; Johnson et al., 2002).

Am Ende dieser Entwicklungsprozesse steht das adulte Facettenauge (Abb. 1.4) von *Drosophila*. Es besteht aus etwa 750-800 gleich strukturierten und regelmässig organisierten Einheiten, den Ommatidien.

Jedes Ommatidium besteht seinerseits aus 20 Zellen: 8 Photorezeptorzellen, welche über ihre Rhabdomere photosensitiv und verantwortlich für die Reizaufnahme sind, vier linsensezernierende Zellen (Semperzellen, engl. *cone cells*) und zwei primäre Pigmentzellen. Zusätzlich teilen sich benachbarte Ommatidien 6 sekundäre und 3 tertiäre Pigmentzellen, und jedes Ommatidium besitzt zudem noch eine interommatidiale Borste mit mechanorezeptorischer Funktion.

1.4.3 Rolle von Apoptose (Zelltod) bei der Entstehung des Facettenauges

Neben induktiven Prozessen, die für die Spezifikation der verschiedenen Augenzellen und ihre korrekte regelmässige Lokalisierung/Anordnung verantwortlich sind, spielt vor allem Zelltod eine entscheidende Rolle in der Augenentwicklung.

Es lassen sich drei Entwicklungsstadien beobachten, in denen Zelltod auftritt:

- 1.) In den Augenimaginalscheiben des dritten Larvalstadiums wird eine kleine, variable Anzahl von Zellen hinter der morphogenetischen Furche durch Zelltod eliminiert (Spreij, 1971; Wolf und Ready, 1991a; Bonini et al., 1993).

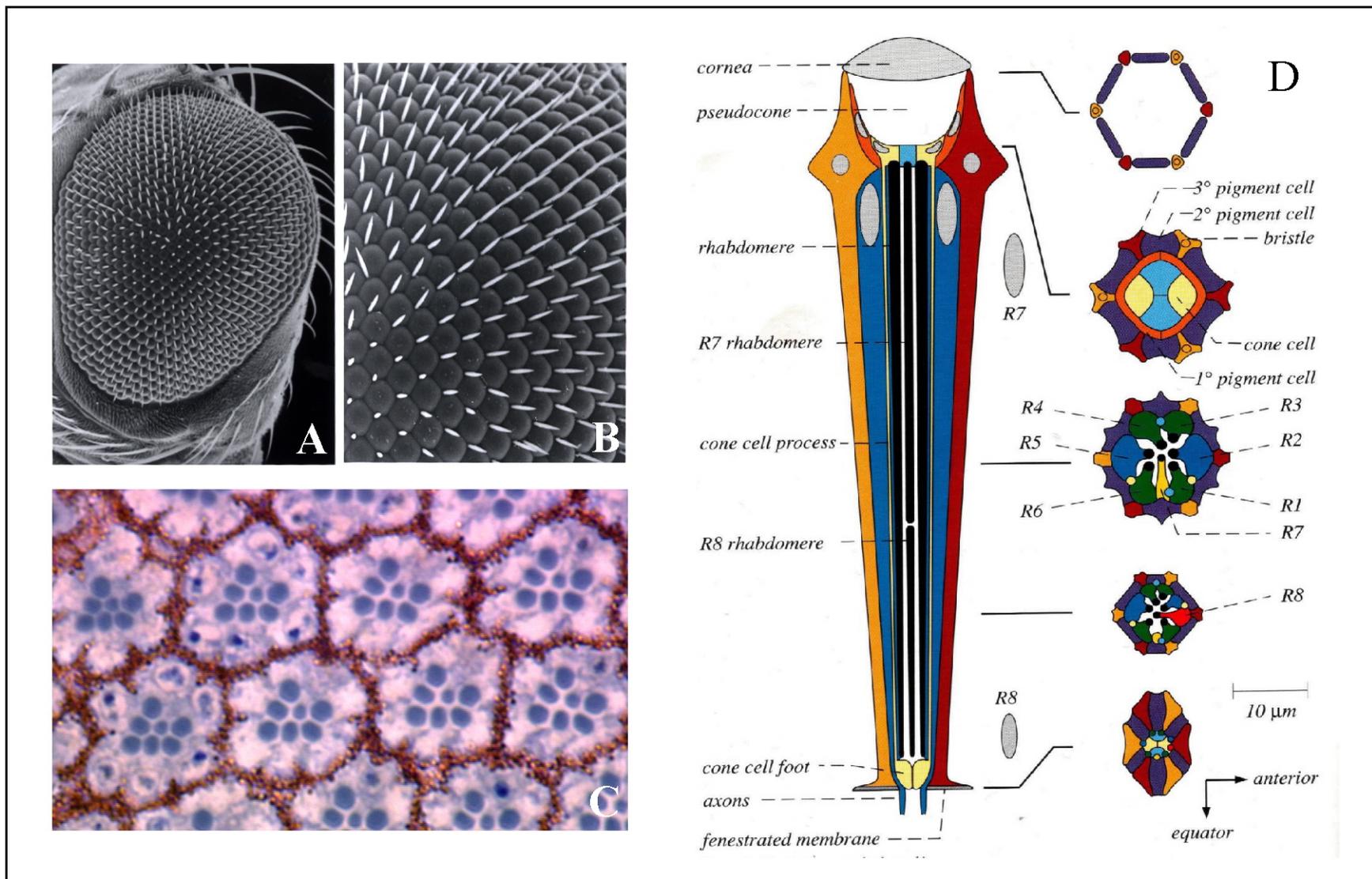


Abb. 1.4: (A(B) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines wildtypischen Auges in Übersicht und Vergrößerung. (C) Semidünnschnitt durch ein wildtypisches Auge. (Details siehe Ergebnisteil). (D) Schematische Darstellung eines einzelnen Ommatidiums und Schnitte von distal nach proximal durch das Ommatidium (aus Cagan und Ready, 1989a).

- 2.) Etwa 30 Stunden nach der Verpuppung bestehen die sich entwickelnden Ommatidien aus je 8 Photorezeptorzellen, 4 linsensezernierenden Zellen sowie zwei primären Pigmentzellen. Zwischen den etwa 30 entstehenden Ommatidien liegen noch unsortierte und undifferenzierte Zellen, welche später die wabenförmig angeordneten sekundären und tertiären Pigmentzellen bilden sollen. In diesem Stadium liegen pro Ommatidium noch 2-3 undifferenzierte Zellen zu viel vor, welche in einem zweiten Zelltodschrift eliminiert werden. Die übrigbleibenden Zellen entwickeln sich zu sekundären und tertiären Pigmentzellen. (Cagan und Ready, 1989; Miller und Cagan, 1998).
- 3.) Etwa 60-70 Stunden nach Einsetzen der Verpuppung werden die Randommatidien („*Perimeter Cluster*“) durch Zelltod entfernt. Hierbei handelt es sich um eine Population von Ommatidien, die zwar Photorezeptorzellen, linsensezernierende Zellen und primäre Pigmentzellen besitzen, die aber durch ihre Lage am äussersten Rand der pupalen Scheibe verkümmert und kleiner sind, als der Rest der regulären Ommatidien (Wolff und Ready, 1991a; Hay et al., 1994).

Abweichungen während dieser drei Schritte können später in mehr oder minder starken Unregelmäßigkeiten des normalerweise sehr regelmäßig organisierten Facettenauges resultieren.

1.4.4 Die Expression von *crumbs* während der Augenentwicklung von *Drosophila*

Die Expression von *crumbs* während der Augenentwicklung stimmt zum Teil mit der im embryonalen Epithel beobachteten überein (Abb. 1.1 B).

Während des späten Larvalstadiums wird *Crumbs* in der Augenimaginalscheibe an der apikalen Membran undifferenzierter, retinaler Epithelzellen sowie neu rekrutierter Photorezeptorzellen lokalisiert. Hierbei ist die Expression in einer apikalen Randregion der Membran zu erkennen (Tepass, 1996; Pellikka et al., 2002).

Dort co-lokalisiert es wie in embryonalen Epithelzellen mit *Dlt*, jedoch zugleich auch mit *Armadillo* (*Arm*, *DE-Cadherin*), einer Komponente der *ZA*, was im Widerspruch zu Befunden beim embryonalen Epithel steht, in dem *Crb* und *Arm* nicht co-lokalisieren (Pellikka et al., 2002; Izaddoost et al., 2002).

Nach der morphologischen Etablierung von Photorezeptorzellen und Rhabdomeren findet man *Crumbs* von der Pupalentwicklung an bis ins adulte Auge hinein im Rhabdomerstiel (*rhabdomere stalk*), einem apikalen Bereich der Membran, welcher das F-Aktin-reiche und mit Photopigment angereicherte Rhabdomer mit der *adherens junction* und dem basolateralen Anteil des Auges verbindet (Pellikka et al., 2002; Izaddoost et al., 2002; Johnson et al., 2002).

Auch hier sind *Crumbs* und *Dlt* co-lokalisiert (Richard, pers. Mitteilung). *Armadillo* jedoch findet sich nun, wie in Epithelzellen, als Teil der *adherens junctions*.

1.4.5 Funktion von Crumbs während der Augenentwicklung und mutante Phänotypen

Untersuchungen in *Drosophila* zeigen, dass auch hier in *crumbs*-mutanten Augenklonen unterschiedliche Arten von Defekten zu beobachten sind, wobei einer davon Ähnlichkeit mit dem humanen RP12/LCA-Phänotyp zeigt.

Generell lassen sich zwei Arten von *crb*-Verlust-Phänotypen im Auge von *Drosophila* unterscheiden:

- Morphologische Phänotypen
- Lichtinduzierte, progressive Degeneration von Photorezeptorzellen.

Die erste Gruppe von Phänotypen äussert sich in einer Reihe morphologischer Veränderungen der Photorezeptorzellen und der dazugehörigen Rhabdomere (Pellikka et al., 2002).

In mutanten Augenklonen treten bereits vor Bildung der Photorezeptorzellen und Rhabdomere irregulär geformte *adherens junctions* auf. Die entstehenden Rhabdomere der Photorezeptorzellen konzentrieren sich auf den distalen (oberen) Bereich des Auges. Sie sind vergrößert/verdickt, und die Rhabdomere benachbarter Zellen treten in engen Kontakt miteinander, wobei jedoch die Lokalisierung des photosensitiven Pigments in den Rhabdomeren nicht beeinträchtigt wird. Gleichzeitig ist der Rhabdomerstiel dieser *crumbs*-mutanten Photorezeptorzellen stark verkürzt (Pellikka et al., 2002; Johnson et al., 2002). Sekundäre und tertiäre Pigmentzellen werden durch Apoptose eliminiert (Pellikka et al., 2002).

Im proximalen (unteren) Teil des Auges fehlen die Rhabdomere, da es ihnen nur in geringem Maße möglich ist, sich von distal nach proximal zu strecken und die Basallamina zu erreichen (Johnson et al., 2002; Pellikka et al., 2002; Izaddoost et al., 2002).

Die Bildung der ZA in mutanten Augenklonen hängt vom jeweiligen Entwicklungsstadium der Ommatidien ab. Während ihre Lokalisation in der larvalen Imaginalscheibe nicht vom Wildtyp zu unterscheiden ist, erkennt man bei etwa 50% der Pupalentwicklung, wenn PRZs/Rhabdomere angefangen haben sich zu strecken, eine starke Fragmentierung der ZA, welche sich jedoch im Weiteren bis zum adulten Auge hin wieder stark erholt, so dass zumindest im distalen Bereich des adulten Auges nur kleinere ZA-Defekte zu erkennen sind. Im proximalen Bereich ist hingegen überhaupt keine ZA vorhanden (Pellikka et al., 2002).

Der zweite, lichtinduzierte und progressive Degenerationsphänotyp der Photorezeptorzellen tritt nur in mutanten Augen von Tieren auf, die für mehrere Tage konstantem Licht ausgesetzt waren.

Zusätzlich zum ebenfalls auftretenden morphologischen Phänotyp, welcher lichtunabhängig ist, zeigen die Photorezeptorzellen Defekte, wie sie für apoptotische Zellen charakteristisch sind (Abrundung von Zellen, Auflösung des Zellkerns, Fragmentierung der DNA).

1.5 Aufgabenstellung

Die vorliegende Arbeit besteht aus zwei experimentellen Teilen:

Frühere Untersuchungen (Klebes, 1999; Pellikka et al., 2002; Izaddoost et al., 2002) hatten gezeigt, dass Überexpression verschiedener transgener UAS-*crumbs* Konstrukte mit Hilfe des UAS/Gal4-Systems im Auge von *Drosophila* zu einem „rauhem“ Augenphänotyp führt.

Da bislang allerdings noch nicht eindeutig geklärt war, wie dieser Phänotyp entsteht und welche Arten von Defekten und morphologischen Veränderungen an seiner Entstehung beteiligt sind, konzentrierte sich der erste Teil meiner Arbeit auf die detaillierte Charakterisierung des bei Überexpression von *crumbs* im Auge beobachteten „rauhem“ Augenphänotyps.

Basierend auf dem durch Überexpression von *crb*^{intra} im Auge induzierten „rauhem“ Augenphänotyp bestand der zweite Teil dieser Arbeit in der Suche nach Modifikatoren eines *crumbs*-induzierten „rauhem“ Augenphänotyps.

Ziel dieser Suche war die Lokalisierung und Identifizierung von Genen, die den „rauhem“, *crumbs*-induzierten Augenphänotyp modifizieren und gleichzeitig den mutanten *crb*-Phänotyp in der Kutikula von Embryonen abschwächen.

Diese gesuchten Gene stellen möglicherweise direkte oder indirekte Interaktionspartner von Crumbs dar oder sind Faktoren, welche in einer gemeinsamen genetischen Wirkungskette agieren.

Bei dieser Suche richtete sich das Hauptaugenmerk auf Kandidaten, die an der Aufrechterhaltung embryonaler ektodermaler Gewebe des sich entwickelnden Embryo beteiligt sind, und weniger auf Kandidaten, die exklusiv im Auge funktionell mit *crumbs* interagieren.

Der dominante rauhe Augenphänotyp, welcher durch Überexpression von *crumbs* im Auge entsteht, wurde somit als Indikator verwendet, um die Gene mit *crumbs* im Embryo funktionell interagierender Faktoren zu identifizieren.

2. Material

2.1 Chemikalien und sonstige Materialien

Alle Verbrauchskemikalien wurden in der Qualität *pro analysi* von folgenden Firmen bezogen:

Acros, Geel, Belgien; *Baker*, Deventer, Niederlande; *Biomol*, Hamburg; *Bio-Rad*, München; *Difco*, Detroit, USA; *Fluka*, Buchs, Schweiz; *Gibco/BRL Life Technologies*, Karlsruhe; *Grüssing*, Filsum; *Merck*, Darmstadt; *Riedel-de Haën*; *Seelze*; *Roth*, Karlsruhe; *Serva*, Heidelberg; *Sigma-Aldrich*, Steinheim.

Sämtliche Lösungen für molekularbiologische Arbeiten wurden mit Bidest-H₂O angesetzt und autoklaviert oder, falls dies nicht möglich war, sterilfiltriert.

Enzyme für molekularbiologische Arbeiten wurden, falls nicht anders erwähnt, von folgenden Firmen bezogen: *Boehringer/Roche Diagnostics*, Mannheim; *MBI Fermentas*, St. Leon-Rot; *New England Biolabs*, Schwalbach/Taunus und *Promega*, Madison, USA.

2.1.1 Reagenziensätze

- Jetstar Extraktionskit für Plasmid Midi und Maxi-DNA-Präparationen *Genomed*, Bad Oeynhausen
- Jetquick Gel Extraction Spin Kit *Genomed*, Bad Oeynhausen
- Qiagen Plasmid Midi Kit *Qiagen*, Hilden
- High Pure PCR Product Purification Kit *Boehringer/Roche Diagnostics*, Mannheim
- TOPO TA Cloning Kit *Invitrogen*, Groningen, Niederlande
- Vectastain ABC Kit Elite PK-6100 Standard *Camon*, Wiesbaden

2.1.2 Bakterienstämme

Bezeichnung	Verwendungszweck	Anmerkungen
<i>E. coli</i> DH5 α	Standardwirt für diverse Plasmide	—
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'	Standardwirt für diverse Plasmide	Tetrazyklin-Resistenz

Tab. 2.1: Eingesetzte Bakterienstämme: Für nähere Anhaben zu den Genotypen der verwendeten Bakterienstämme sei auf die Kataloge der Hersteller molekularbiologischer Produkte verwiesen, z.B. *MBI Fermentas*, St. Leon-Rot.

2.1.3 Vektoren

Vektor-Bezeichnung	Verwendungszweck	Anmerkungen
pBluescript II KS (+) (Stratagene, LaJolla, USA)	Vektor für Subklonierung und Sequenzierung	2957 bp großes Plasmid, abgeleitet von pUC19 Resistenz: Ampicillin enthält außerdem: lacZ-Gen
pPCR-Script SK (+) (Stratagene, LaJolla, USA)	Vektor für Subklonierung und Sequenzierung	2961 bp großes Plasmid, abgeleitet von pBluescript SK (+) Resistenz: Ampicillin enthält außerdem: lacZ-Gen
pIC20R	Vektor für Subklonierung (Marsh et al., 1984)	
pUAST	Vektor für Subklonierungen und zur Herstellung von UAS-Effektorlinien in <i>Drosophila</i> (Brand und Perrimon, 1993)	
pUCPh $\pi\Delta$ 2-3	Helfer-Plasmid für die Herstellung transgener Fliegen (Laski et al., 1986)	
pGMR	Vektor zur Subklonierung und Überexpression von Konstrukten im Auge von <i>Drosophila</i> (Ellis et al., 1993)	8.9 kb großes Plasmid, abgeleitet von pCaSpeR-hs Resistenz: Ampicillin trägt zusätzlich: <i>white</i> ⁺ Von neun Schnittstellen der MCS lassen sich nur StuI, BglII, HpaI und EcoRI verwenden. Alle anderen Schnittstellen sind mehrfach im Vektor vorhanden.

Tab. 2.2: Eingesetzte Klonierungs-Vektoren

2.1.4 Fotoarbeiten und Bildverarbeitung

Photopapier / Entwickler	Agfa-Gevaert AG, Leverkusen
Raster-Elektronenmikroskop	AMR1000, Leitz, Wetzlar
Photolichtmikroskop:	Zeiss Axiophot 2, Zeiss, Oberkochen
Konfokales Mikroskop:	Leica TCS NT, Leica, Heidelberg
Computersystem:	Macintosh PowerPC, Apple, Ismaning
Bildverarbeitung:	Adobe Photoshop, Adobe Systems, San Jose, USA Canvas 6, Deneba Systems, Miami, USA

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardtechniken wie Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen, DNA-Spaltung mit Restriktions-Endonukleasen, Dephosphorylierung der 5'-Enden linearer DNA-Moleküle mit alkalischer Phosphatase (CIP), Phenol/Chloroform-Extraktion, Fällung von Nukleinsäuren, Ligation mit T4-DNA-Ligase und Gelelektrophorese sind in Sambrook et al., 1989, beschrieben und werden hier nicht mehr im Detail aufgeführt.

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte entweder unter Verwendung des ‚Jetquick Gel Extraction Spin Kit‘ der Firma *Genomed*, Bad Oeynhausen, nach Angaben des Herstellers, durch Elektroelution oder mittels des ‚High Pure PCR Product Purification Kit‘ der Firma *Boehringer/Roche Diagnostics*, Mannheim. DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma *AGOWA*, Berlin durchgeführt.

3.1.1 Stammhaltung und Kultivierung von Bakterien

Die Anzucht der verschiedenen Bakterienstämme erfolgte in jeweils 3ml LB-Medium (Luria-Bertani-Medium), das für eine frische Übernachtskultur mit einer Einzelkolonie bzw. 500µl einer Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler (150-200rpm) inkubiert wurde. Bei Antibiotika-resistenten Stämmen wurde dem Medium noch das jeweilige Antibiotikum in einer vorgegebenen Konzentration (Ampicillin: 100µg/ml, Kanamycin: 50µg/ml) zugesetzt.

Zur kurzfristigen Stammhaltung wurden die Bakterien auf LB-Agar-Platten ausgestrichen (bei einer Antibiotika-Resistenz wurde dem Agar das entsprechende Antibiotikum hinzugesetzt) und über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine Lagerung dieser Platten ist bei 4°C mehrere Wochen lang möglich. Um ein Austrocknen der Platten zu vermeiden, wurden die Petrischalen mit Parafilm abgedichtet.

Zur langfristigen Stammhaltung wurden gleiche Anteile einer 3ml Übernachtskultur und einer sterilfiltrierten Glycerinlösung (96%) vermengt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bei -80°C können diese Zellen bis zu mehreren Jahren gelagert werden.

Lösungen:

LB-Medium:	1% Bacto-Trypton 0.5% Hefeextrakt 85.5mM NaCl
LB-Agar:	LB-Medium 1.5% Bacto-Agar

3.1.2 Isolierung von DNA

3.1.2.1 Mikromethode zur Präparation genomischer DNA aus *Drosophila melanogaster*

(nach Pirotta, 1986; Steller und Pirotta, 1986)

Diese Methode eignet sich für die schnelle Isolation von DNA aus wenigen Fliegen oder Embryonen, die für PCR-Reaktionen weiter verwendet werden kann. Sie ist aber auch zur Gewinnung von DNA zu weiteren Klonierungen ausreichend.

- 10-50 betäubte Fliegen in einem Eppendorf-Gefäß sammeln und in flüssigem Stickstoff schockgefrieren, um die Homogenisierung zu erleichtern
- 100µl Extraktionspuffer pro 10 Fliegen hinzufügen und Fliegen mit einem Homogenisator (Bio-Vortexer, *Biospec Products*, Bartlesville, USA) weitgehend homogenisieren
- 20min bei 65°C inkubieren
- 14µl 8M Kaliumacetat hinzufügen und vorsichtig mischen
- 30min auf Eis inkubieren
- 15min bei 4°C und 13000rpm zentrifugieren (Eppendorf-Kühlzentrifuge), Überstand vorsichtig in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführen (dabei Scherung der DNA durch zu enge Pipettenspitze vermeiden -> Pipettenspitze abschneiden)
- DNA im Überstand mit 0.5 Volumenteilen (VT) Isopropanol fällen -> für 45min auf Eis.
- 15min bei 4°C und 13000rpm zentrifugieren
- Sediment mit kaltem, 70%igem Ethanol waschen, 5 min bei 4°C und 13000rpm zentrifugieren
- Ethanol abgießen und Sediment trocknen lassen
- trockenes Sediment in 100-150µl dH₂O oder TE aufnehmen

Lösungen:

Extraktionspuffer	100mM Tris/HCl (pH 9,0)
	100mM EDTA (pH 9,0)
	1 % SDS

3.1.2.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Das Verfahren von Birnboim & Doly (Birnboim und Doly, 1979) nutzt das Prinzip, dass sich Plasmid-DNA und genomische Bakterien-DNA bei verschiedenen pH-Werten unterschiedlich verhalten:

In basischem Milieu denaturieren beide DNA-Sorten. Der Plasmidring renaturiert bei saurem pH jedoch wieder und bleibt im Überstand, während die genomische Bakterien-DNA in denaturiertem Zustand verbleibt und zusammen mit Proteinen sedimentiert werden kann. Auf diese Weise ist es möglich, Plasmid-DNA schnell und einfach aus Bakterien zu isolieren.

Zur Untersuchung von positiven Transformanten nach einer Klonierung dient eine schnelle Plasmidpräparationsmethode mit geringer DNA-Ausbeute (Mini-Präparation). Die Präparation von besonders reiner DNA in großem Maßstab (Midi-Präparation oder Maxi-Präparation) erfolgt unter Benutzung von Anionen-Austauschersäulen.

3.1.2.2a ‚Mini‘-Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

- 3ml LB-Medium (bei vorliegender Antibiotikaresistenz des Plasmids unter Zugabe des entsprechenden Antibiotikums) mit einer *E. coli* Kolonie animpfen und ü.N. bei 37°C auf einem Schüttler inkubieren
- 1ml der ü.N.-Kultur für 5min bei 5000rpm abzentrifugieren
- Sediment in 250µl P1-Lösung resuspendieren
- 250µl P2 zusetzen, invertieren (Zellen werden aufgeschlossen, Proteine gehen in Lösung und DNA denaturiert)
- 5min bei RT inkubieren
- 250µl P3 zusetzen, invertieren (Neutralisierung der Suspension, Renaturierung der Plasmid-DNA)
- 10min auf Eis inkubieren
- 30min bei 4°C bei 13000rpm zentrifugieren, Überstand in frisches Eppendorf-Gefäß überführen und die Plasmid-DNA mit 0.8VT Isopropanol fällen
- 10-15min auf Eis inkubieren und 30min bei 13000rpm und 4°C zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Sediment mit kaltem 70% Ethanol waschen und 10min bei 13000rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Sediment lufttrocknen und in 20-30µl dH₂O oder TE aufnehmen

Lösungen:

P1:	50mM Tris-HCl, pH 8.0 10mM EDTA 100µg RNaseA Lösung bei 4°C lagern
P2:	200mM NaOH 1% SDS
P3:	3.0M Kaliumacetat pH 5.5
TE:	10mM Tris-HCl 1mM EDTA, pH 8.0

3.1.2.2b ‚Midi‘-Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Auch diese Methode basiert auf der Birnboim-Doly-Technik (Birnboim und Doly, 1979), die das unterschiedliche Verhalten von chromosomaler DNA und Plasmid-DNA bei einem Wechsel von saurem zum alkalischen pH ausnutzt. In dieser Arbeit wurden gemäß den Angaben des Herstellers der Plasmid-Midi-Kits, der Firma *Genomed*, Bad Oeynhausen (Jetstar Plasmid Midi Kit), eingesetzt

- 50ml LB-Medium (bei vorliegender Antibiotikaresistenz des Plasmids unter Zugabe des entsprechenden Antibiotikums) mit 50µl einer ü.N. Kultur animpfen und ü.N. bei 37°C auf einem Schüttler inkubieren
- ü.N.-Kultur für 10min bei 4°C und bei 4000rpm abzentrifugieren
- Sediment in 4ml E1-Puffer resuspendieren
- 4ml E2 zusetzen, invertieren (Zellen werden aufgeschlossen, Proteine gehen in Lösung, DNA wird denaturiert und RNA abgebaut)
- 5min bei RT inkubieren, leicht schwenken
- 4ml E3 zusetzen, invertieren (Neutralisierung der Suspension, Renaturierung der Plasmid-DNA)
- 10min auf Eis inkubieren (chromosomale DNA und Proteine fallen aus)
- 40min bei 4°C bei 6000rpm zentrifugieren
- Genomed Anionenaustauschersäule mit Puffer E4 äquilibrieren und plasmidhaltigen Überstand auf die Säule laden (Plasmid-DNA wird an die Matrix der Säule gebunden)
- Waschen der Säule mit Puffer E5 (2 mal)
- Elution der Plasmid-DNA mit 5ml Puffer E6
- Fällern der Plasmid-DNA mit 0.7VT 96% Isopropanol, für 30min auf Eis
- 30min bei 4°C und 13000rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Sediment mit kaltem 70% Ethanol waschen und 10min bei 13000rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Sediment lufttrocknen und in 50-100µl dH₂O oder TE aufnehmen

Lösungen:

E1-Puffer:	50mM Tris/HCl (pH 8.0) 10mM EDTA 100µg Rnase A/ml
E2-Puffer:	200mM NaOH 1% SDS
E3-Puffer:	3,2mM KAc/Essigsäure (pH 5,5)
E4-Puffer:	600mM NaCl 100mM NaAc/Essigsäure (pH 5,0) 0,15% Triton X-100
E5-Puffer:	800mM NaCl 100mM NaAc/Essigsäure (pH 5,0)

E6-Puffer: 1.25M NaCl
100mM Tris/HCl (pH 8.5)

3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (,PCR‘)

Die Polymerase-Kettenreaktion erlaubt die gezielte Amplifikation beliebig ausgewählter DNA-Sequenzen (Mullis & Faloona, 1987) *in vitro* ohne Verwendung von Vektoren und Wirtszellen. Voraussetzung dafür ist, dass zumindest ein Teil der betreffenden Nukleotidsequenzen bekannt ist.

Zwei auf den entgegengesetzten DNA-Strängen lokalisierte Oligonukleotide (,Primer‘) dienen dabei als Startstellen für eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase (z.B. Taq-Polymerase). Durch sich wiederholende Zyklen aus Aufschmelzen der DNA, Bindung der Oligonukleotide und Strangsynthese wird die zwischen den ,Primern‘ liegende DNA-Sequenz exponentiell vervielfältigt.

Die PCR-Reaktionsansätze umfassten ein Gesamtvolumen von 50µl, das sich aus folgenden Einzelkomponenten zusammensetzte:

X µl	Template DNA (10-100 ng)
5µl	10 x PCR Puffer (Promega)
5 µl	dNTP (2 mM pro dNTP)
3 µl	10 mM Magnesiumchlorid
1 µl	Primer A (25 pmol/µl)
1 µl	Primer B (25 pmol/µl)
0,2	µl Taq-Polymerase (5 U/µl; Promega)
Y µl	Aqua bidest.

Die PCR aus genomischer oder Plasmid-DNA erfolgte nach einem Standardprotokoll mit ,hot start‘. Beim ,hot start‘-Verfahren wird die ,template‘-DNA zunächst separat denaturiert und ein Mix aus Nukleotiden, ,Primern‘ und Taq-Polymerase erst kurz vor Beginn der eigentlichen PCR hinzugegeben. Als Negativkontrolle jeder PCR diente ein Ansatz ohne DNA (,Leerwert‘).

Die Standard-Bedingungen für die durchgeführten PCRs waren wie folgt:

	Dauer	Temperatur	Bedeutung
20-35x	5min	95°C	Denaturierung der DNA
	1min	95°C	Denaturierung der DNA
	1min	,Primer‘-abhängig	Bindung der ,Primer‘ and die ,template‘-DNA (,Annealing‘)
	1-2min	72°C	DNA-Synthese (,Elongation‘)
	6min	72°C	finale DNA-Synthese (,Elongation‘)
	4ever	4°C	Reaktionsende
	End		

Neben der Standard-PCR wurde im Rahmen dieser Arbeit vor allem eine modifizierte Methode, die der „Inversen PCR“ (siehe Methoden 3.1.4) angewandt. Für alle PCR-Anwendungen wurde der Thermocycler PTC-200 der Firma *MJ Research*, Watertown, USA, eingesetzt. Die Aufreinigung aller PCR-Produkte erfolgte mit dem High Pure PCR Product Purification Kit, *Boehringer/Roche Diagnostics*, Mannheim.

3.1.4 Lokalisation von P-Elementen mittels Inverser PCR

Ziel der Inversen PCR ist die Isolierung von DNA-Sequenzen aus der Nachbarschaft von P-Element-Insertionen. Da die Integration von P-Elementen ins Genom oft Mutationen auslöst, ermöglicht eine Inverse PCR einen einfachen Zugang zum betroffenen Genlocus ohne aufwendiges ‚chromosomales Wandern‘.

In *Drosophila* werden für die Erzeugung solcher Mutationen mit anschließendem *Plasmid-Rescue*, einer weiteren Methode den Integrationsort eines P-Elements zu identifizieren, modifizierte P-Elemente eingesetzt, die anstelle des Transposase-Gens zwischen den ‚inverted repeats‘ einen ‚origin of replication‘, ein Ampicillin-Gen und ein lacZ-Reportergen tragen (Bier et al., 1989). Restriktionsspaltung der genomischen DNA eines P-Element-tragenden *Drosophila*-Stammes mit einer geeigneten Restriktions-Endonuklease, anschließende Zirkularisierung der DNA-Fragmente mit einer DNA-Ligase und Transformation in Bakterien sind die einzelnen Schritte eines klassischen Plasmid-Rescue.

Im Gegensatz dazu lassen sich durch die Inverse PCR auch P-Elemente lokalisieren, die nicht diesem ‚Bauplan‘ entsprechen und vor allem kein Resistenz-Gen beinhalten. Auch hier wird eine Restriktionsspaltung der genomischen DNA eines P-Element-tragenden *Drosophila*-Stammes mit einer geeigneten Restriktions-Endonuklease durchgeführt, die sowohl im 5‘- oder 3‘-Ende des P-Elements, als auch in der genomischen DNA schneidet. Das DNA-Stück wird anschließend über eine Ligation zirkularisiert. Auf der zirkularisierten DNA wird mit P-Element-spezifischen ‚Primern‘ eine PCR durchgeführt, in der neben P-Element-DNA ebenfalls Sequenzen der flankierenden, genomischen DNA amplifiziert (siehe Abb 3.1) wird.

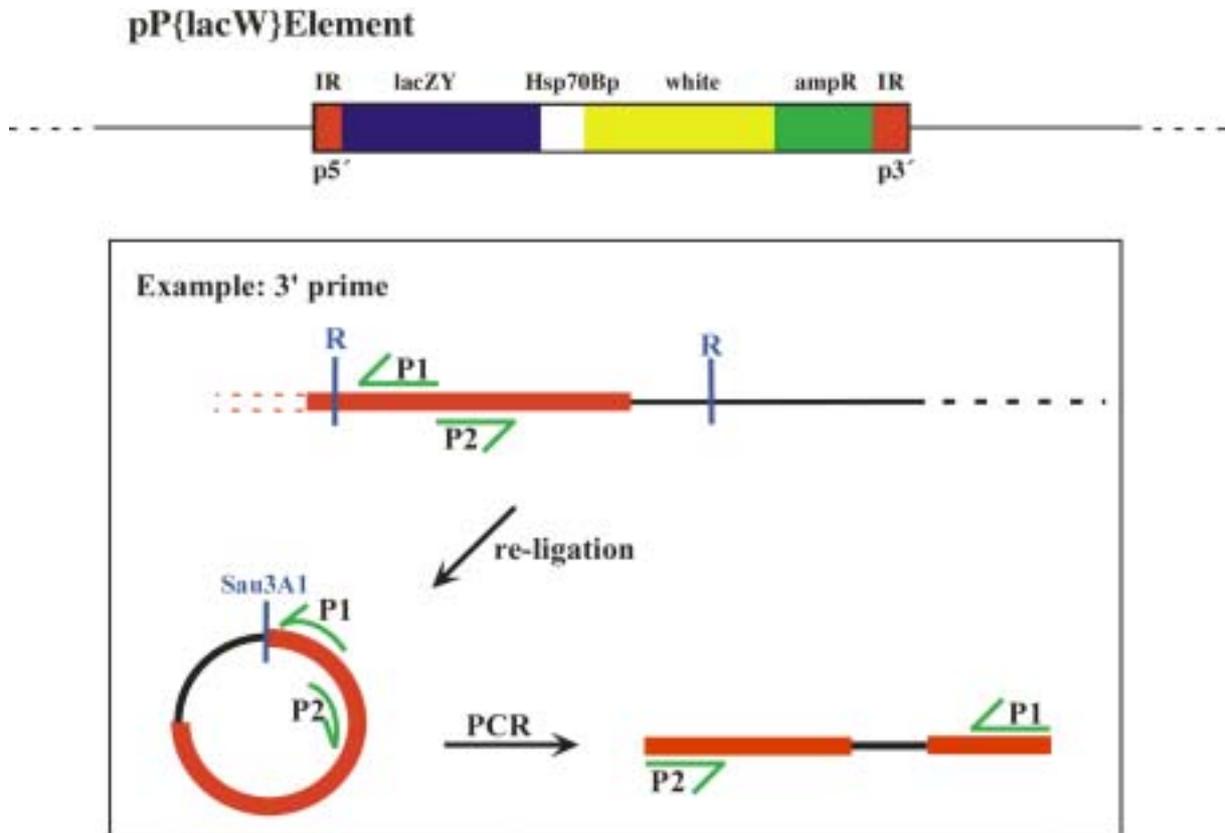


Abb 3.1: Schematische Darstellung der Inversen PCR (Schema zur Verfügung gestellt von W. Gödde): Genomische DNA, die das P-Element „lacW“ enthält, wird mit Hilfe einer Restriktions-Endonuklease (R) geschnitten. Eine der Schnittstellen des Enzyms liegt im 3'-Bereich des P-Elements, die zweite in der angrenzenden genomischen DNA. Das resultierende DNA-Stück wird mit Hilfe von Ligase zirkularisiert, und mit P-Element-spezifischen Primern wird die DNA des P-Elements und die flankierende Region genomischer DNA amplifiziert. Eine Sequenzierung des PCR-Fragments und ein Sequenzvergleich geben Aufschluss darüber, wo das P-Element in die genomische DNA inseriert ist.

Eine Subklonierung und Sequenzierung bzw. eine direkte Sequenzierung des erhaltenen PCR-Fragments geben dann Aufschluss darüber, wo genau im Genom das entsprechende P-Element inseriert ist.

Das nachfolgende Protokoll stammt von E.J. Rehm vom Berkeley *Drosophila* Genome Project (BDGP) und wurde entsprechend den eigenen Anforderungen modifiziert.

3.1.4.1 Präparation genomischer DNA

Anstelle der von E. Jay Rehm (BDGP) vorgeschriebenen Methode wurde die genomische DNA für die Inverse PCR nach der von Steller & Pirotta, 1979, beschriebenen Methode (3.1.2.1) durchgeführt.

3.1.4.2 Restriktionsspaltung genomischer DNA

Welche Restriktions-Endonukleasen für die Inverse PCR am besten geeignet sind, hängt von der Art des verwendeten P-Element-Vektors ab und davon, ob die PCR auf DNA des 5'- oder 3'-Endes des P-Element-Vektors erfolgen soll.

E. Jay Rehm gibt in seinem Protokoll drei Arten von P-Elementen (pPZ, pPlacW und pPEP) mit passenden Schnittstellen und Primern für die spätere PCR vor. In allen drei Arten können die Restriktions-Endonukleasen Sau3A, HinP1 oder MspI für separate Verdauungen verwendet werden. Alle in dieser Arbeit untersuchten P-Elemente fallen in die von E. Jay Rehm vorgegebenen Gruppen bzw. sind von der Sequenz her mit ihnen identisch.

Die präparierte genomische DNA wurde wie folgt gespalten:

10µl	genomische DNA (entspricht ca. 2 Fliegen)
2.5µl	10x Restriktionspuffer
2µl	RNase A (100µg/ml)
1µl	Restriktions-Endonuklease (10U)
9.5µl	H ₂ O

- 2.5h bei 37°C inkubieren
- 20min bei 65°C inkubieren (Restriktions-Endonuklease wird durch Hitze deaktiviert)

3.1.4.3 Ligation der restriktionsgespaltenen DNA

Der durch die Restriktionsspaltung erhaltene ‚Pool‘ von DNA-Fragmenten wird durch die nachfolgende Ligation zirkularisiert. Diese zirkularisierte DNA wird im darauffolgenden Schritt als ‚Template‘ für eine PCR eingesetzt.

Der Ligationsansatz wurde wie folgt angesetzt:

10µl	gespaltene genomische DNA (entspricht ca. 1 Fliege)
40µl	10x Ligations-Puffer (+ATP)
2µl	Ligase (4U)
350µl	dH ₂ O

- ü.N. bei 16°C inkubieren
- 1ml 100% Ethanol und 40µl 3M Natriumacetat hinzufügen
- 30min bei 13000rpm zentrifugieren
- Sediment mit 500µl 70% Ethanol waschen

- 5min bei 13000rpm zentrifugieren
- Sediment trocknen und in 150µl TE resuspendieren (entspricht etwa 1/150 Fliege pro µl)

3.1.4.4 Polymerasekettenreaktion („PCR“)

Der 50 µl - PCR-Ansatz wurde wie folgt angesetzt:

10µl	re-ligierte, genomische DNA (entspricht etwa 1/15 Fliege)
2µl	2mM dNTPs (d.h. 2µl 2mM dGTP, dATP, dTTP, dCTP)
1µl	10µM ‚forward primer‘
1µl	10µM ‚reverse primer‘
5µl	10X Pharmacia Taq Polymerase Puffer
6µl	MgCl ₂
25µl	ddH ₂ O
<hr/>	
50 µl	Gesamtvolumen

E. Jay Rehm gibt in seinem Protokoll für die verschiedenen P-Elemente und je nachdem, ob es sich um das 5‘- oder 3‘-Ende des P-Elementes handelt, spezifische Primer vor.

Typ P-Element	5‘- oder 3‘-Ende	Primer-Kombination	Annealing Temp.	Sequenz
PlacW	5‘-Ende	Plac4 Plac1	60°C	Plac4 - 5‘ – ACT GTG CGT TAG GTC CTG TTC ATT GTT – 3‘ Plac1 - 5‘ - CAC CCA AGG CTC TGC TCC CAC AAT – 3‘
PlacW	3‘-Ende	Pry4 Plw3-1	55°C	Pry4 - 5‘ - CAA TCA TAT CGC TGT CTC ATC CA – 3‘ Plw3-1 - 5‘ - TGT CGG CGT CAT CAA CTC C – 3‘
pPZ	5‘-Ende	Plac4 Plac1	60°C	Plac4 - 5‘ - ACT GTG CGT TAG GTC CTG TTC ATT GTT – 3‘ Plac1 - 5‘ - CAC CCA AGG CTC TGC TCC CAC AAT – 3‘
pPZ	3‘-Ende	Pry4 Pry1	55°C	Pry4 - 5‘ - CAA TCA TAT CGC TGT CTC ATC CA – 3‘ Pry1 – 5‘ – CCT TAG CAT GTC CGT GGG GTT TGA AT – 3‘
pPEP	5‘-Ende	Pwht1 Plac1	60°C	Pwht1 – 5‘ – GTA ACG CTA ATC ACT CCG AAC AGG TCA CA – 3‘ Plac1 - 5‘ – CAC CCA AGG CTC TGC TCC CAC AAT – 3‘
pPEP	3‘-Ende	Pry4 Pry1	55°C	Pry4 - 5‘ - CAA TCA TAT CGC TGT CTC ATC CA – 3‘ Pry1 – 5‘ – CCT TAG CAT GTC CGT GGG GTT TGA AT – 3‘

Tab. 3.1: Verwendete Primer-Kombinationen der Inversen PCR

PCR-Program:

	Dauer	Temperatur	Bedeutung
	2 min	92°C	Denaturierung der DNA
10x	10 sec	92°C	Denaturierung der DNA
	30 sec	„Primer“-abhängig	Bindung der „Primer“ and die „template“-DNA („Annealing“)
	1 min	68°C	DNA-Synthese („Elongation“)
20 x	10 sec	92°C	Denaturierung der DNA
	30 sec	„Primer“-abhängig	Bindung der „Primer“ and die „template“-DNA („Annealing“)
	1 min + 20 sec je Zyklus	68°C	DNA-Synthese („Elongation“)
	7 min	68°C	finale DNA-Synthese („Elongation“)
	4ever	4°C	Reaktionsende
	End		

Im Anschluss an die PCR wurde auf einem kleinen Kontrollgel getestet, ob die PCR erfolgreich war. Erwartet wurde pro PCR eine distinkte Bande. Die Größe der Bande ist abhängig von der Position der jeweiligen PCR-Primer bzw. der Schnittstellen der verschiedenen Restriktions-Endonukleasen in der genomischen DNA. In der Regel lag die Größe der Fragmente zwischen 0.5 und 1.5 kb.

Fiel das Resultat des Kontrollgels positiv aus, wurde die DNA des Restansatzes mittels PCR-Purifikation oder Gel-Extraction-Kit aufgereinigt.

Sie kann dann entweder per TOPO-Cloning-Kit (Firma *Stratagene*, La Jolla, USA, nähere Angaben zur Klonierung siehe „TOPO-Cloning Kit Instruction Manual“) subkloniert und dann zum Sequenzieren geschickt werden. Wahlweise können die aufgereinigten PCR-Fragmente, wenn sie in genügend hoher Konzentration vorliegen, auch direkt sequenziert werden.

3.1.5 Herstellung elektrokompenter Bakterien

(modifiziert nach Hanahan et al., 1991)

- 50ml SOB-Mg²⁺ mit einer frischen Bakterienkolonie (bei *E. coli* XL1-blue-Zellen 12.5 µg/ml Tetrazyklin hinzufügen) animpfen und ü.N. bei 37°C, 225rpm inkubieren
 - 500ml vorgewärmtes SOB-Mg²⁺ ohne Antibiotikum mit 7.5ml der ü.N.-Kultur animpfen und bei 37°C, 150rpm bis zu einer OD von 0.6-0.8 wachsen lassen
- !! Alle weiteren Arbeitsschritte sollten auf Eis/im Kühlraum erfolgen!!**
- In vorgekühlte Zentrifugenbecher überführen und 15min auf Eis inkubieren
 - 15min bei 4°C, 4000rpm zentrifugieren, Überstand vorsichtig abgießen
 - Sediment vollständig in 5000ml kaltem 10%Glycerin resuspendieren
 - 15min bei 4°C, 4000rpm zentrifugieren
 - Überstand verwerfen und Sediment erneut in 500ml kaltem 10%Glycerin resuspendieren
 - 15min bei 4°C, 4000rpm zentrifugieren
 - Überstand vollständig entfernen und Sediment in 1.5ml kaltem 10%Glycerin resuspendieren
 - Aliquots à 50µl in Eppendorf-Gefäße überführen, in flüssigem Stickstoff schockgefrieren und bei -70°C lagern (frühestens 1h nach Herstellung verwenden)

Anmerkung: Die Kompetenz der so gewonnenen elektrokompenten Zellen sollte nicht weniger als 1×10^8 Kolonien/µg Vektor betragen. Zur Testtransformation wird standardmässig ein pBlueskript-Plasmid-Vektor in einer Konzentration von 1ng/µl eingesetzt.

Lösungen:

SOB-Mg²⁺:
2.0 % Bactotrypton
0.5 % Bactoyeast
10mM NaCl
2.5mM KCl

3.1.6 Transformation elektrokompenter Bakterien

Zur Transformation elektrokompenter Zellen wurde der *E. coli* Gene Pulser von *Biorad*, München, gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

- Ligation 1:5 bis 1:10, Mini/Midi 1:50 bis 1:100 in H₂O verdünnen
- auf Eis 1µl der DNA-Lösung zu 50µl kompetenten Zellen geben, mischen und in vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettieren
- Elektroporation durchführen (bei 1,8 kV), die Bakteriensuspension mit 450µl SOC auffüllen und in ein Eppendorf-Gefäß überführen
- 1 h bei 37°C inkubieren

- eine geeignete Menge (50-200 μ l) auf einer LB-Amp-Agarplatte (100 μ g/ml Ampicillin) ausstreichen und ü.N. bei 37°C inkubieren.

Lösungen:

SOC:	2.0% Bactotrypton 0.5% Bactoyeast 10mM NaCl 2.5mM KCl 10mM MgCl ₂ 10mM MgSO ₄ 20mM Glucose
LB-Medium:	1% Bactotrypton 0.5% Bactoyeast 1% NaCl
LB-Agar:	6.3g Agar / 300ml LB
Ampicillin	100mg/ml Stammlösung in H ₂ O

3.1.7 Herstellung von transgenen UAS-*crb*-Konstrukten für die Analyse des rauhen Augenphänotyps

Für die Untersuchung von Überexpression von *crumbs* in der Augenentwicklung von *Drosophila* wurden weitere transgene Konstrukte hergestellt, die später in Fliegen injiziert und in Form transgener Stämme etabliert wurden. Ursprünglich sollten zwei Sorten von Konstrukten erstellt werden, solche, in denen das gesamte Minigen (*crb*^{MINI}) enthalten ist, und andere, in denen nur die zytoplasmatische Domäne von *crumbs* (*crb*^{intra}) vorhanden war. Da es nicht gelang das Minigen in die entsprechenden Vektoren zu klonieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit nur die *crb*^{intra}-Konstrukte hergestellt.

Folgende Konstrukte wurden mittels Klonierung erstellt:

- pGMR-*crb*38.1
- pGMR-CD2-*crb*38.1
- pBD466-*crb*38.1

3.1.7.1 Klonierungsvektoren und *crumbs*-Konstrukte:

- **pGMR (Ellis et al., 1993; Hay et al., 1994)**

Der pGMR-Vektor ist eine modifizierte Variante eines pCaSpeR-hs Klonierungsvektors von 8.9 kb Größe, in die vor den hsp70-Promotor und die Multiple Cloning Site (MCS) ein 5X-Multimer von *glass*-Bindestellen kloniert worden war. An die MCS schließt sich zusätzlich noch die hsp70-3'-flankierende Region an. Außerdem trägt der Vektor das *white*⁺-Gen und ein Resistenzgen (Ampicillin).

Das *glass*-Gen, dessen Bindestellen der Vektor trägt, ist ein Zinkfinger-Gen, das in *Drosophila* spezifisch in der Augenentwicklung eine Rolle spielt. Es wird dort während der frühen Stadien der Augenbildung in der morphogenetischen Furche der Augenimaginalscheibe exprimiert und später, ab dem L3-Stadium, in allen Zellen posterior der morphogenetischen Furche (Ellis et al., 1993; Hay et al., 1994). Gene unter der Kontrolle dieses *glass*-Promotor-Konstruktes werden also spezifisch in fast allen Zellen des sich entwickelnden Auges exprimiert.

In einigen Fällen kann es zusätzlich zu Temperatur-bedingten Unterschieden bei der Ausbildung der Phänotypen kommen. Die Gründe dafür sind unbekannt, es wird aber angenommen, daß dies teilweise mit der Anwesenheit der hsp70 3'-flankierenden DNA-Regionen zusammenhängt. Diese Temperatursensitiven DNA-Regionen können zu einer Stabilisierung des Transkripts bei erhöhten Temperaturen führen, was bei Betrachtung des hiervon abhängigen Phänotyps wie eine Verstärkung des Phänotyps erscheint.

- **pBD466 (zur Verfügung gestellt von E. Hafen)**

Der Vektor pBD466 ist eine modifizierte Version eines pW8-Klonierungs-Vektors, der wiederum von pCaSpeR abstammt. Der ursprüngliche Vektor beinhaltet ein Ori (,Origin of replication') und eine hsp70 Promotor-Region sowie das *white*⁺-Gen und ein Resistenzgen (Ampicillin). pBD466 trägt zusätzlich zwei *sevenless*-Enhancerelemente, was darin resultiert, dass in den Vektor klonierte DNA unter der Kontrolle dieser Elemente im *sevenless*-Muster exprimiert wird, sowie die *sevenless*-cDNA, die jedoch im Rahmen meiner Klonierungen aus dem Vektor herausgeschnitten wurde.

Durch die im pW8-Vektor vorgenommenen Modifikationen stehen von den ursprünglichen Schnittstellen der Multiplen Klonierungsstelle noch folgende Schnittstellen zur Verfügung:

- KpnI/Asp718 – HpaI – HpaI – StuI – XhoI – PstI -

- **crb^{intra}-38.1 (membranständige zytoplasmatische Domäne von *crumbs*, Wodarz et al., 1995)**

Beim Konstrukt crb^{intra}38.1 handelt es sich um eine verkürzte Form des *crb*-Gens. Die membranständige zytoplasmatische Domäne von *crumbs* wurde zusammen mit dem Signalpeptid, der

Transmembrandomäne, der 3'-UTR und einem Myc-Tag in den pUAST-Vektor kloniert. Das Konstrukt 38.1 ist ca. 1,5 kb groß.

- **CD2- crb^{intra} (= CD2-C23, Klebes & Knust, 2000)**

Bei CD2 handelt es sich um ein Transmembranprotein aus der Ratte. Im Konstrukt CD2-crb^{intra} handelt es sich um ein crb^{intra}-Konstrukt, in dem die *crumbs*-Transmembrandomäne gegen die Transmembrandomäne von CD2 ausgetauscht worden ist.

3.1.7.2 Klonierung der Vektoren und Konstrukte:

- **Klonierung: crb^{intra}38.1 in pGMR**

Das Konstrukt crb^{intra}-38.1 lag für diesen Versuch im Klonierungsvektor pIc20R vor und wurde aus diesem über EcoRI herausgeschnitten und in den ebenfalls über EcoRI geschnittenen pGMR-Vektor kloniert. Da es sich um eine ‚blunt end‘-Klonierung handelte, bei dem das Konstrukt in zwei verschiedenen Ausrichtungen im Vektor liegen konnte, wurde es mittels Restriktionskartierung auf seine richtige Ausrichtung innerhalb des Vektors überprüft.

- **Klonierung: CD2-crb^{intra} in pGMR**

Konstrukt CD2- crb^{intra} (CD2-C23) beinhaltet die zytoplasmatische Domäne von *crumbs* plus 3'-UTR, die mit der CD2 Transmembrandomäne gekoppelt ist und hinter der sich noch ein SV40-polyA-Schwanz anschließt.

Das CD2- crb^{intra}-Konstrukt lag in pUAST kloniert vor. Es wurde über EcoRI und BamHI aus dem Vektor herausgeschnitten und über EcoRI und HpaI in den pGMR-Vektor kloniert.

- **Klonierung: crb^{intra}38.1 in pBD488 (pW8-sev)**

Für diese Klonierung lag crb^{intra}-38.1 in pBluescript vor, aus dem es mit Asp718 und XbaI herausgeschnitten wurde. pBD466 wurde ebenfalls mit Asp718 und XbaI verdaut, wodurch die *sevenless*-cDNA aus dem Vektor entfernt wurde. An ihre Stelle wurde ebenfalls über Asp718 und XbaI das crb^{intra}-Konstrukt kloniert.

3.2 Genetische Methoden

3.2.1 Fliegenzucht und Stammhaltung von *Drosophila*

Die Fliegen wurden in Kunststoffröhrchen unterschiedlicher Größe (je nach Anzahl und Verwendungszweck der Fliegen) gehalten, die zu ca. einem Viertel mit Maismehlagar/Standardmedium gefüllt waren.

Die Aufzucht der Fliegen erfolgte im Wesentlichen, wie von Ashburner (1989) beschrieben, auf Standardmedium bei 18°C, RT und 25°C. Alle zwei bis drei Wochen wurden die Tiere auf neue Röhrchen umgesetzt.

Beim Ansetzen von Kreuzungsexperimenten bzw. bei der Auswahl spezieller Individuen zur Nachzucht wurden die Tiere mit CO₂ betäubt.

Maismehlagar (Standardmedium)	365g Maisschrot 47.5g Sojamehl 84g Trockenhefe 225g Malzextrakt 75ml 10% Nipagin 22,5ml Propionsäure 28g Agar 200g Zuckerrübensirup => mit 4,9l H ₂ O auffüllen
-------------------------------	--

3.2.2 Eiablagen

Eiablagen für Antikörperfärbungen und Kutikulapräparationen wurden auf Apfelsaft-Agarplatten angesetzt, die zur Stimulation der Eiablage mit einem Tupfer Hefe und einigen Tropfen 10%iger Essigsäure versehen wurden. Zur Eiablage wurden die Fliegen in speziell gefertigte Ablagegefäße mit Luftlöchern gesetzt, die auf die Apfelsaftagarplatten gestellt wurden

Bei mehrfacher Eiablage wurde die alte Agarplatte vom Ablagegefäß gelöst und durch eine neue Platte ersetzt. Von der alten Platte konnten dann die Embryonen mit einem Pinsel und Wasser abgesammelt werden.

Apfelsaftagar:	25% Apfelsaft 1,25% Saccharose 2,5% Trockenhefe 0,2% Nipagin 2,7% Agar
----------------	--

3.2.3 Fliegenstämme, Chromosomen und Allele

In den folgenden Tabellen sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Fliegenstämme („Balancer“-Chromosomen, mutante und transgene Fliegenstämme) zusammengefasst. Die Linien der im Rahmen des Modifier-Screens (siehe Methoden 3.2.5) verwendeten Defizienzen-Kollektion aus Bloomington bzw. weiterer drittchromosomaler Defizienzen (aus Bloomington, aus Umea und zur Verfügung gestellt von C. Klämbt) sind aus Platzgründen im Anhang aufgeführt. Nur einzelne Linien der Defizienzen-Kollektion, die im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht und mit Hilfe kleinerer Defizienzen näher kartiert wurden, sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

3.2.3.1 „Balancer“-Chromosomen

Sogenannte „Balancer“-Chromosomen werden in der *Drosophila*-Genetik verwendet, um Mutationen oder größere Defizienzen zu balancieren, d.h. heterozygot stabil über einem wildtypischen Chromosom zu halten und gleichzeitig beide Chromosomen anhand von dominanten Markern separat verfolgen zu können.

Da vor allem kleinere Mutationen in Folge von Rekombinationsereignissen verloren gehen können, werden Balancer-Chromosomen für die Haltung verwendet, bei denen es sich um wildtypische Chromosomen handelt, deren Sequenz allerdings mehrfach invertiert vorliegt, so dass Rekombinationsereignisse unmöglich gemacht werden. In der Regel sind die Balancer-Chromosomen zudem mit spezifischen dominanten Markern versehen, wie z.B. CurlyO (gebogene Flügel), die sich in Kreuzungen leicht verfolgen lassen und die Balancer eindeutig von den zumeist unmarkierten mutanten Chromosomen unterscheiden. Zudem sind Balancer in der Regel homozygot letal, so dass in Kreuzungen diese Klasse nicht gefunden wird.

Stämme	Bemerkung	Referenz
<i>1. Chromosom</i>		
FM7	Balancer-Chromosom	Lindsley und Zimm, 1992
FM7 / blue ^{ftz}	Balancer-Chromosom mit P(<i>ftz-lacZ</i>)-Insertion	Y.Hiromi
<i>2. Chromosom</i>		
CyO	Balancer-Chromosom (<i>Curly</i>)	Lindsley und Zimm, 1992
Ifa	Balancer-Chromosom (<i>Irregular facet</i>)	Aparisi und Najera, 1990
<i>3. Chromosom</i>		
TM3	Balancer-Chromosom (Marker: <i>Stubble</i> oder <i>Serrate</i>)	Lindsley und Zimm, 1992
TM6B	Balancer Chromosom (<i>tubby</i>)	Lindsley und Zimm, 1992
MKRS	Marker-Chromosom <i>M(3)76A¹ kar¹ ry¹ Sb¹</i>	Lindsley und Zimm, 1992

Tab. 3.2: Verwendete Balancer-Chromosomen

3.2.3.2 Mutante Fliegenstämme zur näheren Kartierung ausgewählter Defizienzen aus der Defizienzenkollektion

Die im Rahmen des Modifier Screens (siehe 3.2.5) verwendete Defizienzen-Kollektion („Defizienzen-Kit“) ist eine vom Stockcenter in Bloomington zusammengestellte Kollektion von Defizienzen, die zusammen 70-80% des Genoms von *Drosophila* abdecken. Ausgewählte Linien dieser Kollektion wurden im Anschluss an den Modifier-Screen mit weiteren, kleineren Defizienzen näher kartiert, die in dieser Tabelle aufgeführt sind. Alle Linien stammen, so nicht anders angegeben, aus der Bloomington-Kollektion. Nähere Daten sowie Referenzen lassen sich mit Hilfe der Stammmnummer der Bloomington-Homepage oder der Flybase-Datenbank entnehmen. Eine schematische Darstellung der jeweiligen kartierten Regionen, ihrer Defizienzen und Bruchpunkte findet sich im Ergebnisteil.

Stamm-Nr.	Name der Defizienz	Bemerkung / Bruchpunkte	Referenz
Region 3D-4C			
# 940	Dp(1;2)w[+]64b	Defizienz 003D06-E01;004F05	Bloomington
# 909	Tp(1;2)rb+71g	Defizienz 003F03; 005E08	Bloomington
# 939	Df(1)dm75e19	Defizienz 003C11; 003E04	Bloomington
# 3372	Df(1)Sp(rb)	Defizienz 003F04-004B06; 004C06-07	Bloomington
# 5981	Df(1)cho10	Defizienz 003E03; 003F-004C	Bloomington
# 5982	Df(1)cho24	Defizienz 003F04; 004A01-04 – 004C06	Bloomington
# 5983	Df(1)cho25	Defizienz 003F04; 004A01-04 – 004C06	Bloomington
# 1877	Df(1)GA102	Defizienz 003D04-05; 003F07-08	Bloomington
# 3200	Df(1)bi-DL1	Defizienz 004A03-05; 004C15- 16	Bloomington
# 5980	Df(1)cho5	Defizienz 003D; 004A	Bloomington
# 6005	Df(1)ovo44	Defizienz 004A04-05; 004F11-12	Bloomington
# 1494	Df(1)cho2	Defizienz 003E; 004A	Bloomington
# 941	Df(1)HC244	Defizienz 003E08; 004F11	Bloomington
Region 7D			
# 949	Df(1)C128	Defizienz 007D1; 007D05-06	Bloomington
# 2984	Df(1)C128	Defizienz 007D01; 007D05-06	Bloomington
P – 12260	P{lacW}I(1)G0459 ^{G0459}	P-Element, Insertion in 07D	Bloomington
P – 12246	P{lacW}I(1)G0348 ^{G0348}	P-Element, Insertion in 07D	Bloomington
P – 11289	P{lacW}I(1)G0236 ^{G0236}	P-Element, Insertion in 07D01-09	Bloomington
P – 10547	P{sev2}ch41	P-Element, Insertion in 07D01- 02, homozygot vital	Bloomington
P - 845	P{lacW}sn[AL2]	P-Element, Insertion in 07D01-02	Bloomington
P - 783	P{A92}sn[P1]	P-Element, Insertion in 07D01-02	Bloomington
P - 839	P{A92}sn[P2]	P-Element, Insertion in 07D01-02	Bloomington

Stamm-Nr.	Name der Defizienz	Bemerkung / Bruchpunkte	Referenz
P - 11264	P{EP}EP1217	P-Element, Insertion in 07D01-02	Bloomington
P - 11822	P{lacW}G0113b	P-Element, Insertion in 07D01-02	Bloomington
P - 11861	P{lacW}l(1)G0193 ^{G0193}	P-Element, Insertion in 07D01-03	Bloomington
P - 10097	P{EP}fs(1)h[EP439]	P-Element, Insertion in 07D03-04	Bloomington
P - 12125	P{lacW}l(1)G0093 ^{G0093}	P-Element, Insertion in 07D03-04	Bloomington
P - 11964	P{lacW}l(1)G0281 ^{G0281}	P-Element, Insertion in 07D03-04	Bloomington
P - 10098	P{EP}fs(1)h[EP1033]	P-Element, Insertion in 07D05-07	Bloomington
P - 11862	P{lacW}l(1)G0233 ^{G0233}	P-Element, Insertion in 07D05-09	Bloomington
P - 11863	P{lacW}G0199a	P-Element, Insertion in 07D10-14	Bloomington
PL4	-	P-Element, Insertion in 07D01-02 homozygot letal	Bourbon et al., 2002
PL53	-	P-Element, Insertion in 07D01-02 homozygot letal	Bourbon et al., 2002
PL85	-	P-Element, Insertion in 07D01-02 homozygot letal	Bourbon et al., 2002
# 60	<i>mys ts</i> ²	07D03-04	Bloomington
# 3169	<i>mys ts</i> ¹	07D03-04	Bloomington
# 1014	<i>mys</i> ^{ofc-x3}	07D03-04, EMS-Allel	Bloomington
# 5278	<i>fs(1)h</i> ^{TA54}	EMS-Allel	Bloomington
# 5284	<i>fs(1)h</i> ¹	EMS-Allel	Bloomington
# 5285	<i>fs(1)h</i> ¹⁸	EMS-Allel	Bloomington
# 5286	<i>fs(1)h</i> ⁴	EMS-Allel	Bloomington
-	<i>sn</i> ³	<i>singed</i> -Allel	Bloomington
Region 29C-30C			
# 2892	Df(2L)N22-14	Defizienz 029C01-02;030C08-09	Bloomington
# 384	Df(2L)N22-5	Defizienz 029D01-02;030C04-D01	Bloomington
# 368	Df(2L)N22-3	Defizienz 030A01-02;030D01-02	Bloomington
# 3702	Df(2L)30A-C	Defizienz 030A;030C	Bloomington
#5104	RA24 – <i>rem</i> ¹	<i>remnants</i> EMS-Allel	T. Schuppbach
-	RA74 – <i>rem</i> ²	<i>remnants</i> EMS-Allel	T. Schuppbach
P 11097	P{w+mC=lacW}Sema- 1ak13702	P-Element-Insertion	Bloomington
# 2749	<i>raw</i> ¹	EMS Allel	Bloomington
# 10532	<i>raw</i> ²	P-Element-Insertion	Bloomington
P-10363	<i>raw</i> ⁰¹⁰²¹	P-Element-Insertion	Bloomington
P-271	<i>dachs</i> ¹	semi-letal	Bloomington
P-11062	P{PZ}l(2)01482 ⁰¹⁴⁸²	P-Element-Insertion in 29C03-05	Bloomington
P-10656	P{lacW}l(2) k07118 ^{k07118}	P-Element-Insertion in 29C01-03	Bloomington
P-11195	P{lacW}emb ^{k16715}	P-Element-Insertion in 29C03-04	Bloomington
P-11070	P{lacW}l(2) k12914 ^{k12914}	P-Element-Insertion in 29C01-02	Bloomington
P-10492	P{lacW}l(2) k01105 ^{k01105}	P-Element-Insertion in 29C01-03	Bloomington
P-5431	P{ UAS-EGFP}5a.2	P-Element-Insertion in 29C	Bloomington
Region 35 C			
Def # 3138	Df(2L)b87e25	Defizienz 34B12-C1; 35B10-C1	Bloomington
Def # 3588	Df(2L)TE35BC-24	Defizienz 35B4-6; 35F1-7	Bloomington
Def # 6078	Df(2L)fn3	Defizienz 35B01;35B03-04	Bloomington

Stamm-Nr.	Name der Defizienz	Bemerkung / Bruchpunkte	Referenz
Def # 6070	Df(2L)TE35BC-8	Defizienz 35B01; 35E01	Bloomington
Def # 6241	Df(2L)TE35BC-7	Defizienz 35B03; 35B09-10	Bloomington
Def # 6057	Df(2L)A63	Defizienz 35B02; 35B02-04	Bloomington
Def # 6110	Df(2L)A178	Defizienz 35B01-02; 35B01-02	Bloomington
Def # 6223	Df(2L)A266	Defizienz 35B02-03;35B02-03	Bloomington
Def # 6063	Df(2L)A267	Defizienz 35B02-03;35B10-C01	Bloomington
Def # 6059	Df(2L)A220	Defizienz 35B02; 35C01-03	Bloomington
Def # 6058	Df(2L)A72	Defizienz 35B02-03;35B07-08	Bloomington
Def # 6113	Df(2L)nNxF2	Defizienz 35B03;35B10	Bloomington
Def # 3898	Df(2L)osp18	Defizienz 35B02;35C04-05	Bloomington
Def # 3213	Df(2L)A48	Defizienz 35B02-03;35D05-07	Bloomington
Def # 6242	Df(2L)TE35BC-28	Defizienz 35B02;35B07	Bloomington
Def # 6240	Df(2L)TE35BC-35	Defizienz 35B02;35D04	Bloomington
Def # 3078	Df(2L)osp29	Defizienz 35B03; 35E06	Bloomington
Def # 6088	Df(2L)TE35BC-4	Defizienz 35B04;35C03	Bloomington
Def # 6244	Df(2L)TE35BC-34	Defizienz 35B04;35D04	Bloomington
P - 12046	P{PZ}osp[rJ571]	P-Element 35B01-35B04	Bloomington
P - 10810	P{lacW}l(2) 35Bc[k08808]	P-Element 35B06-35B10	Bloomington
P - 12173	P{lacW}l(2) 35Bb[k11524a]	P-Element 35B06-35B07	Bloomington
P - 12174	P{lacW}l(2) 35Bg[k10011]	P-Element 35B08-35B10	Bloomington
P - 12366	P{PZ}l(2)35Bd[10408]	P-Element 35B08-09	Bloomington
P - 10689	P{lacW}Su(H) ^{k07904}	P-Element 35B08-35B09	Bloomington
P - 10707	P{lacW}C3-2-9	P-Element 35C01-35C05	Bloomington
P - 4651	P{418}Su(Pc) 35CD[T41.2]	P-Element 35C-D	Bloomington
P - 12337	P{PZ}ck[07130]	P-Element 35C01-35C03	Bloomington
P - 11408	P{PZ}stc[05441]	P-Element 35C01-C02	Bloomington
P - 10927	P{lacW}esg[B7-2-22]	P-Element 35C03	Bloomington
P - 11759	P{PZ}ms(2)35Ci ⁰²³¹⁶	P-Element 35C	Bloomington
P - 10359	P{lacW}esg ^{k00606}	P-Element 35D01-D02	Bloomington
P - 11033	P{lArB}A507.2M2	P-Element 35D01-E06	Bloomington
P - 5328	P{lacW}k09017b	P-Element 35D01-02	Bloomington
P - 12535	P{GT1}Adh[BG01049]	P-Element 35B03	Bloomington
P - 12457	P{GT1}Rab14 ^{BG01134}	P-Element 35A01	Bloomington
P - 12337	<i>crinkled</i> ⁰⁷¹³⁰	P-Element 35C01-C03	Bloomington
Region 36 C			
Def # 2583	Df(2L)cact-255rv64	35F-36A; 36D	Bloomington
P - 3656	P{lacW}l(2)35Fg ^{k08106a}	P-Element 35F11 - 36A02	Bloomington
P - 10831	P{lacW}glu[k08819]	P-Element 36A12-14	Bloomington
P - 12047	P{PZ}dac[P]	P-Element 36A01-02	Bloomington
P - 11174	P{lacW}l(2) k16215 ^{k16215}	P-Element 36A04-05	Bloomington
P - 12219	P{PZ}grp ⁰⁶⁰³⁴	P-Element 36A06-07	Bloomington
P - 11763	P{PZ}bln[1]	P-Element 36A08-B06	Bloomington
P - 11139	P{lacW}l(2) k15102 ^{k15102}	P-Element 36A10-11	Bloomington
P - 11115	P{lacW}l(2) k13905 ^{k13905}	P-Element 36A10-11	Bloomington

Stamm-Nr.	Name der Defizienz	Bemerkung / Bruchpunkte	Referenz
Region 47F-48A			
Def # 190	Df(2R)en-A	47D03; 48B02	Bloomington
Def # 1142	Df(2R)en-B	47E03; 48A04	Bloomington
Def # 1143	Df(2R)en28	48A01-02; 48B-C01	Bloomington
Def # 1145	Df(2R)en30	48A03-04; 48C06-08	Bloomington
Def # 2216	Df(2R)enE, inv ^E en ^E	47F15; 48A01	Bloomington
Def # 3373	Df(2R)en-SFX31	48A01; 48B05	Bloomington
P – 10604	P{lacW}Fpps[k06103]	P-Element 47E05 – F01-02	Bloomington
P – 10532	P{lacW}v(2) k03514 ^{k03514}	P-Element 47F01-02	Bloomington
P – 11222	P{lacW}Tapdelta ^{k17005}	P-Element 47F04-09	Bloomington
P – 10631	P{lacW}oho48A ^{k06524}	P-Element 48B01-02	Bloomington
P – 4400	P{lacW}rack[k15001]	P-Element 48A	Bloomington
P – 5801	P{en-lacZ(Xho)} enXho25	P-Element 48A01-02	Bloomington
P – 11133	P{lacW}l(2)k14708[k1 4708]	P-Element 48A03-05	Bloomington
-	en ^{IK57}	<i>engrailed</i> -EMS-Allel, amorph	Lawrence und Struhl, 1982

Tab. 3.3: Verwendete Defizienzen und P-Elemente für die nähere Kartierung von im Rahmen des Modifizier-Screens gefundenen Defizienzen.

Die im Screen gefundenen Defizienzen sind **fett** gedruckt, die kleineren Defizienzen und P-Elemente normal gedruckt.

3.2.3.3 Mutante Fliegenstämme, deren homozygote Embryonen einen unvollständigen Rückenschluss aufweisen

Stämme	Name	Bemerkung	Referenz
Chromosom 1			
# 60	<i>mys</i> ^{ts2}	<i>moyspheroid</i> EMS Allel	Wright et al., 1968
# 3169	<i>mys</i> ^{ts1}	<i>moyspheroid</i> EMS Allel	Wright et al., 1968
# 5739	<i>lethal (1)19Ec</i>	Letalmutation in 19E	Perrimon et al., 1989
# 4708	<i>PB18[1]</i>	Letalmutation in 08A-09A	Perrimon et al., 1989
Chromosom 2			
# 2785	<i>fas</i> ^l = <i>fas</i> ^{IC}	<i>faint sausage</i> EMS-Allel, embryonal letal (50B06-C03)	Lekven et al., 1998
#263	<i>fas</i> ^{IIA92}	<i>faint sausage</i> EMS Allel	Lekven et al., 1998
#264	<i>fas</i> ^{TK}	<i>faint sausage</i> EMS Allel	Lekven et al., 1998
#265	<i>fas</i> ^{IIA92}	<i>faint sausage</i> EMS Allel	Lekven et al., 1998
#266	<i>fas</i> ^{IIA92}	<i>faint sausage</i> EMS Allel	Lekven et al., 1998
#267	<i>fas</i> ^{IIA92}	<i>faint sausage</i> EMS Allel	Lekven et al., 1998
#268	<i>fas</i> ^{IIA92}	<i>faint sausage</i> EMS Allel	Lekven et al., 1998
#270	<i>fas</i> ^{P1411}	P-Element induziertes <i>fas</i> Allel	Lekven et al., 1998
#503	<i>fas</i> ^{K67}	<i>faint sausage</i> EMS Allel	Lekven et al., 1998
# 3088	<i>bsk</i> ^l	<i>basket</i> EMS Allel	Tearle und Nüsslein-Volhard, 1987
# 3176	<i>Rho</i> ^l	<i>N</i> ; <i>Rho1</i> -Allel: <i>Notch</i> [fa-g]-Mutation auf Chromosom 1 und <i>Rho1</i> -Mutation auf Chromosom 2	Halsell & Kiehart, 1998

Stämme	Name	Bemerkung	Referenz
# 3240	<i>rib</i> ¹	<i>ribbon</i> EMS Allel	Tearle und Nüsslein-Volhard, 1987
# 3242	<i>tkv</i> ⁷	<i>thickveins</i> EMS Allel	Tearle und Nüsslein-Volhard, 1987
# 3270	<i>grh</i> ^{IM}	<i>gainy head</i> EMS Allel (letal)	Tearle und Nüsslein-Volhard, 1987
# 4199	<i>zip</i> ¹	<i>zipper</i> EMS Allel	Tearle und Nüsslein-Volhard, 1987
# 5523	<i>Pkn</i> ³	<i>Protein kinase related to protein kinase N</i> - EMS allel	Konev et al., 1994
# 11191	<i>tkv</i> ^{K16713}	P-Element-induziertes <i>thickveins</i> Allel	George & Terracol, 1997
Chromosom 3			
# 563	<i>Ly</i> ¹	Röntgen-induziertes <i>Lyra</i> -Allel	Abbot und Sprey, 1990
# 821	<i>mot-36e</i> ¹	<i>mottled-36e</i> Allel	Bridges, 1937
# 2776	<i>dib</i> ²	<i>disembodied</i> EMS-Allel	Tearle und Nüsslein-Volhard, 1987
# 5407	<i>nmo</i> ^{j147}	<i>nemo</i> Allel, Δ2-3-induziert bei P-Element-Mobilisierung	Freeman und Bienz, 2002
# 10801	<i>cord</i> ^{K08713}	<i>coracle</i> Allel – P-Element-Insertion	Spradling et al., 1999
# 11538	<i>srp</i> ⁰¹⁵⁴⁹	<i>serpent</i> Allel – P-Element-Insertion	Spradling et al., 1999

Tab. 3.4: Verwendete Mutationen deren Embryonen einen unvollständigem Rückenschluss („dorsal closure defect“) aufweisen.

Die Liste der Kandidaten basiert auf einer Suche mit Hilfe der „Flybase“ Internet-Seite.

3.2.3.4 *crumbs*-, *stardust*- und *bazooka*-Mutationen

Stämme	Bemerkung	Referenz
Chromosom 1		
<i>baz</i> ^{X1106}	= <i>baz</i> ⁴ , EMS-Allel	Tearle & Nüsslein-Volhard, 1987
<i>sdt</i> ^{XN05}	amorphes <i>sdt</i> Allel	Wieschaus et al., 1984
<i>sdt</i> ^{XD96}	amorphes <i>sdt</i> Allel	Wieschaus et al., 1984
Tp (1;2) sn ^{+72d}	Transposition 7A; 8A05; 58E <i>sdt</i> ⁺ -Duplikation	Craymer und Roy, 1980
Chromosom 3		
<i>crb</i> ^{11A22}	amorphes <i>crumbs</i> Allel	Tepass & Knust, 1990
<i>crb</i> ^{8F105}	amorphes <i>crumbs</i> Allel	Tepass & Knust, 1990
<i>crb</i> ^{D88-3}	hypomorphes <i>crumbs</i> Allel	Tepass & Knust, 1990
<i>crb</i> ^{S87-2}	hypomorphes <i>crumbs</i> Allel	Tepass & Knust, 1990

Tab. 3.5: Verwendete mutante *stardust*-, *crumbs*- und *bazooka*-Allele

3.2.3.5 Gal4-Aktivatorlinien

Stämme	Bemerkung	Referenz
2. Chromosom		
<i>elav</i> -Gal4	<i>elav</i> -Gal4	Luo et al., 1994
Gal4 ^{sev}	<i>sevenless</i> -Gal4 (augenspezifisch)	Tomlinson et al., 1987
GMR-Gal4	Glass Multimer Reporter-Gal4 (augenspezifisch)	Hay et al, 1995

Tab. 3.6: Verwendete Gal4-Aktivatorlinien

Im Rahmen der phänotypischen Untersuchungen des *crumbs*-induzierten rauhen Augenphänotyps und des Modifier-Screens wurden drei verschiedene Treiberlinien verwendet, um UAS-*crumbs*-Konstrukte im Auge von *Drosophila* mit Hilfe des UAS-Gal4-Systems (siehe Methoden 3.2.4) ektopisch zu exprimieren. Bei den drei Linien handelt es sich um *elav*-Gal4, Gal4^{sev} und GMR-Gal4.

In der Linie *elav*-Gal4 wird Gal4 unter der Kontrolle eines *elav*-Enhancers spezifisch in den Photorezeptorzellen des Auges exprimiert (Lin und Goodman., 1994; Luo et al., 1994).

In der zweiten Treiberlinie, Gal4^{sev} (K24), wird Gal4 unter der Kontrolle eines *sevenless*-Enhancers exprimiert (Tomlinson et al., 1987). Dieser Treiber ist ebenfalls augenspezifisch und bereits während der Larvalentwicklung in den Linsen-sezernierenden-Zellen („Cone Cells“) der Augenimaginalscheiben aktiv sowie in einem Teil der Photorezeptorzellen. Seine Aktivität in den Linsen-sezernierenden Zellen bleibt bis in die Pupalentwicklung hin erhalten (Tomlinson et al., 1987).

In GMR-Gal4, der dritten der drei Linien wird Gal4 unter der Kontrolle von GMR (GMR = **G**lass **M**ultimer **R**eporter) exprimiert. Der ursprünglich für die Etablierung dieses Stammes verwendete Vektor „pGMR“ enthält multimerisierte Bindestellen des Glass-Proteins, das während der Larvalentwicklung in der Augenimaginalscheibe in allen Zellen posterior der morphogenetischen Furche exprimiert wird (Moses et al., 1991; Ellis et al., 1993; Hay et al., 1994). Später, während der pupalen Augenentwicklung, wird Glass weiterhin in allen Retinazellen exprimiert, mit Ausnahme der Linsen-sezernierenden Zellen (Ellis et al., 1993). Der GMR-Gal4-Stamm, in dem Gal4 prozentual in der grössten Anzahl von Zellen des Auges exprimiert wird, ist der stärkste der drei Treiberstämme.

Zusätzlich zu GMR-Gal4, unter dessen Kontrolle *Crumbs* im Auge überexprimiert wurde, wurde eine weitere transgene Linie untersucht, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurde, GMR-*crb*^{intra}38.1. Unter der Kontrolle der *glass*-Bindungsstellen wird in diesen Stämmen das *crb*^{intra}-Konstrukt, ähnlich wie im UAS-Gal4-System, ektopisch im Auge überexprimiert. Die transgene Linie GMR-*crb*^{intra}38.1 zeigt ebenso wie die GMR-Gal4 x UAS-*crb*^{intra} – Kreuzung einen rauhen Augenphänotyp.

3.2.3.6 UAS-*crumbs*-Konstrukte

In Tabelle 3.7 sind die für Kreuzungen verwendete UAS-*crb*-Konstrukte aufgelistet, in Abb. 3.2 sind sie graphisch dargestellt.

Stämme	Bemerkung	Referenz
UAS- <i>crb</i> ^{intra} 38.1.2b	auf Chromosom 2, zytoplasmatische Domäne von <i>crumbs</i> mit myc-tag, mittelstarke Expression	Wodarz et al, 1995
UAS- <i>crb</i> ^{intra} 38.1.4a	auf Chromosom 3, zytoplasmatische Domäne von <i>crumbs</i> mit myc-tag, starke Expression	Wodarz et al, 1995
UAS- <i>crb</i> ^{MINI} 30.1.4b	auf Chromosom 2, gesamtes <i>crumbs</i> -Minigen, mittelstarke Expression	Wodarz et al, 1995
UAS- <i>crb</i> ^{MINI} 30.1.2e	auf Chromosom 2, gesamtes <i>crumbs</i> -Minigen, starke Expression	Wodarz et al, 1995
UAS-myc- <i>crb</i> ^{intra} ΔERLI (AMB 14-1)	auf Chromosom 2, zytoplasmatische Domäne von <i>crumbs</i> mit myc-tag & Deletion des C-Terminus (ΔERLI)	Klebes, 1999 Klebes & Knust, 2000
UAS-myc- <i>crb</i> ^{intra} Y ₁₀ E ₁₆	auf Chromosom 2, zytoplasmatische Domäne von <i>crumbs</i> mit myc-tag & Austausch der AS 10 (Y -> A) und 16 (E -> A)	Klebes, 1999 Klebes & Knust, 2000
UAS-myc- <i>crb</i> ^{intra} Y ₁₀ E ₁₆ , ΔERLI	auf Chromosom 2, zytoplasmatische Domäne von <i>crumbs</i> mit myc-tag & Deletion des C-Terminus (ΔERLI) sowie Austausch der AS 10 (Y -> A) und AS 16 (E -> A)	Klebes, 1999 Klebes & Knust, 2000

Tab. 3.7: Verwendete UAS-*crumbs*-Effektor-Linien

3.2.4 Das UAS/Gal4-System

Bis vor einigen Jahren konnte die Bedeutung eines Gens für die Entwicklung von *Drosophila* nur anhand von vorhandenen Mutationen ermittelt werden. Deren Untersuchung erlaubt zwar die Vorhersage darüber, an welchem Ort und zu welchem Zeitpunkt die Genfunktion wahrscheinlich benötigt wird, einer vollständigen Charakterisierung des Gens sind hierbei allerdings Grenzen gesetzt. Wird das Genprodukt nämlich an mehreren Punkten der Entwicklung benötigt, so können die späteren Funktionen verdeckt werden, wenn ein früher Verlust bereits letal wirkt. Sind andererseits keine Mutationen im zu untersuchenden Gen bekannt, lassen sich überhaupt keine Aussagen über seine funktionelle Relevanz machen. Die Funktion des Gens lässt sich jedoch nicht nur anhand von Verlust-Mutationen beschreiben, sondern auch durch dessen Expression an ektopischen Orten oder in unphysiologisch hohen Dosierungen. Möglich wurde dies durch den Einsatz des Hitzeschock-induzierbaren *hsp70*-Promotors.

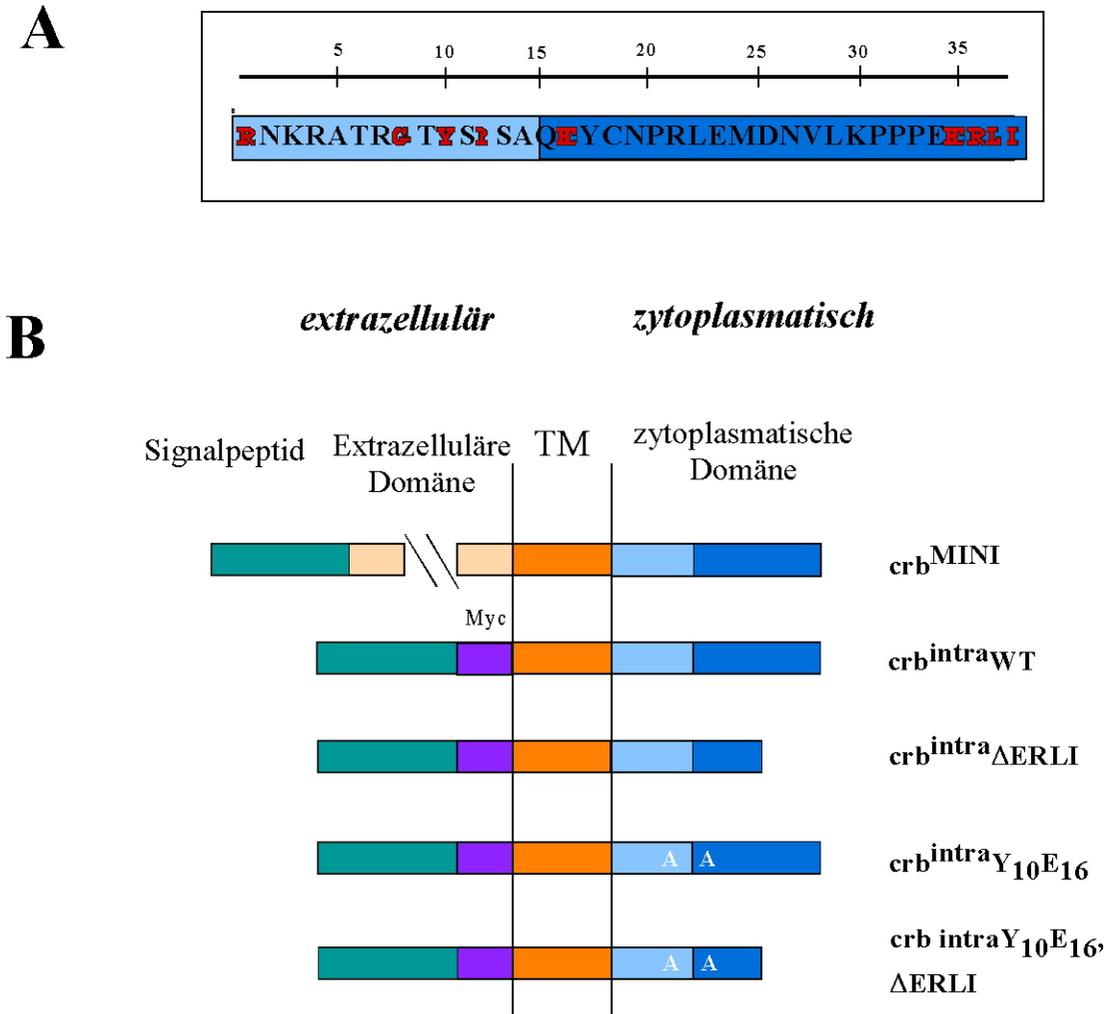


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der verwendeten UAS-crb-Konstrukte und deren Funktionalität:

A. Schematische Darstellung und Sequenz der zytoplasmatischen Domäne aus *D. melanogaster* Crb.

Der Farbcode unterteilt die zytoplasmatische Domäne in einen N-terminalen Abschnitt (hellblau), Aminosäuren 1-14) und einen carboxyterminalen Bereich (dunkelblau, Aminosäure 16-37). Der Bruchpunkt liegt in Position 15, genau an der Stelle, an der im amorphen Allel *crb^{8F105}* ein vorzeitiges Stoppcodon inseriert ist (Wodarz und Knust, 1993). Die rot unterlegten Aminosäuren sind in den bisher bekannten Crb-ähnlichen Sequenzen anderer Spezies konserviert.

B. Tabelle der verwendeten UAS-Konstrukte:

Das erste Konstrukt kodiert für die vollständige Crb-Sequenz (Wodarz et al., 1995). Es besteht aus dem endogenen Signalpeptid (grün), der extrazellulären Domäne (beige), einer Transmembrandomäne (orange) und der zytoplasmatischen Domäne (blau). Alle weitere Konstrukte stellen Fusionskonstrukte aus einem MYC-Epitop (MYC, violett), dem endogenen Signalpeptid (grün), der Transmembrandomäne (orange) sowie einem Bereich der zytoplasmatischen Domäne dar.

Diese zytoplasmatische Domäne ist entweder unverändert (*crb^{intraWT}*) oder trägt den Doppelaustausch Y10A und E16A (*crb^{intraY10E16}*) und/oder eine Deletion des C-Terminus (*crb^{intraΔERLI}*).

(Schema nach Klebes, 1999).

Dem zu untersuchenden Gen vorgeschaltet aktiviert dieser durch Inkubation bei 37°C dessen Transkription.

Dies ermöglicht zwar eine zeitliche, aber keine räumliche Kontrolle der Genexpression, da diese ubiquitär erfolgt. Außerdem besitzt der hsp70-Promotor bereits bei niedrigen Temperaturen eine Basalaktivität, die je nach zu untersuchendem Gen letal sein kann.

Erst mit Hilfe des von Brand und Perrimon im Jahre 1993 entwickelten UAS/Gal4-Systems wurde eine zeitlich und räumlich beeinflussbare Genexpression möglich. Unter dem Einfluss zeit- und gewebespezifischer Enhancer wird in einem als ‚Aktivator‘ bezeichneten Fliegenstamm der Hefe-Transkriptionsfaktor Gal4 exprimiert. In einem zweiten, ‚Effektor‘ genannten Fliegenstamm steht das zu untersuchende Gen unter der Kontrolle von UAS-Sequenzen (‚upstream-activating-sequences‘), den Bindungsstellen für Gal4. Durch Kreuzung von ‚Aktivator‘- und ‚Effektor‘-Stamm gelangen beide Komponenten in einen Organismus und führen zur UAS/Gal4-vermittelten Expression des Zielgens unter der räumlichen als auch zeitlichen Kontrolle der Enhancer.

Gelegentlich kann es vorkommen (z.B. in der in dieser Arbeit maßgeblich verwendeten Linie GMR-Gal4), dass bereits in Stämmen, in denen alleine das Gal4 gewebespezifisch exprimiert wird, mutante Phänotypen auftreten.

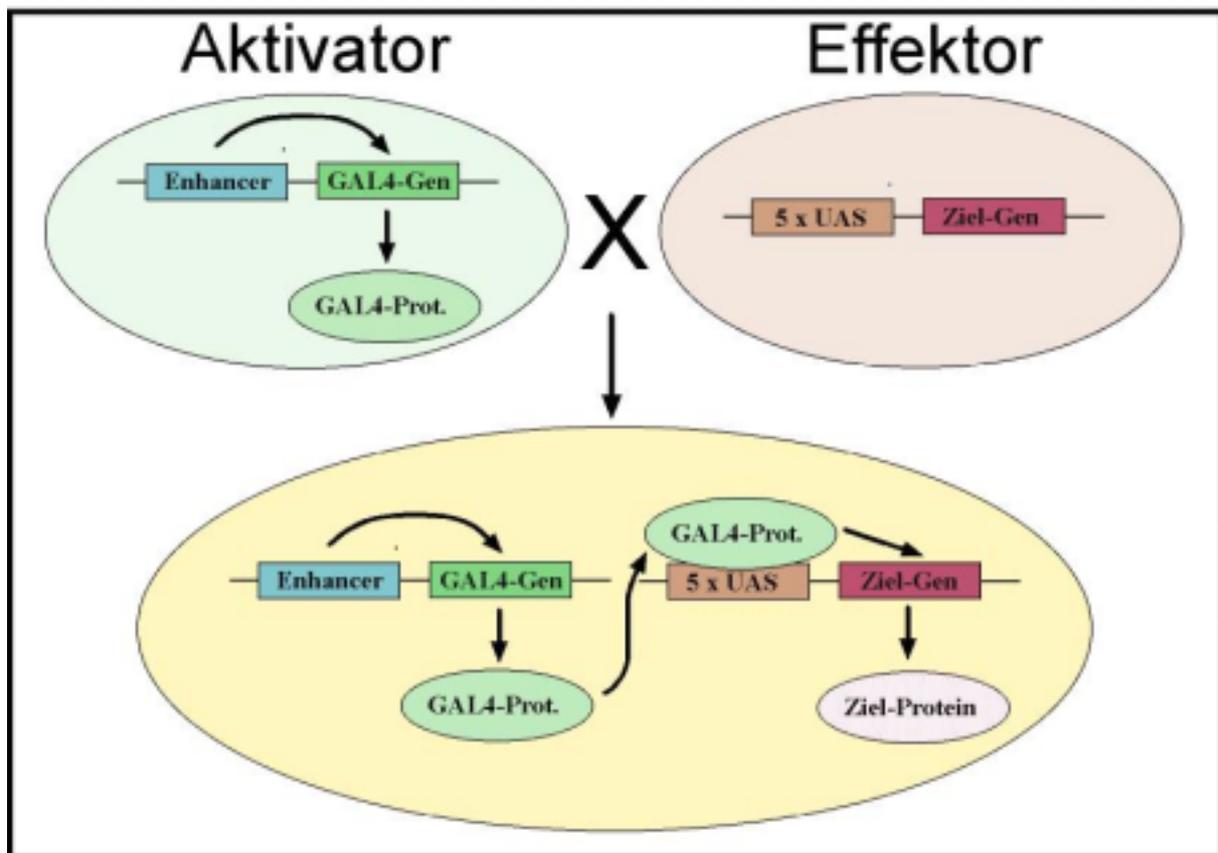


Abb. 3.3: Schematische Darstellung des UAS/Gal4-Systems

3.2.5 Suche nach Modifikatoren eines *crb*-induzierten rauhen Augenphänotyps („Modifier-Screen“)

Bei einem „Modifier-Screen“ handelt es sich um ein System, das in *Drosophila* oder anderen Organismen verwendet werden kann, um funktionelle Interaktionspartner eines bestimmten Gens oder einer bestimmten genetischen Interaktions-Kaskade zu identifizieren.

Generell wird in einem solchen Screen nach Mutationen von Genen gesucht, die den Phänotyp einer anderen Mutante modifizieren können. Das zu untersuchende Gen, in diesem Falle *crumbs*, wird mit Hilfe des UAS-Gal4-Systems (siehe Methoden 3.2.3.7) in einem bestimmten Gewebe ektopisch exprimiert, wo durch diese Überexpression ein sichtbarer dominanter Phänotyp erzeugt wird. Kreuzt man Tiere, die diesen mutanten Phänotyp aufweisen, nun wiederum mit einer Mutante von *crumbs* und erniedrigt somit die Konzentration des zuvor durch Überexpression erhöhten Genprodukts wieder, dann sollte sich dies in Form eines „modifizierten“ mutanten Phänotyps direkt in der nächsten Generation zeigen. Der gleiche Effekt tritt bei Mutationen von Genen auf, deren Produkte mit Crumbs funktionell interagieren, wobei, je nach Interaktion, der Überexpressionsphänotyp verstärkt oder abgeschwächt werden kann. Die Mutanten agieren somit als Enhancer (Verstärker) oder Suppressoren (abschwächende Faktoren) des *crumbs*-induzierten dominanten Augenphänotyps.

Ähnlich wie in anderen Screens ist es möglich, mit dieser Methode Mutationen bereits bekannter Gene zu testen und festzustellen, ob diese Gene mit dem zu untersuchenden Gen direkt oder indirekt interagieren. Zum anderen ist es möglich, unbekannte Mutanten zu testen und so neue funktionelle Interaktionspartner des zu untersuchenden Gens zu identifizieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Auge von *Drosophila* als Detektions-Gewebe gewählt. Für den Modifier-Screen wurden durch Rekombination zwei rauhäugige Linien hergestellt, GMR-Gal4-38.1.2b und Gal4^{sev}-*crb*^{intra}38.1.2b, die als Testlinien für den Screen eingesetzt wurden.

Modell des Modifier-Screens (vgl. Abb. 3.4)

Im wildtypischen Auge resultiert eine wildtypische Expression und Lokalisation von *crumbs* in einer wildtypischen Lokalisation weiterer Komponenten, in Abb. 3.3 mit A-D bezeichnet. Exprimiert man transgene Konstrukt UAS-*crb*^{intra}-38.1.2b unter der Kontrolle von Gal4^{sev} oder GMR-Gal4 ektopisch im Auge, so kommt es durch die erhöhte Konzentration von *crb*^{intra} zu einer entsprechend Fehlverteilung der Komponenten A-D, und dies resultiert letztendlich in einem rauhen Augenphänotyp (3.4 A). Kreuzt man die rauhäugige Linie GMR-Gal4-*crb*^{intra}38.1.2b mit einer Linie, die defizient für Komponente B ist (B*), so werden zwar *crumbs* als auch Komponente A noch immer ektopisch exprimiert/fehllokalisiert, aber durch die Mutation in B wird der Rest der Kaskade negativ beeinflusst, was letztendlich in einem modifizierten rauhen Augenphänotyp resultiert (3.4 B)

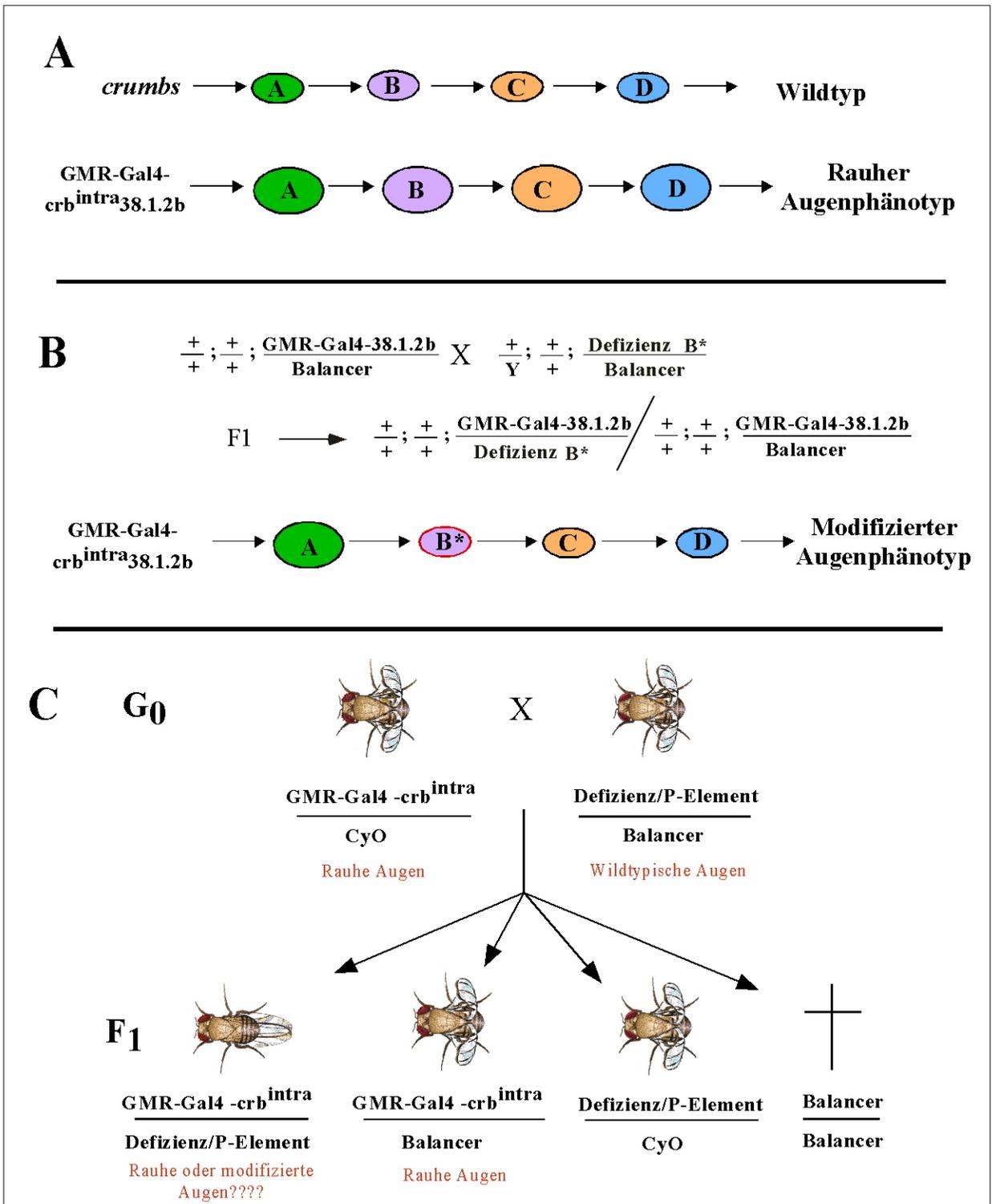


Abb. 3.1: Modell des Modifier-Screens.

A) Wildtyp: Eine normale Expression von *crumbs* resultiert in einer korrekten Lokalisation weiterer Komponenten, in diesem Schema mit A-D bezeichnet. Wird *crb^{intra}-38.1.2b* unter der Kontrolle von GMR-Gal4 ektopisch im Auge exprimiert, so kommt es durch die erhöhte Konzentration von Crumbs zu einer Fehlverteilung der Komponenten A-D und dies resultiert in einem rauhen Augenphänotyp.

B) Kreuzt man die rauhäugige Linie GMR-Gal4-*crb^{intra}38.1.2b* mit einer für Komponente B defizienten (B*), so wird zwar *crumbs* sowie Komponente A noch immer ektopisch exprimiert, aber durch die Mutation in B wird der Rest der Kaskade negativ beeinflusst, was in einem modifizierten rauhen Augenphänotyp resultiert.

(C) Die Modifikation wird ermittelt, indem man zwei aus der Kreuzung resultierende Klassen von Fliegen vergleicht.

Beide Klassen sind heterozygot für GMR-Gal4-*crb^{intra}38.1.2b* und hierdurch gleich stark rauhäugig. Das homologe Chromosom einer der beiden Fliegenklassen jedoch trägt eine Defizienz, während das entsprechende Chromosom der anderen Klasse das wildtypische Balancer-Chromosom besitzt. Modifiziert ein in der Defizienz enthaltenes Gen den rauhen Augenphänotyp so erkennt man dies im Vergleich mit der rauhäugigen, über dem Balancer gehaltenen Klasse.

Die Modifikation wird ermittelt, indem man zwei aus der Kreuzung resultierende Klassen von Fliegen vergleicht. Beide Klassen tragen GMR-Gal4-*crb*^{intra38.1.2b} in Heterozygose und sind somit gleich stark rauhäugig. In einem Falle jedoch ist das homologe Chromosom defizient für B (B*), wohingegen der Balancer wildtypisch für Gen B ist. Modifiziert die Defizienz B den rauhen Augenphänotyp, so erkennt man dies im Vergleich mit der über dem Balancer gehaltenen rauhäugigen Linie (Abb. 3.4 B und C).

Bei einer Analyse zweit- und drittchromosomaler Defizienzen lässt sich die Modifikation sowohl in Männchen als auch Weibchen erkennen. Für Defizienzen des 1. Chromosoms wurden nur die Weibchen verglichen, da Männchen, die hemizygot für die Defizienz sind (Def/Y), nicht lebensfähig sind.

3.2.6 Abschwächung eines mutanten *crumbs*-Phänotyps durch Defizienzen

Um festzustellen, ob die im Modifier-Screen gefundenen Defizienzen den embryonalen *crumbs*-Phänotyp abschwächen können, wurden Jungfrauen der Defizienzen/P-Elemente (Def/Balancer) mit *crumbs*-mutanten Männchen (*crb*^{11a22}/TM3 oder *crb*^{8F105}/TM3) gekreuzt.

Für einen zweiten Kreuzungsschritt wurden aus der geschlüpften F1-Generation Tiere selektiert, die nicht balanciert waren, d.h. somit transheterozygot die Defizienz und die *crumbs*-Mutation über je einem Wildtyp-Chromosom trugen (Def/+; *crb*/+). Die Weibchen dieses Phänotyps wurden erneut mit *crumbs*-mutanten Männchen gekreuzt.

Wie dem Schema zu entnehmen ist, ergeben sich bei Kutikula-Präparationen zwei Klassen, die letal sind. Beide sind homozygot mutant für *crumbs*, jedoch trägt eine der beiden Klassen noch zusätzlich heterozygot eine Kopie der zu untersuchenden Defizienzen/P-Elemente. In Kreuzungen mit Defizienzen, die auf dem ersten Chromosom lokalisiert sind, kommt noch eine weitere Gruppe hinzu, in der Männchen die Defizienz hemizygot tragen (Def/Y;;*crb*/*crb*).

In Kutikula-Präparationen dieser Kreuzung sollten nun zumindest in 50% der in Ablagen liegenden Embryonen ein *crumbs*-Phänotyp erkennbar sein. Die anderen 50% können, wenn die Defizienz als funktioneller Interaktionspartner von *crumbs* wirkt, eine Abschwächung des mutanten *crumbs*-Phänotyps zeigen, oder, wenn sie nicht funktionell mit *crumbs* interagiert, ebenfalls den normalen *crumbs*-Phänotyp. Für die Defizienzen auf dem ersten Chromosom kommt durch die hemizygoten Männchen (Def/Y;;*crb*/*crb*) möglicherweise noch eine dritte Klasse hinzu, die eine Abschwächung des mutanten *crb*-Phänotyps zeigen kann, die stärker als die der Weibchen ist.

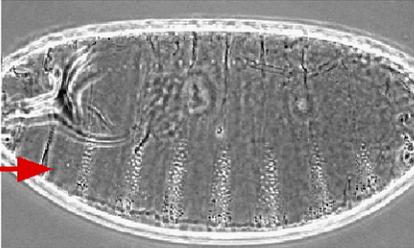
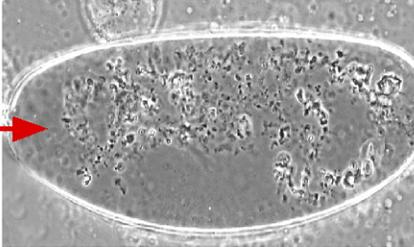
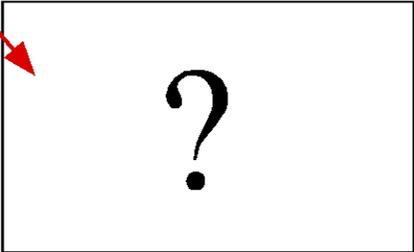
	P $\frac{+}{+}; \frac{\text{Def}}{\text{CyO}}; \frac{+}{+}$		X $\frac{+}{Y}; \frac{+}{+}; \frac{\text{crb}^{8F105/11A22}}{\text{TM3}}$		
F1	$+++; \text{crb}$	$+++; \text{TM3}$	$Y; ++; \text{crb}$	$Y; ++; \text{TM3}$	
$+; \text{Def}; +$	$\frac{+}{+}; \frac{\text{Def}}{+}; \frac{+}{\text{crb}}$	$\frac{+}{+}; \frac{\text{Def}}{+}; \frac{+}{\text{TM3}}$	$\frac{+}{Y}; \frac{\text{Def}}{+}; \frac{+}{\text{crb}}$	$\frac{+}{Y}; \frac{\text{Def}}{+}; \frac{+}{\text{TM3}}$	
$+; \text{CyO}; +$	$\frac{+}{+}; \frac{\text{CyO}}{+}; \frac{+}{\text{crb}}$	$\frac{+}{+}; \frac{\text{CyO}}{+}; \frac{+}{\text{TM3}}$	$\frac{+}{Y}; \frac{\text{CyO}}{+}; \frac{+}{\text{crb}}$	$\frac{+}{Y}; \frac{\text{CyO}}{+}; \frac{+}{\text{TM3}}$	
	X $\frac{+}{+}; \frac{\text{Def}}{+}; \frac{+}{\text{crb}}$		X $\frac{+}{Y}; \frac{+}{+}; \frac{\text{crb}^{8F105/11A22}}{\text{TM3}}$		
F2	$+++; +$	$+; \text{Def}; +$	$+++; \text{crb}$	$+; \text{Def}; \text{crb}$	
$Y/+; +; \text{crb}$	$\frac{+}{Y/+}; \frac{+}{+}; \frac{+}{\text{crb}}$	$\frac{+}{Y/+}; \frac{\text{Def}}{+}; \frac{+}{\text{crb}}$	$\frac{+}{Y/+}; \frac{+}{+}; \frac{\text{crb}}{\text{crb}}$	$\frac{+}{Y/+}; \frac{\text{Def}}{+}; \frac{\text{crb}}{\text{crb}}$	
$Y/+; ++; \text{TM3}$	$\frac{+}{Y/+}; \frac{+}{+}; \frac{+}{\text{TM3}}$	$\frac{+}{Y/+}; \frac{\text{Def}}{+}; \frac{+}{\text{TM3}}$	$\frac{+}{Y/+}; \frac{+}{+}; \frac{\text{crb}}{\text{TM3}}$	$\frac{+}{Y/+}; \frac{\text{Def}}{+}; \frac{\text{crb}}{\text{TM3}}$	
					

Abb. 3.4: Schema der erwarteten Genotypen:

Bei den farbig markierten Kombinationen ist eine Abschwächung des mutanten *crumbs*-Phänotyps durch Defizienzen möglich

3.3 Mikromanipulation von *Drosophila melanogaster*

3.3.1 Keimbahntransformation

Die Keimbahntransformation von *Drosophila melanogaster* stellt eine einfache Methode zur Erzeugung transgener Fliegenstämme dar (Spradling, 1986). Für den Gentransfer werden dabei transponierbare Elemente, sogenannte P-Elemente, genutzt. Diese benötigen eine Transposase sowie als deren Erkennungssequenzen flankierende „inverted repeats“, um in ein Genom integrieren zu können. Für die Technik der Keimbahntransformation sind diese beiden Komponenten auf unterschiedlichen Plasmiden lokalisiert. Während in den P-Element-Transformationsvektoren die zu übertragende DNA zwischen den „inverted repeats“ lokalisiert ist, stellt ein sogenanntes Helfer-Plasmid (pUChs π Δ 2-3, Laski et al., 1986) die Transposase zur Verfügung, die in trans für eine Integration der gewünschten DNA ins Fliegen-genom sorgt.

3.3.1.1 Herstellung des Injektionsmixes

Für den Injektionsmix wurden etwa 4 μ g DNA des P-Element-Transformationsvektors und 1 μ g DNA des Helfer-Plasmids (pUChs Δ 2-3) gemischt. Desweiteren wurden 1 μ l 10x Injektionspuffer sowie 1 μ l 2% Phenolrot zugefügt und mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 10 μ l aufgefüllt.

Lösungen:

10x Injektionspuffer:	5mM KCl
	0.1mM Na-Phosphatpuffer, pH 6.8

3.3.1.2 Herstellung der Injektionskapillaren

Glaskapillaren aus Sodarklarglas (*Hilgenberg*, Malsfeld) wurden mit dem Mikroelektrodenpuller PUL-1 (*W-P Instruments Inc.*, New Haven, USA, bei der Einstellung Delay 2, Heat 10) gezogen, danach 5min unter einem Anstellwinkel von ca. 30° geschliffen (*Bachofer*, Reutlingen), in den Mikromanipulator (*Narishige*, Tokyo, Japan) eingespannt und von hinten mit 3S Voltalef-Fluorcarbon-Öl (*Lehmann und Voss*, Hamburg) befüllt. Vor dem Befüllen der Kapillaren mit dem Injektionsmix wird dieser 5min bei 13000rpm zentrifugiert, um Schwebeteilchen, die die Kapillare verstopfen könnten, abzutrennen.

Aus dem Überstand wird 1 μ l abpipettiert und auf ein silikonisiertes Deckglas aufgebracht. Von dort kann der Injektionsmix unter mikroskopischer Kontrolle vorn in die Kapillare aufgezogen werden.

3.3.1.3 Mikroinjektion

Für die Injektionen werden *white⁻*-Embryonen (*w¹¹¹⁸*) benutzt. Da alle P-Element-Transformationsvektoren ein *white+*-Gen tragen, das ins Fliegen-genom integriert, können transgene Fliegen anhand ihrer Augenfarbe (von schwach gelb bis dunkelrot, je nach Integrationsort) erkannt werden.

Die Injektion in den posterioren Teil der *w⁻*-Embryonen erfolgt vor der Bildung der Polzellen, die die spätere Keimbahn der Fliege bilden. Nur so bietet sich die Möglichkeit, dass die DNA bei der Zellbildung mit internalisiert und ins Genom der Polzellen integriert wird. Dies ist etwa bis 1.5h nach Befruchtung möglich, weil der Embryo bis dahin ein Syncytium von sich teilenden Kernen darstellt (Campos-Ortega und Hartenstein, 1997).

Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, die *w⁻*-Fliegen zur Eiablage etwa zwei Tage vor Beginn der Mikroinjektion auf Apfelsaft-Agarplatten zu setzen und diese häufiger zu wechseln, da dann mehr Eier gelegt werden und die Embryonen einer Ablage vom Alter her synchronisiert sind.

- *w⁻*-Fliegen für ca. 30min auf Apfelsaft-Agarplatten setzen und die abgelegten Eier von Hand oder chemisch (2 min. in einem 1:1 Gemisch aus Natriumhypochlorid und H₂O, anschließend gut waschen) dechorionisieren
- Embryonen in gleicher Orientierung auf einem Apfelsaft-Agarblöckchen aufreihen und übertragen auf ein vorher mit Kleber bestrichenes Deckglas
- Trocknung der Embryonen unter optischer Kontrolle bis sich bei Berührung mit einer Präpariernadel Falten bilden
- Fixieren des Deckglases auf einem Objektträger und Embryonen auf dem Deckglas mit 3S Voltalef-Öl überschichten
- Injektionen unter dem Mikroskop mit dem vorbereiteten Mikromanipulator:
Injektionsdruck kann über Mikrometerschraube variiert werden und sollte so eingestellt sein, dass der Injektionsmix erst beim Eindringen in einen Embryo ausfließt (Kontrolle durch den Phenolrot-Zusatz)
- Fertig injizierte Embryonen mit 3S Voltalef-Öl überschichten und bis zum Schlüpfen in einer feuchten Kammer bei 18°C aufbewahren
- Geschlüpfte L1-Larven zu ca. 50 Individuen in einem vorbereiteten frischen Fliegenröhrchen (Brei anfeuchten, auflockern und mit einem Tupfer Hefe versehen) sammeln und bis zum Schlüpfen der adulten Fliegen ebenfalls bei 18°C halten

Lösungen:

Kleber:	Tesa-Pak, Paketklebeband (<i>Beiersdorf</i> , Hamburg) einige Tage in Heptan einweichen, dann abzentrifugieren und den Überstand verwenden
Apfelsaft-Agarplatten:	40g Agar 240ml Apfelsaft (100%) 17g Rohrzucker => mit H ₂ O auf 1l auffüllen, aufkochen, nach dem Abkühlen auf 60°C mit 30ml Nipargin versetzen und Platten gießen
10% Nipargin:	100g Nipargin in 1l 70% Ethanol lösen

3.3.1.4 Isolierung und Balancierung transgener Fliegen

Den geschlüpften ‚Gründertieren‘ (G0) kann nicht angesehen werden, ob eine Insertion der injizierten DNA erfolgt ist, da diese nicht die somatischen, sondern nur die Keimbahnzellen betrifft. Aus diesem Grund wird jedes G0-Tier gegen 3 Tiere mit dem Genotyp *w-/w-(Y); Gla/CyO* (weißäugig mit zweitchromosomalem Balancer-Chromosom) gekreuzt. Unter deren Nachkommen befinden sich rotäugige Tiere, wenn es zu einer Keimbahntransformation des G0-Tieres gekommen ist. Zur Ermittlung des Integrationsortes des P-Elementes auf dem ersten, zweiten oder dritten Chromosom bedarf es weiterer Kreuzungen gegen erst-, zweit- und drittchromosomale Balancerchromosomen. Stämme, die homozygot nicht lebensfähig sind, werden balanciert etabliert und gehalten. Im Falle von Mehrfachinsertionen wird versucht, diese durch Kreuzung zu trennen, separat auszukreuzen und zu etablieren.

3.3.2 Etablierung transgener Linien der Konstrukte pGMR-crb^{intra}38.1, pGMR-CD2-crb^{intra} und pBD466-crb^{intra}38.1

Die drei im Rahmen dieser Arbeit hergestellten transgenen Konstrukte, pGMR-crb^{intra}38.1, pGMR-CD2-crb^{intra} und pBD466-crb^{intra}38.1 (vgl. Methoden 3.1.7), wurden mittels Keimbahntransformation in *white*⁻-Embryonen injiziert. Die daraus resultierenden Fliegen wurden erneut mit *white*⁻-Fliegen gekreuzt und rotäugige, transgene Fliegen aus diesen Kreuzungen wurden als Stämme etabliert (siehe folgende Tabelle 3.8). Mit Hilfe von Testkreuzungen wurde überprüft, auf welchem Chromosom das verwendete Konstrukt inseriert ist. Alle transgenen Linien der drei Konstrukte sind homozygot lebensfähig, aber nur die pGMR-crb^{intra}38.1-Tiere zeigen einen rauhen Augenphänotyp.

Konstrukt	Stamm-Nummer	Lokalisation	Kommentar
pGMR-38.1	# 57, # x53	1. Chromosom	mittelstark rauh
pGMR-38.1	# 72, # x27	2. Chromosom	schwach rauh
pGMR-38.1	# 14, # 16, # 26, # 27, # 29, # 32, # 45, # x35, # x38, # x43, # 59, # x4	3. Chromosom	mittelstark rauh
pGMR-38.1	# 54	3. Chromosom mögliche zweite Insertion auf dem 1. Chromosom	mittelstark rauh
pGMR-CD2-C23	# 25, # 37, # 43	1. Chromosom	wildtypisch
pGMR-CD2-C23	# 17, #39, # 89, # 93, # 96, # 111, # 130, # 135, # 140	2. Chromosom	wildtypisch
pGMR-CD2-C23	# 12, #100, # 103, # 104	3. Chromosom	wildtypisch
pBD466-38.1	# 4	3. Chromosom	wildtypisch

Tab. 3.8: Tabellarische Auflistung der etablierten Linien, ihres Insertionsortes und des resultierenden Augenphänotyps

3.4 Histologische Methoden

3.4.1 Verwendete primäre und sekundäre Antikörper

Antikörper	Organismus /Konjugat	Verdünnung	Referenz
<i>Erstantikörper</i>			
α -crb (Cq4)	Maus	1:5-1:10	Tepass und Knust, 1993
α - β -Gal	Kaninchen	1:5000	Cappel /Boehringer
<i>Zweitantikörper</i>			
Ziege-anti-Maus	HRP (Meerrettich-Peroxidase)	1:750	Dianova
Ziege-anti-Maus	AP (alkalische Phosphatase)	1:750	Dianova
Ziege-anti-Kaninchen	HRP (Meerrettich-Peroxidase)	1:750	Dianova

Tab. 3.9: verwendete Antikörper

3.4.2 Antikörperfärbungen an Embryonen

(Mitchison und Sedat, 1983; Freeman et al., 1986)

- Embryonen dechorionisieren (ca. 4min in Natriumhypochlorid), anschließend gut mit H₂O waschen
- Embryonen in Eppendorf-Gefäß mit Fixierlösung überführen und 10-15min am Über-Kopf-Rotor fixieren
- Embryonen devitellinisieren: wässriges Fixativ (untere Phase) abziehen, 500µl Methanol zugeben und 1min kräftig schütteln, Embryonen absinken lassen und Überstand abziehen, weitere 10min in frischem Methanol inkubieren
- Embryonen in Methanol bei -20°C lagern oder Methanol abziehen, durch 1xPBT ersetzen und 3 x 20min in 1xPBT waschen
- Embryonen 1h in 1xPBT + 10%ngs (,normal goat serum‘ = Ziegen Serum) ,blocken‘
- Inkubation der Embryonen mit dem ersten Antikörper (in 1xPBT + 10%ngs) ü.N. bei 4°C oder auch für 2h bei RT. (Verdünnung des Erstantikörpers siehe Tabelle 3.9)
- ersten Antikörper abziehen (mehrfach wiederverwendbar) und durch 1xPBT ersetzen
- 3 x 20min in 1xPBT auf dem Taumler waschen
- Inkubation der Embryonen mit dem zweiten Antikörper (1xPBT + 10%ngs) für 2h bei RT (Verdünnung siehe Tabelle 3.9), anschließend zweiten Antikörper abziehen und durch 1xPBT ersetzen
- 3 x 20min in 1xPBT auf dem Taumler waschen
- Embryonen in Blockschälchen oder Mikrotiterplatte überführen, 1xPBT durch Färbelösung ersetzen (optische Kontrolle der Färbereaktion unter dem Binokular)
- nach Beendigung der Färbereaktion Färbelösung abziehen und mehrfach mit 1xPBT waschen
- Alkoholreihe zum Entwässern der Embryonen: jeweils 5min in 50%, 70%, 90%, 96% Ethanol, 2x 10 min in 100% Ethanol, einbetten in Kanadabalsam (*Sigma*, Deisenhofen)

Lösungen:

Fixierlösung:

200µl PEMS
125µl 37% Formaldehyd
300µl Heptan

PBS 1x

130mM NaCl
7 mM Na₂HPO₄ (pH 7,4)
3 mM NaH₂PO₄

PBT

1xPBS + 0,1% Tween oder Triton X-100 (nichtionisches Detergens)

PEM	0.1M PIPES (Sigma, Deisenhofen) 2mM MgSO ₄ 1mM EGTA => pH6.9 mit konz. NaOH einstellen, autoklavieren und bei 4°C lagern
Ziegenserum (ngs):	Gibco/BRL, Eggenstein, inaktiviert durch 1h bei 65°C, gelagert bei -20°C
Färbelösung:	800µl 1xPBT + 200µl DAB-Stock (vorher aktiviert mit 1-2 µl 30% H ₂ O ₂)
DAB-Stock:	1mg/ml DAB (3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid, Aldrich, Steinheim) in 1xPBS, gelagert bei -20°C

Ließ sich nur eine sehr schwache HRP-Färbung detektieren, so wurde das Vectastain Elite ABC Kit der Firma Vector, Burlingame, USA verwendet, um das HRP-Signal zu verstärken. Der Verstärkereffekt beruht dabei einerseits auf der außerordentlich hohen Affinität des Glycoproteins Avidin zu dem Vitamin Biotin und andererseits auf dem Vorhandensein von vier Biotin-Bindungsstellen je Avidin-Molekül.

- fixierte Embryonen 3 x 20min in 1xPBT waschen
- 3 x 20min in 5% NGS ‚blocken‘
- Inkubation mit dem ersten Antikörper (in 1xPBT + 5% ngs) ü.N. bei 4°C
- 3 x 20min in 1xPBT waschen
- Inkubation mit dem zweiten, Biotin-gekoppelten Antikörper (1:200 verdünnt in 1xPBT + 5% ngs) für 2h bei RT
- 5 x 20 min in 1xPBT waschen
- 10µl Reagenz A (Avidin DH) in 1ml 1xPBT geben, kurz schütteln, mit 10µl Reagenz B (biotinylierte HRP) mischen und 30min stehen lassen
- Mischung zu den Embryonen geben und 1-2h bei RT oder ü.N. bei 4°C inkubieren
- 5 x 20min in 1xPBT waschen
- HRP-Färbung und Eindecken der Präparate erfolgen wie oben bereits beschrieben

3.4.3 Antikörperfärbungen an Imaginalscheiben

Im Rahmen der Analysen des rauhen Augenphänotyps wurden auch Antikörperfärbungen an Augen-Imaginalscheiben durchgeführt. Die Färbungen verlaufen nahezu identisch zu der in 3.5.2 beschriebenen Färbung der Embryonen. Allein die Präparation und Fixierung der Scheiben verläuft, um sie nicht zu beschädigen, anders.

3.4.4 X-Gal-Färbung an Embryonen

- Embryonen dechorionisieren (ca. 4min in Natriumhypochlorid) und gut mit H₂O waschen
- Embryonen in Eppendorf-Gefäß mit ca. 500µl Fixierlösung überführen und 10min am Überkopf-Rotor fixieren
- Embryonen mehrmals mit 1xPBT waschen, bis sie nicht mehr aneinander haften (1xPBT dabei häufiger austauschen)
- Embryonen in Dreierblockschälchen überführen, 1xPBT abziehen und durch 200µl Färbelösung ersetzen
- Färbung unter häufiger Kontrolle bei RT oder 37°C, eventuell ü.N. im Kühlschrank
- Färbelösung abziehen, mehrfach mit 1xPBT waschen und mehrere Stunden bis ü.N. im Kühlschrank in 50% Glycerin inkubieren
- in 100% Glycerin einbetten und gegebenenfalls mit Nagellack zur längeren Aufbewahrung versiegeln

Lösungen:

Fixierlösung:	im Schliffreagenzglas: 0.5ml 50% Glutaraldehyd 1.5ml 1xPBS, 8ml Heptan => schütteln und aus oberer Heptanphase 6ml weiterverwenden
10xPBS:	1.3M NaCl 0.07M Na ₂ HPO ₄ 0.03M NaH ₂ PO ₄ => ad 1l mit H ₂ O auffüllen und autoklavieren => für 1xPBS 10xPBS 1:10 mit autoklaviertem H ₂ O verdünnen
1xPBT:	1xPBS + 10% Triton X-100 (<i>Serva</i> , nichtionisches Detergens)
Färbelösung:	20µl 10% X-Gal (5-Br-4-Cl-3-Indolyl-β-D-Galactosid)-DMSO in 1ml X-Gal-Puffer (X-Gal-Puffer bei 50-65°C vorwärmen, X-Gal-DMSO zugeben) => einige min bei 50-65°C vorinkubieren, sonst flockt X-Gal aus
X-Gal-Puffer:	0.15M NaCl, 1mM MgCl ₂ , 10mM Na-Phosphatpuffer pH7.2 3.3mM K ₃ Fe(CN) ₆ 3.3mM K ₄ Fe(CN) ₆

3.4.5 X-Gal-Färbungen an Imaginalscheiben

- Präparation der Imaginalscheiben in 1xPBS wie unter 3.5.3.1 beschrieben
- Fixierung der Scheiben in 250µl Fixierlösung auf dem Taumler
- Fixierlösung abziehen und Imaginalscheiben mehrfach mit 1xPBT waschen
- 3 x 20min mit 1xPBT waschen
- 1xPBT absaugen und durch Färbelösung ersetzen
- Färbung unter häufiger Kontrolle bei RT oder 37°C, eventuell ü.N. im Kühlschrank
- Färbelösung abziehen, mehrfach mit 1xPBT waschen und mehrere Stunden bis ü.N. im Kühlschrank in 50% Glycerin inkubieren
- unerwünschtes, den Imaginalscheiben noch anhaftendes Gewebe mit einer Pinzette entfernen
- in 100% Glycerin einbetten und Präparat gegebenenfalls mit Nagellack versiegeln

Lösungen:

Fixierlösung: 250µl 1xPBS
5µl 50% Glutaraldehyd

Färbelösung: 6.25µl 10% X-Gal-DMSO auf 250µl X-Gal-Färbepuffer
(Färbepuffer bei 50°C vorwärmen, X-Gal-DMSO zugeben und noch einige min bei 50°C vorinkubieren)

3.4.6 Präparation embryonaler Kutikula

Fliegen des gewünschten Genotyps werden ü.N. auf Apfelsaftagarplatten zur Eiablage gebracht, und die abgelegten Eier werden anschließend für weitere 48h bei 25°C inkubiert, um sicher zu gehen, dass alle Embryonen die Embryonalentwicklung prinzipiell haben abschließen können und, falls möglich, auch Kutikula sezerniert haben. Nach dem Waschen mit H₂O, dem Dechorionisieren (ca. 4min in Natriumhypochlorid) und nochmaligem Waschen mit H₂O werden die Embryonen auf einem Objektträger in einen Tropfen Hoyers/Lactat überführt und eingedeckt. Die Klärung erfolgt ü.N. bei 65°C.

Lösungen:

Hoyers/Lactat: 50ml H₂O + 30g Gummi arabicum ü.N. rühren, 200g Chloralhydrat und 16ml Glycerin zugeben; mindestens 3h bei 12000rpm zentrifugieren und den Überstand verwerfen; 1:1 mit Lactat mischen.

3.4.7 Versuche an pupalen Augenimaginalscheiben

Im Gegensatz zu larvalen Augenimaginalscheiben, bei denen die Größe der Larve bereits Aufschluss über das Entwicklungsstadium und den Zustand der Scheibe gibt, sieht man Puppen ihr Alter nicht an und kann somit keine Rückschlüsse auf das Alter der pupalen Imaginalscheiben ziehen.

Will man also Imaginalscheiben eines bestimmten pupalen Stadiums beobachten, so muss man die Tiere zunächst zeitlich synchronisieren (,timen'), bevor man sie für weitere Versuche (Cobaltsulfid-Färbungen oder Antikörperfärbungen) verwenden kann.

3.4.7.1 Altersbestimmung und zeitliches Synchronisieren von pupalen Imaginalscheiben (Wolf & Ready, 1991a/b; Reiter et al., 1996)

Um pupale Augen-Imaginalscheiben in bestimmten Stadien ihrer Entwicklung beobachten zu können, muss man ihre Entwicklung zeitlich synchronisieren. Hierzu wurden Larven im späten L3-Stadium (kurz vor der Verpuppung) gesammelt und in ein separates Röhrchen überführt, wo sie sich kurze Zeit später verpuppten. Die Larven, die sich etwa zum gleichen Zeitpunkt verpuppt hatten (Zeitraum von ca. 1-2h), wurden von aussen am Röhrchen markiert. Die Puppen wurden dann bei RT oder 25°C inkubiert, damit sie sich weiterentwickeln konnten (siehe Tabelle 3.10), und zwar so lange, bis sie das gewünschte Entwicklungsstadium erreicht hatten. Nach diesem Zeitraum wurden die Scheiben präpariert und, je nachdem für welchen Versuch sie verwendet werden sollten (Antikörperfärbungen oder Cobaltsulfidfärbungen), fixiert. Die in der folgenden Tabelle angegebenen Werte für die Synchronisierung der pupalen Imaginalscheiben wurden aus der Arbeit von Reiter et al., (1996) abgeleitet und sowohl für 20°C als auch für 25°C berechnet.

	21% Zellsortierung abgeschlossen	23 % Zelltod-Phase	28 % Zelltod abgeschlossen	35 % Zelltod abgeschlossen	44-56 % Ausdehnung der primären Pigmentzellen, sek. und tertiäre Pigmentzellen werden zurückgedrängt
20°C (100% = 160h)	33,6 h	36,8 h	44,8 h	56 h	70,4 - 89,6 h
25°C (100 % = 103h)	21,63 h	23,69 h	28,84 h	36,05 h	45,32 – 57,68 h

Tab. 3.10: Entwicklungsstadien pupaler Augenimaginalscheiben

21% Pupalentwicklung: Erste Sortierung der Zellen ist abgeschlossen, spätere Pigmentzellen lagern sich um die primären Pigmentzellen und Linsen-sezernierenden Zellen.

23% Pupalentwicklung: Zelltodphase setzt ein und eliminiert überschüssige Pigmentzellen.

28% - 35% Pupalentwicklung: Zelltod ist weitgehend abgeschlossen.

44-46% Pupalentwicklung: sekundäre und tertiäre Pigmentzellen flachen ab und werden von sich ausdehnenden primären Pigmentzellen zurückgedrängt.

Im Anschluss an diese Phasen wird von den Linsen-sezernierenden Zellen die Linse gebildet

3.4.7.2 Cobaltsulfid-Färbungen pupaler Augenimaginalscheiben

Die Cobalt-Sulfid-Färbung ist eine Methode, mit deren Hilfe Umrisse und Oberflächenstrukturen der Zellen pupaler Imaginalscheiben sichtbar gemacht werden können (Wolff und Ready, 1991a/b, modifiziert nach Melamed und Trujillo-Cenoz, 1975).

Generell lässt sich die Färbung zu jedem Zeitpunkt der Pupalentwicklung anwenden. Allerdings bietet sie sich vorzugsweise für einen Zeitraum nach dem Abschluss der zweiten Zellstadiumphase und vor Sezernierung der Linse an. Nach 28-35% der Entwicklung ist die zweite Zellstadiumphase abgeschlossen. (vergl. Tab. 3.10). Zu diesem Zeitpunkt sind pupale Augenimaginalscheiben ein einschichtiges Gewebe, in dem alle Zellen nebeneinander angeordnet sind, und man kann die verschiedenen Arten von Zellen, Linsen-sezernierende Zellen, Pigmentzellen und Borsten, einwandfrei aufgrund ihrer Morphologie und Position identifizieren. Wenig später dehnen sich die primären Pigmentzellen aus und drängen hierbei sekundäre und tertiäre Pigmentzellen zurück, die dadurch in Cobaltsulfid-Färbungen weniger gut zu erkennen sind als direkt nach Abschluss des Zellstadiums. In einem dritten Zellstadiumschritt werden dann die Randschichten („Perimeter Cluster“) eliminiert. Ist dies erfolgt, bilden die Linsen-sezernierenden Zellen zusammen mit den interommatidialen Pigmentzellen die Linse aus (Wolff und Ready, 1991a). Hierdurch werden die Zellen der pupalen Imaginalscheibe für Färbung der Oberflächenstrukturen durch Cobaltsulfid unzugänglich.

Für die Cobaltsulfid-Färbungen wurden daher die Scheiben zeitlich so synchronisiert, dass die Präparation nach dem Abschluss des Zellstadiums, aber vor der Sezernierung der Linse stattfand.

- Zeitliche Synchronisation der Puppen auf 28-35% Pupalentwicklung
- Präparation der pupalen Imaginalscheiben in 1xPBS oder Ringer-Lösung
- Fixierung in 2.5% Glutaraldehyd in 1xPBS oder Ringer-Lösung für 10min
- Waschen der Scheiben in dH₂O (einige Sekunden)
- Inkubation der Scheiben in 2% Co(NO₃)₂-Lösung für 10-15min
- Gegenfärben mit 4% (NH₄)₂S für 10 Sekunden
=> Cobaltsulfid fällt in Form einer feinen schwarz-grauen Partikelschicht aus, die sich auf die Oberfläche der Scheiben legt und sowohl die apikale als auch die basale Oberfläche der Scheiben sichtbar macht
- Färbelösung abziehen und Scheiben mehrfach in dH₂O waschen
- Entfernen der Basallamina und Präparat in 100% Glycerin einbetten, gegebenenfalls mit Nagellack versiegeln

3.4.7.3 Antikörperfärbungen an pupalen Augenimaginalscheiben

Die Färbung der pupalen Augenimaginalscheiben verläuft bis auf das vorherige zeitliche Synchronisieren der Scheiben identisch mit der in 3.4.3 beschriebenen Färbung larvaler Imaginalscheiben.

3.4.8 Osmium-Fixierung adulter Augen und anschließende Herstellung von Semi-Dünnschnitten

- Fliegen mit einer Rasierklinge dekapitieren und Köpfe vorsichtig halbieren
- Köpfe in einer Fixierlösung für 20min in einem Eppendorf-Gefäß vorfixieren
- Köpfe 2 x 20min in Phosphatpuffer waschen
- Simultanfixierung in einem Osmium/Glutaraldehyd-Mix für 30min im Dunkeln auf Eis
- Fixierung in 2% Osmium für 1h im Dunkeln auf Eis
- Köpfe kurz mit dH₂O waschen
- Entwässern der Köpfe in einer alkoholischen Reihe (Ethanol: 50, 70, 90, 96% je 5min auf Eis, 2 x 100% je 10min bei RT) in einem Eppendorf-Gefäß
- Köpfe in Aceton überführen, 30min waschen
- Köpfe in ein Gemisch aus 50% Aceton und 50% Araldit überführen und darin mindestens 4h inkubieren (das Aceton verdampft dabei langsam)
- Köpfe in reines Araldit in Einbettungsformen überführen. Köpfe entsprechend der späteren Schneiderichtung ausrichten
- Eingebettete Augen für mindestens 48h bei 65°C härten lassen

Die gehärteten Aralditblöckchen werden mit einer Rasierklinge getrimmt, um möglichst viel Araldit um die Augen zu entfernen.

Die Semi-Dünnschnitte (zwischen 1 und 5µm) werden mit einem Glasmesser an einem Mikrotom (*Reichert Om U2*, Wien) hergestellt. Die einzelnen Schnitte werden in Wassertropfen auf gelatinisierte Objektträger überführt und durch Backen bei 80°C auf einem Heizblock gestreckt.

Bei Bedarf können die Schnitte mit Toluidinblau gefärbt werden.

Lösungen:

Fixierlösung:	50% Glutaraldehyd, 0.1M Phosphatpuffer, pH7.2 Heptan Komponenten im Verhältnis 1:1:8 mischen
Phosphatpuffer:	0.1M, pH7.2
Osmiumfixativ:	1% Osmium 2% Glutaraldehyd

3.4.9 Analyse adulter Augen mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops (REM)

- Fliegen mit einer Rasierklinge dekapitieren und Köpfe vorsichtig halbieren
- Entwässern der Köpfe in einer alkoholischen Reihe (Ethanol: 30, 50, 70, 90, 96 und 100%) in einem Eppendorf-Gefäß
- Köpfe 2 x 10min in 100% Aceton waschen (anschließend ist es möglich, die Köpfe über einen längeren Zeitraum in Aceton zu lagern)
- Trocknung der Köpfe: Inkubation für 10min in 1:1 Aceton:TMS (Tetramethylsilane, *Sigma*, Deishofen)
- 1:1 Aceton:TMS abziehen und durch 1:2 Aceton:TMS ersetzen
- 1:2 Aceton:TMS abziehen und durch reines TMS ersetzen
- nach einmaligem Waschen (15-30min) in TMS neues TMS hinzufügen und das Eppendorf-Gefäß offen unter dem Abzug ü.N. stehen lassen. TMS hat einen Siedepunkt von 27°C, so dass die Flüssigkeit ü.N. bei RT verdampft.
- getrocknete Köpfe werden auf kleine Präparateteller montiert und mit einer dünnen Goldschicht überzogen (,sputtern', Balzers Union, *Balzers*, Fürstentum Liechtenstein)
- Die Analyse der Augen erfolgt mit einem Rasterelektronenmikroskop (AMR1000, *Leitz*, Wetzlar)

3.4.10 Nachweis von Zelltod an Imaginalscheiben bestrahlter und unbestrahlter L3-Larven

Im Rahmen der Arbeit wurde sowohl der natürlich auftretende programmierte Zelltod in larvalen (L3)-Imaginalscheiben untersucht, als auch durch Röntgenbestrahlung erzeugter ektopischer Zelltod. Dieser Zelltodnachweis erfolgt mit Hilfe einer Färbung mit Acridin-Orange.

3.4.10.1 Acridin-Orange-Färbungen an unbestrahlten Imaginalscheiben

- Imaginalscheiben schnell in 1xPBS präparieren und auf Eis sammeln
- 15min in Acridin-Orange (0.5µg/ml in 1xPBS) bei RT inkubieren
- Acridin-Orange-Lösung abziehen, Scheiben 2 mal kurz in 1x PBS waschen
- gegebenenfalls überschüssiges Gewebe mit einer Pinzette entfernen und Scheiben in PBS eindecken
- Analyse der Scheiben bzw. des beobachteten Zelltods erfolgt direkt nach der Färbung im Fluoreszenzmikroskop (Grünfilter)

3.4.10.2 Acridin-Orange-Färbungen an bestrahlte Imaginalscheiben

Die Bestrahlung der Larven erfolgte in einem Gerät der Firma Philips. Die Larven wurden entsprechend dem von B. Hay (Hay et al., 1994) vorgegebenen Protokoll mit einer Dosis von 4000 R bestrahlt.

Zelltod ist in Imaginalscheiben nicht sofort nach der Bestrahlung zu beobachten. Er setzt erst nach einigen Stunden für eine gewisse Zeitspanne ein und nimmt wieder ab, wenn die durch die Bestrahlung geschädigten Zellen eliminiert worden sind. Verschiedene Versuchsprotokolle (Wolff und Ready, 1991a; Hay et al., 1994) geben einen Zeitraum von 4-6 Stunden vor, nach denen Zelltodbeobachtungen durchgeführt werden können.

In einem Testversuch an Wildtyp-Larven wurden die Tiere nach der Bestrahlung für weitere 3-6 Stunden bei 25°C inkubiert, bevor die Imaginalscheiben präpariert wurden. Nach Färbung mit Acridin-Orange konnte zwischen den unterschiedlich lange bestrahlten Scheiben kein Unterschied festgestellt werden. Daher wurden in nachfolgenden Versuchen die Larven für 4 Stunden bei 25°C inkubiert und danach auf Zelltod hin untersucht. Die Acridin-Orange-Färbungen zur Beobachtung des ektopischen Zelltods in den bestrahlten Imaginalscheiben wurde wie bei den unbestrahlten (3.4.10.1) durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung des *crumbs*-induzierten „rauh“ Augenphänotyps

Überexpression verschiedener transgener UAS-*crumbs*-Konstrukte (siehe Tabelle 4.2 und Methoden 3.2.3.7) im Auge von *Drosophila* mit Hilfe des UAS-Gal4-Systems resultiert in rauhen Augenphänotypen (Pellikka et al., 2002; Izaddoost et al., 2002; Johnson et al., 2002; diese Arbeit) von unterschiedlicher Qualität (Art der Phänotypen) und Quantität (Stärke), die im ersten Teil der Arbeit näher analysiert und charakterisiert werden sollten.

Zur Analyse dieser Phänotypen wurden folgende Ansätze gewählt:

1. Vorversuch: Untersuchung der Temperaturabhängigkeit des Augenphänotyps der verwendeten Treiber- und Effektorstämme, um auszuschließen, dass die beobachteten Phänotypen bei transgenen Tieren durch andere Faktoren als die Überexpression von *crumbs* hervorgerufen werden. Diese Analyse der Phänotypen erfolgte mit Hilfe des Stereomikroskops.
2. Analyse der äußeren Struktur von adulten rauhen Augen mit dem Stereomikroskop und dem Rasterelektronenmikroskop
3. Untersuchung der inneren Augenstruktur bei Tieren aus ausgewählten Kreuzungen an Semi-Dünnschnitten adulter Augen
4. Untersuchung der Form, Anzahl und Anordnung der Zellen in der sich entwickelnden Augenimaginalscheibe von Tieren aus ausgewählten Kreuzungen nach Cobaltsulfid-Färbung
5. Analyse des larvalen (L3) und pupalen Zelltods in Augenimaginalscheiben mit Hilfe von Acridin Orange-Färbungen, um den Einfluss von ektopisch exprimiertem *Crumbs* auf den natürlichen, während der Augenentwicklung stattfindenden Zelltod zu beobachten

4.1.1 Voruntersuchung der Gal4-Treiberlinien: Temperaturabhängigkeit der verwendeten Stämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Treiberlinien verwendet, um *crumbs* im Auge von *Drosophila* mit Hilfe des UAS-Gal4-Systems ektopisch zu exprimieren. Bei den drei Linien handelt es sich um *elav*-Gal4, Gal4-*sev* und GMR-Gal4 (vgl. Methoden 3.2.3.5).

Als Vorversuch zur Analyse des dominanten rauhen Augenphänotyps und zum Modifier-Screen (Kapitel 4.2) wurde getestet, ob die verwendeten Gal4-Treiberlinien selbst einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp erkennen lassen, der die späteren Ergebnisse beeinflussen könnte.

Hierbei war vor allem die Temperaturabhängigkeit der Treiberstämme von Interesse, da das UAS-Gal4-System dafür bekannt ist, dass Gal4-Stämme auch ohne Kreuzung mit einem Effektorstamm temperaturabhängige mutante Phänotypen aufweisen können.

Weiterhin wurden mehrere transgene bzw. rekombinante Gal4-UAS-*crb*-Linien, die später für den Modifier-Screen verwendet wurden, auf die Temperaturabhängigkeit des Augenphänotyps hin getestet.

Die getesteten Stämme wurden für zwei Generationen bei verschiedenen Temperaturen gehalten und ihre Augen danach auf Veränderungen hin untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.1 zusammengestellt.

	Augenphänotyp bei 18°C	Augenphänotyp bei RT	Augenphänotyp bei 25°C	Augenphänotyp bei 29°C
<i>elav</i> -Gal4 homo- und heterozygot	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp
Gal4 ^{sev} homo- und heterozygot	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp, selten schwach rauh
GMR-Gal4 homozygot	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp, selten schwach rauh	stark rauh
GMR-Gal4 heterozygot	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	mittelstark rauh
Gal4 ^{sev} - <i>crb</i> ^{intra} 38.1.2b („142“) homozygot	rauh	rauh	rauh	rauh
GMR-Gal4- <i>crb</i> ^{intra} 38.1.2b heterozygot	rauh	rauh	rauh	stärker rauh
GMR- <i>crb</i> ^{intra} 38.1 heterozygot	rauh	rauh	rauh	nicht getestet

Tab. 4.1: Beobachteter Augenphänotyp der Gal4-Treiberstämme sowie der für den Modifier-Screen verwendeten Linien Gal4^{sev}-*crb*^{intra}38.1.2b und GMR-Gal4-*crb*^{intra}38.1.2b bei verschiedenen Test-Temperaturen

Im Vergleich zum Wildtyp zeigen *elav*-Gal4 und Gal4^{sev} bei einer Betrachtung durch das Stereomikroskop fast keine temperaturbedingten Veränderungen des Phänotyps. Nur in der Linie Gal4^{sev}, gehalten bei 29°C, treten vereinzelt Tiere mit sehr schwach rauhem Augenphänotyp auf.

Das Gleiche gilt für den im ersten Modifier-Screen (vgl. Kapitel 4.2) verwendeten rekombinanten Stamm Gal4^{sev}-UAS-crb^{intra}38.1.2b („142“), in dem *crumbs*^{intra} unter der Kontrolle von Gal4^{sev} im Auge überexprimiert wird. Durch das Kreuzen von Treiber und Effektor wird zwar ein rauher Augenphänotyp erzeugt, jedoch ist dieser nicht sehr stark und weist bei den unterschiedlichen Testtemperaturen keine Veränderungen auf.

GMR-Gal4 jedoch reagiert auf erhöhte Temperatur mit einer Veränderung des Phänotyps. Der homozygote Stamm weist bei 18°C und bei Raumtemperatur (RT) noch wildtypische Augen auf. Bei 25°C treten bereits vereinzelt Tiere mit schwach rauhen Augen auf, und bei 29°C findet man einen sehr stark rauhen Augenphänotyp. Die Linsen der Augen dieser Tiere sind aufgequollen und stark miteinander verschmolzen (ohne Abbildung). GMR-Gal4 heterozygote Tiere hingegen zeigen auch bei 25°C noch einen wildtypischen Augenphänotyp. Erst bei 29°C tritt auch hier ein rauher Augenphänotyp auf, der allerdings schwächer als der homozygoter Tiere ist.

Entsprechend verhält sich der im Modifier-Screen verwendete rekombinante Stamm GMR-Gal4-crb^{intra}38.1.2b. Der nur heterozygot lebensfähige Stamm weist durch die Überexpression von *crumbs* einen mittelstark rauhen Augenphänotyp auf, der jedoch bei 18°C, RT und 25°C keine Unterschiede aufweist. Erst bei 29°C verstärkt sich der rauhe Augenphänotyp, vermutlich durch das in der Rekombinante vorhandene GMR-Gal4. Der transgene Stamm GMR-crb^{intra}38.1 zeigt hingegen keine temperaturbedingten Unterschiede bei 18°C, RT und 25°C. Bei 29°C wurde er nicht getestet.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden in den folgenden Versuchen die Stämme bzw. Kreuzungen bei 25°C gehalten. Bei dieser Temperatur weisen nur homozygote GMR-Gal4-Fliegen leichte Veränderungen gegenüber dem Wildtyp auf. Die aus den Kreuzungen hervorgehenden Tiere, die nur heterozygot GMR-Gal tragen sowie Tiere der nur heterozygot lebensfähigen Linie GMR-Gal4-crb^{intra}38.1.2b sollten somit bei 25°C nicht durch die Temperaturabhängigkeit des UAS-Gal4-Systems beeinflusst werden

Auch der spätere Modifier-Screen (Ergebnisse 4.2), in dem die Linie GMR-Gal4-crb^{intra}38.1.2b verwendet wurde, wurde bei dieser Temperatur durchgeführt.

4.1.2 Phänotypische Analyse nach Überexpression verschiedener UAS-*crumbs*-Transgene unter der Kontrolle von *elav*-Gal4, Gal4^{sev} und GMR-Gal4 im Auge von *Drosophila*

Zur Untersuchung des *crumbs*-induzierten rauhen Augenphänotyps wurden verschiedene UAS-*crumbs*-Effektorstämme unter der Kontrolle der drei oben aufgeführten Treiberstämme im Auge von *Drosophila* überexprimiert.

Die Augen von Tieren aus der F1-Generation wurden in einem ersten Auswertungsschritt unter dem Stereomikroskop betrachtet. Wiesen sie hierbei einen rauhen Augenphänotyp auf, dann wurden sie anschließend mit Hilfe rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen genauer betrachtet.

Beobachtete Phänotypen:

Genotyp	Augenphänotyp
Gal4 ^{sev} (auf Chrom. II)	wildtypisch
GMR-Gal4 (auf Chrom.II)	homozygot selten schwach rauh, heterozygot wildtypisch
<i>elav</i> -Gal4	wildtypisch
UAS-crb ^{intra} 38.1.2b	wildtypisch
UAS-crb ^{intra} 38.1.4a	wildtypisch
UAS-crb ^{MINI} 30.1.2e (minigen)	wildtypisch
UAS-crb ^{MINI} 30.1.4b (minigen)	wildtypisch
UAS-crb ^{intra} ΔERLI	wildtypisch
UAS-crb ^{intra} Y ₁₀ E ₁₆	wildtypisch
UAS-crb ^{intra} Y ₁₀ E ₁₆ , ΔERLI	wildtypisch
pBD466-crb ^{intra} 38.1	wildtypisch
<hr/>	
Gal4 ^{sev} x UAS-crb ^{intra} 38.1.2b	rauh ++
Gal4 ^{sev} -UAS-crb ^{intra} 38.1.2b („142“) homozygot	rauh ++ Schwarzfärbung vereinzelter Ommatidien
Gal4 ^{sev} x UAS-crb ^{intra} 38.1.4a	rauh + + + +
Gal4 ^{sev} x UAS-crb ^{intra} ΔERLI	rauh +
Gal4 ^{sev} x UAS-crb ^{intra} Y ₁₀ E ₁₆	rauh ++ Schwarzfärbung einiger Ommatidien
Gal4 ^{sev} x UAS-crb ^{intra} Y ₁₀ E ₁₆ , ΔERLI	wildtypisch
Gal4 ^{sev} x UAS-crb ^{MINI} 30.1.2e	100% pupal letal, Augen schwarz und verkümmert
Gal4 ^{sev} x UAS-crb ^{MINI} 30.1.4b	rauh + + + Schwarzfärbung vereinzelter Ommatidien
GMR-Gal4 x UAS-crb ^{intra} 38.1.2b	rauh ++
GMR-Gal4x UAS-crb ^{intra} 38.1.4a	rauh + + + + +
GMR-Gal4x UAS-crb ^{intra} ΔERLI	rauh +
GMR-Gal4 x UAS-crb ^{intra} Y ₁₀ E ₁₆	rauh ++ Schwarzfärbung vereinzelter Ommatidien
GMR-Gal4 x UAS-crb ^{intra} Y ₁₀ E ₁₆ , ΔERLI	wildtypisch
GMR-Gal4 x UAS-crb ^{MINI} 30.1.2e	100 % pupal letal, Augen schwarz und verkümmert
GMR-Gal4 x UAS-crb ^{MINI} 30.1.4b	rauh + + + + Nekrose vereinzelter Ommatidien
<hr/>	
<i>elav</i> -Gal4 x UAS-crb ^{intra} 38.1.2b	wildtypisch
<i>elav</i> -Gal4x UAS-crb ^{intra} 38.1.4a	wildtypisch
<i>elav</i> -Gal4x UAS-crb ^{intra} ΔERLI	wildtypisch
<i>elav</i> -Gal4 x UAS-crb ^{intra} Y ₁₀ E ₁₆	wildtypisch
<i>elav</i> -Gal4 x UAS-crb ^{MINI} 30.1.2e	wildtypisch
<i>elav</i> -Gal4 x UAS-crb ^{MINI} 30.1.4b	wildtypisch

Tab. 4.2: Beobachtete Augenphänotypen, basierend auf stereomikroskopischen Beobachtungen

Die verwendeten Treiber- und Effektorlinien allein weisen keinen rauhen Augenphänotyp auf. Kreuzungen von Gal4^{sev} oder GMR-Gal4 mit UAS-*crb*-Effektorlinien lassen rauhe Augenphänotypen unterschiedlicher Stärke erkennen (gekennzeichnet mit + bis +++++). Kreuzungen der UAS-*crb*-Effektorlinien mit *elav*-Gal4 zeigen keine rauhen Augenphänotypen. Für einige der Kreuzungen wird „Schwarzfärbung von Ommatidien“ angegeben. Hierbei könnte es sich möglicherweise um Nekrose handeln. Für Details der Phänotypen siehe Kapitel 4.1.3 (Rasteraufnahmen).

Die verwendeten Treiber- und Effektorlinien alleine lassen bei 25°C alle keinen rauhen Augenphänotyp erkennen. Das Gleiche gilt für Kreuzungen der UAS-*crumbs*-Effektorlinien mit *elav*-Gal4, was darauf schließen läßt, dass die Überexpression der UAS-*crumbs*-Konstrukte in den Photorezeptorzellen allein nicht zu einem rauhen Augenphänotyp führt. Dies deckt sich mit dem Befund, dass die transgene Linie pBD466-*crb*^{intra}38.1, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurde (vgl. Methoden 3.2.7) und in deren Augen *crb*^{intra}38.1 unter der Kontrolle eines R7-spezifischen Promotors exprimiert wird, keinen rauhen Augenphänotyp zeigt.

Kreuzungen von entweder Gal4^{sev} oder GMR-Gal4 mit UAS-*crb*-Effektorlinien weisen hingegen in den meisten Fällen rauhe Augenphänotypen unterschiedlicher Stärke auf. Mit Hilfe der Kennzeichnung „+“ bis „+++++“ wurde versucht die Stärke der Phänotypen genauer zu beschreiben. „+“ steht für einen sehr schwachen, fast wildtypischen Augenphänotyp, der bei Betrachtung durch das Stereomikroskop nur schwache Veränderungen der Anordnung oder Anzahl der Borsten aufweist. „++“ und „+++“ stehen für mittelstarke Phänotypen, die stärkere Veränderungen der Borsten, eine fehlerhafte Anordnung der Linsen sowie eine Schwarzfärbung vereinzelter Ommatidien zeigen. „++++“ und „+++++“ bezeichnen die stärksten gefundenen Phänotypen, in denen Veränderungen der Borsten, Defekte der Linsen sowie eine fehlerhafte Organisation von Linsen und Ommatidien zu beobachten sind. Ebenso können (defekte) Linsen in erhöhtem Maße miteinander verschmelzen. Details der Phänotypen lassen sich Kapitel 4.1.3 (rasterelektronenmikroskopische Analyse) entnehmen.

4.1.3 Rasterelektronenmikroskopische Analyse verschiedener UAS-*crb*-induzierter Augenphänotypen

Um genauere Aussagen über die gefundenen adulten rauhen Augenphänotypen machen zu können, wurden mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskopes Aufnahmen von Augen von Tieren aus verschiedenen Kreuzungen gemacht, die rauhe Augenphänotypen aufwiesen.

Alle Treiber- und Effektorstämme alleine sowie die Kreuzungen der Effektorstämme mit dem Treiber *elav*-Gal4 zeigen einen wildtypischen Phänotyp. Sie wurden daher in der rasterelektronenmikroskopischen Analyse nicht näher untersucht.

Wildtypische Augen weisen ein sehr regelmäßiges hexagonales Muster aus Linsen und Borsten auf, wobei die Borsten so angeordnet sind, dass an jede Linse eines Ommatidiums drei Borsten angrenzen und die einzelnen Borsten um je eine halbe Linse versetzt zueinander stehen (siehe Abbildung 4.1).

Die Borsten selbst sind in regelmäßigen Reihen angeordnet und in der Regel von gleicher Länge und Ausrichtung. Selten kommt es zu Defekten, wie beispielsweise zu einer fehllokalisierten Borste in Abbildung 4.1 B (markiert durch *).

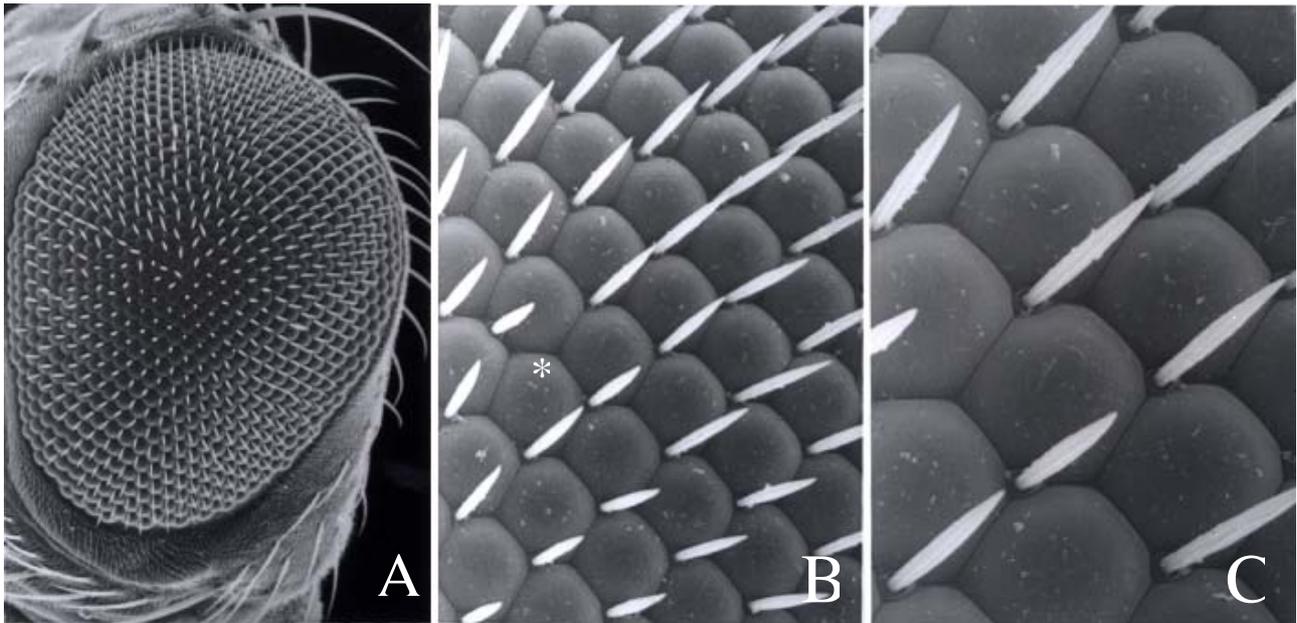


Abb. 4.1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines wildtypischen Auges (Vergrößerung 190x, 950x und 1900x).

Bild A zeigt eine Übersicht des gesamten Auges, die posteriore Seite weist nach rechts, die den Antennen zugewandte, anteriore Seite nach links. B und C sind jeweils Vergrößerungen eines Ausschnitts des Wildtyp-Auges. Im Regelfall zeichnet sich das Auge durch eine sehr regelmäßige Organisation von Linsen und Borstenreihen aus. Leichte Unregelmäßigkeiten, wie eine verschobene Borste (gekennzeichnet mit *), sind jedoch nicht völlig ausgeschlossen.

Die durch ektopische Expression von *crumbs* induzierten rauhen Augenphänotypen lassen gegenüber dem Wildtyp eine Reihe von Veränderungen erkennen.

1.) Veränderungen oder Defekte, die die Linsen betreffen:

In Augen mit schwächer rauhem Augenphänotyp treten oft nur leichte Veränderungen der Linsen auf, wie z.B. eine veränderte, häufig quadratische Form (Abb. 4.4 D, Umrisse der Ommatidien gestrichelt markiert) oder unterschiedliche Größe der Linsen (Abb. 4.4 F, jeweils markiert mit *). In Auge mit stärkerem Phänotyp können zwei oder mehr Linsen miteinander verschmelzen (Abb. 4.6 F, markiert durch *) oder „kollabieren“. Durch das entstehende Loch in den Linsen treten bislang nicht näher analysierte Zellen (möglicherweise Photorezeptorzellen) aus (Abb. 4.3 D-E, markiert durch Pfeilköpfe).

In den meisten Kreuzungen verfärben sich die auf diese Weise geschädigten Ommatidien schwarz und werden möglicherweise nekrotisch. In Augen mit sehr starken Phänotypen können die Linsen der geschädigten Ommatidien großräumig fusionieren (Abb. 4.3 F-G).

2.) Veränderungen oder Defekte, die die Borsten betreffen:

Zu dieser Gruppe von Phänotypen zählen schwache Defekte wie eine abnorme Lokalisation von Borsten. Stärkere Defekte gehen mit einer erhöhten Anzahl von Borsten einher. Hierbei lassen sich ektopische Borsten im gesamten Auge von einer Verdopplung einzelner Borsten an bestimmten Stellen des Auges unterscheiden (Abb. 4.4 D, markiert durch Pfeilköpfe). Weitere Veränderungen betreffen die Länge und Ausrichtung der Borsten, die vor allem bei verdoppelten/verdreifachten Borsten zu beobachten ist, die in nahe zusammen stehenden Gruppen angeordnet sind.

3.) Veränderungen der Morphologie des gesamten Auges:

In stark rauhen Augen sind häufig Defekte zu beobachten, die die Morphologie der Retina des gesamten Auges verändern. Es kann dazu kommen, dass Ommatidien in die Retina „sinken“. In stärkeren Phänotypen kann man Erhebungen oder Mulden erkennen oder sogar eine Faltung der Retina (Abb. 4.2 D gesamtes Auge; 4.3 D-G). Augen mit solchen Veränderungen wirken „mehrschichtig“. In Abhängigkeit von Defekten der Linse und einer Faltung der Retina kann die Größe des Auges abnehmen. (Abb. 4.3 F, vgl. mit 4.1). Außerdem wurden in einigen Kreuzungen Unterschiede in den von Veränderungen betroffenen Regionen gefunden. Manche Defekte, wie beispielsweise die Schwarzfärbung vereinzelter Ommatidien oder ein Kollabieren der Linsen, findet man vor allem im anterioren Bereich des Auges (Abb. 4.5 C-E, gekennzeichnet durch Pfeil).

In den folgenden Tabellen werden die Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen Analysen aufgeführt, in denen folgende Kreuzungen bzw. Genotypen untersucht wurden:

- Wildtyp
- Gal4^{sev} x verschiedene UAS-*crb*-Effektorstämme (ohne UAS-*crb*^{MINI}30.1.2e)
- GMR-Gal4 x verschiedene UAS-*crb*-Effektorstämme (ohne *crb*^{MINI}30.1.2e)
- GMR-*crb*^{intra}38.1

Genotyp	Form & Größe der Linse	Veränderungen der Linsen	Borsten	Augenmorphologie
Wildtyp (Abb. 4.1)	hexagonale Form, gleich groß	keine	1 Borste pro Ommatidium	in einer Ebene angeordnet
Gal4 ^{sev} x UAS-crb ^{intra} Y ₁₀ E ₁₆ , ΔERLI (keine Abb.)	hexagonale Form, gleich groß	keine	1 Borste pro Ommatidium	in einer Ebene angeordnet
Gal4 ^{sev} x UAS-crb ^{MINI} 30.1.2e	Das gesamte Auge ist in der Größe stark reduziert, schwarz und vermutlich nekrotisch, so dass keine Aussage über Linsenform und Größe bzw. Borsten getroffen werden kann. Die Tiere dieser Kreuzung sterben spät-pupal. Daher sind von diesen Augen keine Abbildungen vorhanden.			
Gal4 ^{sev} x UAS-crb ^{MINI} 30.1.4b (keine Abbildung vorhanden)	variable Form und Größe	Aufbrechen von Linsen (+++), aber nur selten erfolgt Schwarzfärbung der geschädigten Ommatidien (+)	ektopische und verdoppelte Borsten	Linsendefekte und Faltung der Retina im anterioren Bereich des Auges, lassen Auge mehrschichtig erscheinen
Gal4 ^{sev} x UAS-crb ^{intra} 38.1.2b (Abb. 4.4 C-D)	teilweise hexagonale Form, oft quadratisch, Größe leicht variabel	keine	ektopische und verdoppelte Borsten	in einer Ebene angeordnet
Gal4 ^{sev} x UAS-crb ^{intra} 38.1.4a (Abb. 4.3 C-E)	Form und Größe variabel	Verschmelzen und Aufbrechen von Linsen (+++) sowie Schwarzfärbung geschädigter Ommatidien (+++)	ektopische und verdoppelte Borsten	Linsendefekte und Faltung der Retina im anterioren Bereich des Auges, lassen Auge mehrschichtig erscheinen
Gal4 ^{sev} x UAS-crb ^{intra} Y ₁₀ E ₁₆ (Abb. 4.5 C-D)	teilweise hexagonale Form, oft quadratisch	Aufbrechen von Linsen (+) sowie Schwarzfärbung geschädigter Ommatidien (+)	ektopische und verdoppelte Borsten	Linsendefekte und Faltung der Retina im anterioren Bereich des Auges, lassen Auge mehrschichtig erscheinen
Gal4 ^{sev} x UAS-crb ^{intra} ΔERLI (Abb. 4.6 C-D)	meist hexagonale Form, mit leichten Abweichungen gleich groß	Verschmelzen einzelner Linsen	1 Borste pro Ommatidium, selten ektopisch oder verdoppelt	in einer Ebene angeordnet
GMR-Gal4 x UAS-crb ^{MINI} 30.1.2e	Das gesamte Auge ist in der Größe stark reduziert, schwarz und vermutlich nekrotisch, so dass keine Aussage über Linsenform und Größe bzw. Borsten getroffen werden kann. Die Tiere dieser Kreuzung sterben spät-pupal. Daher sind von dieser Kreuzung keine Bilder vorhanden.			
GMR-Gal4 x UAS-crb ^{intra} Y ₁₀ E ₁₆ , ΔERLI (keine Abb. vorhanden)	hexagonale Form, gleich groß	keine	1 Borste pro Ommatidium	in einer Ebene angeordnet

Genotyp	Form & Größe der Linse	Linsendefekte	Borsten	Augenmorphologie
GMR-Gal4 x UAS-crb ^{MIN1} 30.1.4b (Abb. 4.2 C-D)	Form und Größe variabel	Aufbrechen von Linsen (++++), aber nur selten erfolgt Schwarzfärbung der geschädigten Ommatidien (+)	ektopische und verdoppelte Borsten	Linsendefekte im gesamten Auge, Faltung der Retina läßt das Auge mehrschichtig erscheinen
GMR-Gal4 x UAS-crb ^{intra} 38.1.2b (Abb. 4.4 E-F)	Form und Größe variabel	selten verschmelzen einzelne Linsen	ektopische und verdoppelte Borsten, Borstenverlust posterior	posterior schwach mehrschichtig
GMR-crb ^{intra} 38.1.2b (Abb. 4.2 E-F)	Form variabel, aber etwa gleich groß	selten verschmelzen einzelne Linsen	ektopische, aber selten verdoppelte Borsten	variabel, in homozygoten Tieren selten schwach mehrschichtig
GMR-Gal4 x UAS-crb ^{intra} 38.1.4a (Abb. 4.3 F-G)	Linsen sind vollständig verschmolzen	Linsen verschmelzen vollständig, Teile des verschmolzenen Gewebes verfärben sich schwarz (+++)	Borsten vorhanden, aber kein Muster mehr identifizierbar	keine Struktur mehr vorhanden, Linsen des gesamten Auges sind verschmolzen, die Retina wirkt gefaltet und mehrschichtig
GMR-Gal4 x UAS-crb ^{intra} Y ₁₀ E ₁₆ (Abb. 4.5 E-F)	Form und Größe variabel	Aufbrechen von Linsen (++) sowie Schwarzfärbung geschädigter Ommatidien (++)	ektopische und verdoppelte Borsten, Borstenverlust posterior	Linsendefekte vor allem anterior; das gesamte Auge wirkt leicht mehrschichtig
GMR-Gal4 x UAS-crb ^{intra} ΔERLI (Abb. 4.6 E-F)	Form hexagonal bis variabel, aber etwa gleich groß	selten verschmelzen einzelne Linsen	ektopische und verdoppelte Borsten,	in einer Ebene angeordnet

Tab. 4.3: Zusammenfassung der Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen Analysen der Augen von Tieren aus Gal4^{sev}- und GMR-Gal4- getriebenen Kreuzungen

Die Stärke der Linsendefekte, gefolgt von möglicherweise nekrotischen Defekten, ist von „+“ bis „+++“ gekennzeichnet. „+“ bezeichnet Defekte in vereinzelt Linsen während in „+++“ größere Regionen des Auges betroffen sind.

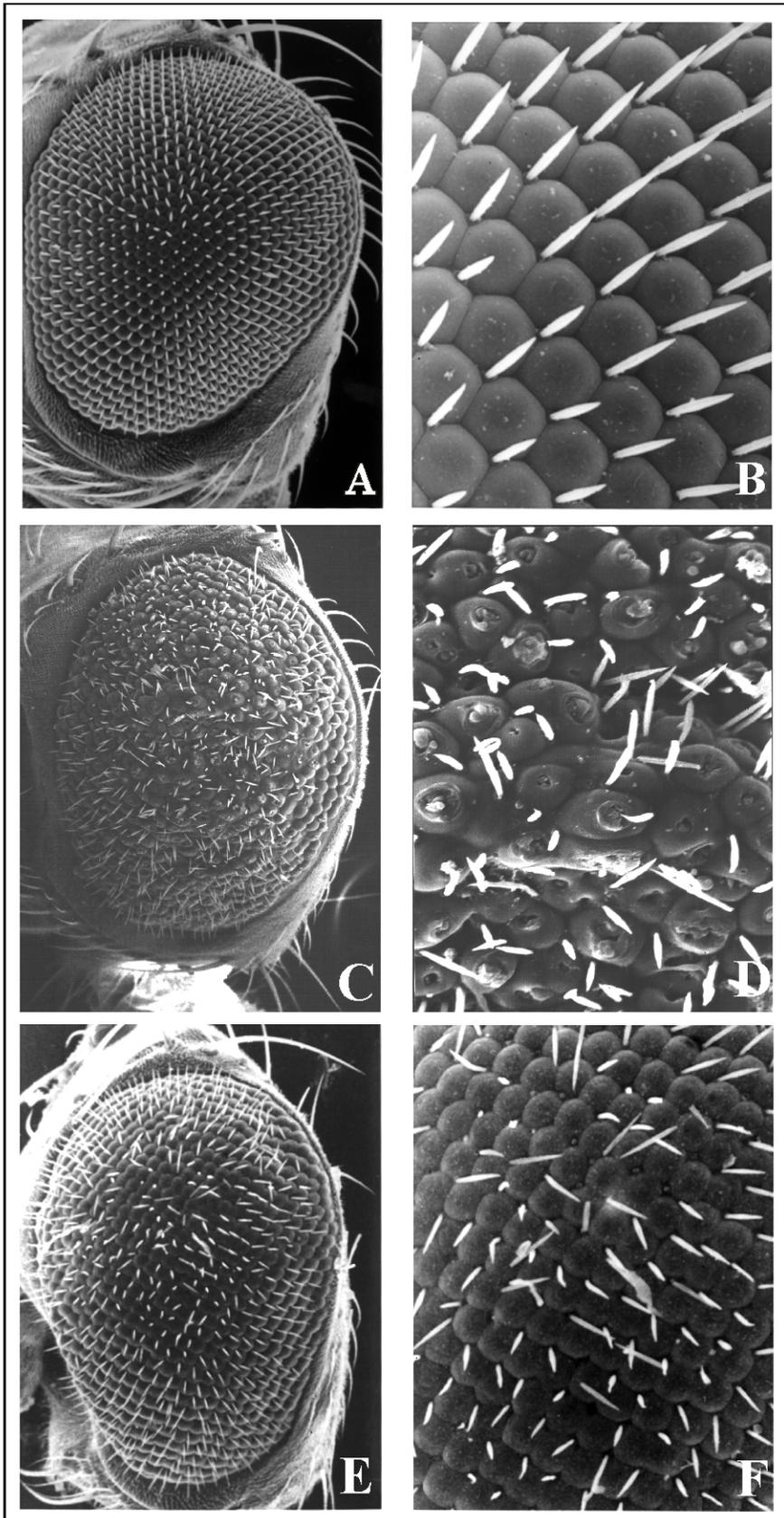


Abb. 4.2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (Vergrößerung ca. 190x und 950x) vom Wildtyp (A und B) und den Kreuzungen GMR-Gal4 x UAS-crb^{MINI}30.1.4b (C-D, Vergrößerung 190x und 950x) und GMR-crb^{intra}38.1 (E und F, Vergrößerung 190x und 490 x). Details siehe Text und Tabelle 4.3.

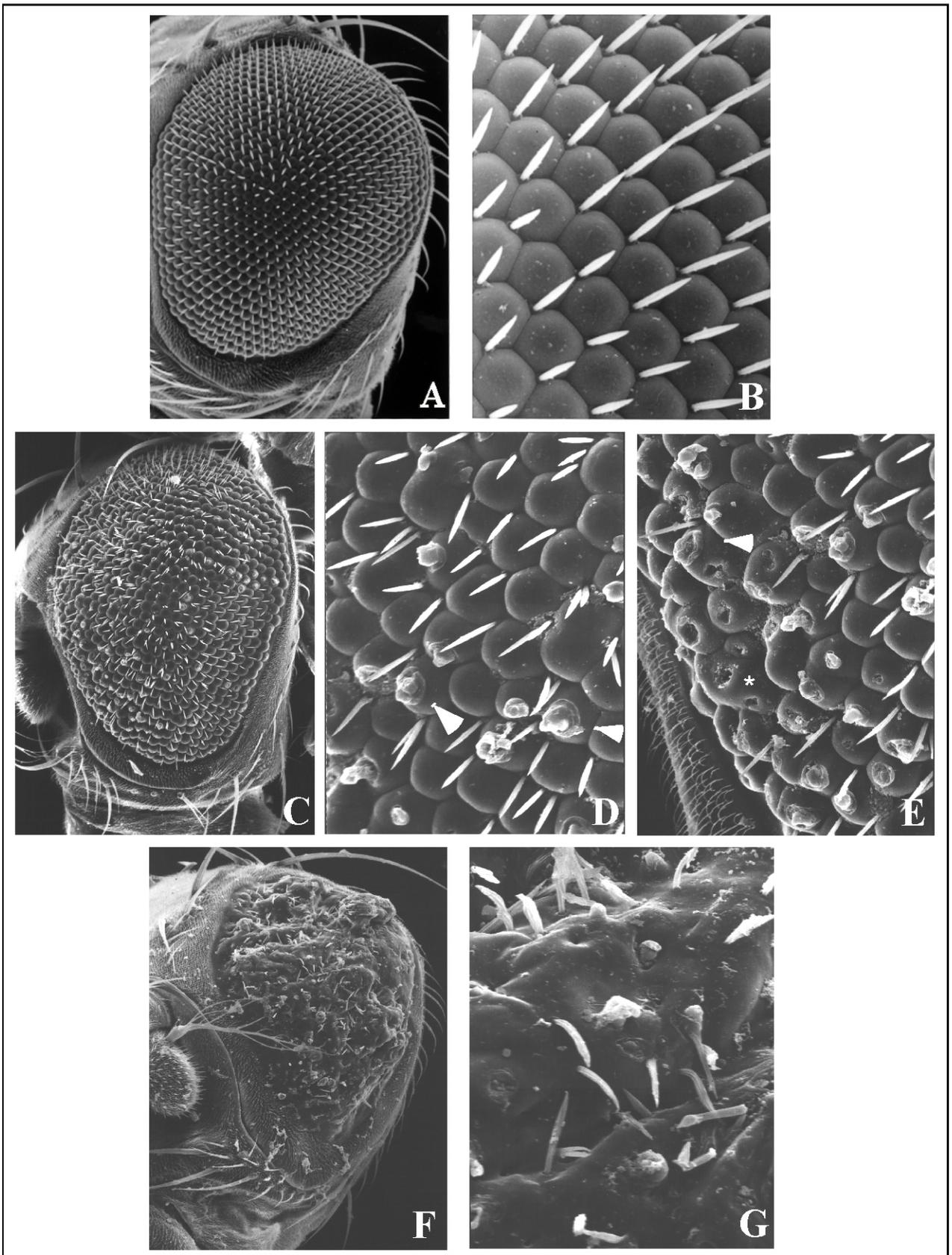


Abb. 4.3: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (Vergrößerung ca. 190x und 950x) vom Wildtyp (A und B) und den Kreuzungen $Gal4^{sev} \times UAS-crb^{intra}Y_{10}E_{16}$ (C - E) und $GMR-Gal4 \times UAS-crb^{intra}Y_{10}E_{16}$ (F und G). Details siehe Text und Tabelle 4.3.

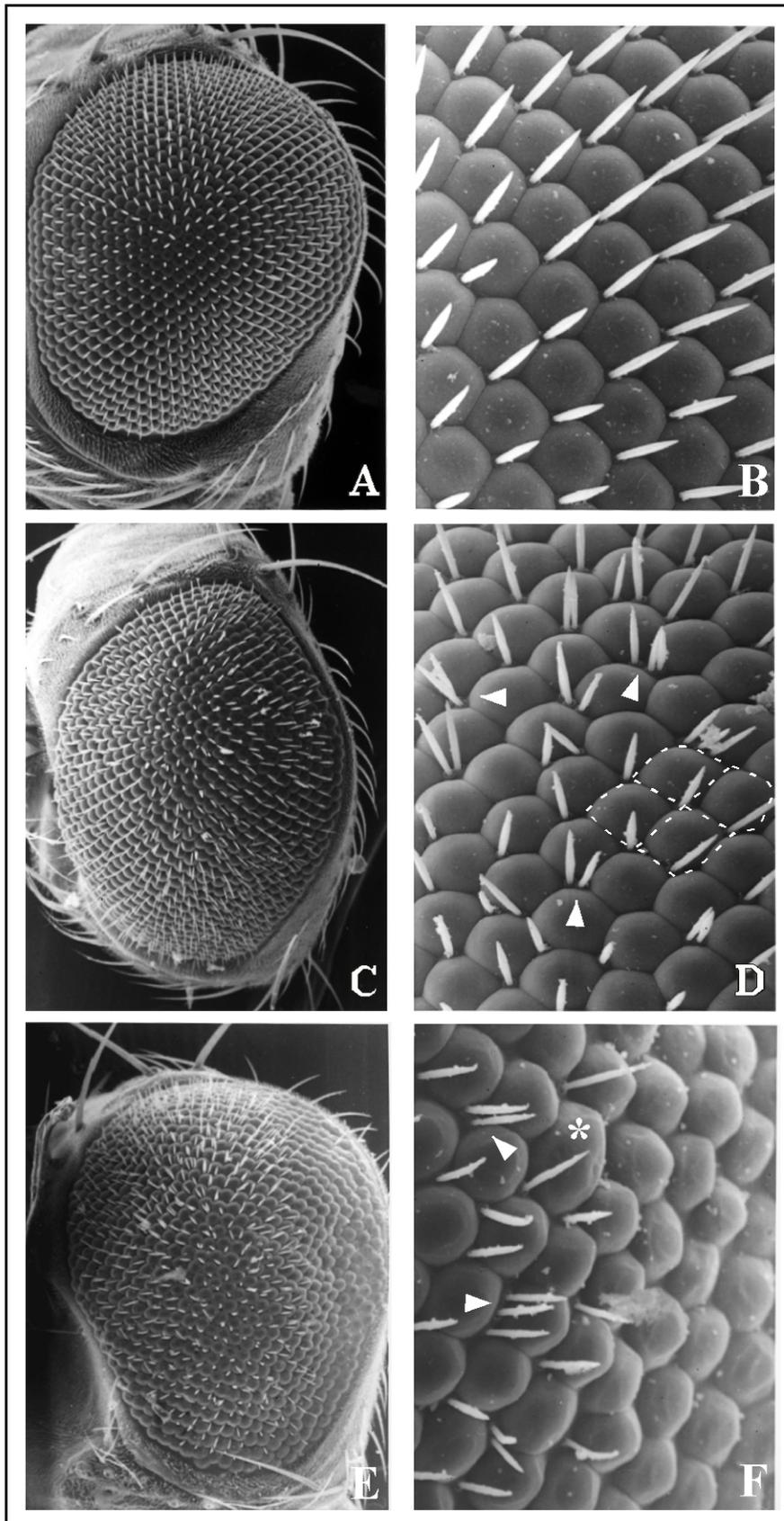


Abb. 4.4: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (Vergrößerung ca. 190x und 950x) vom Wildtyp (A und B) und den Kreuzungen $Gal4^{sev} \times UAS-crb^{intra38.1.2b}$ (C und D) und $GMR-Gal4 \times UAS-crb^{intra38.1.2b}$ (E und F). Details siehe Text und Tabelle 4.3.

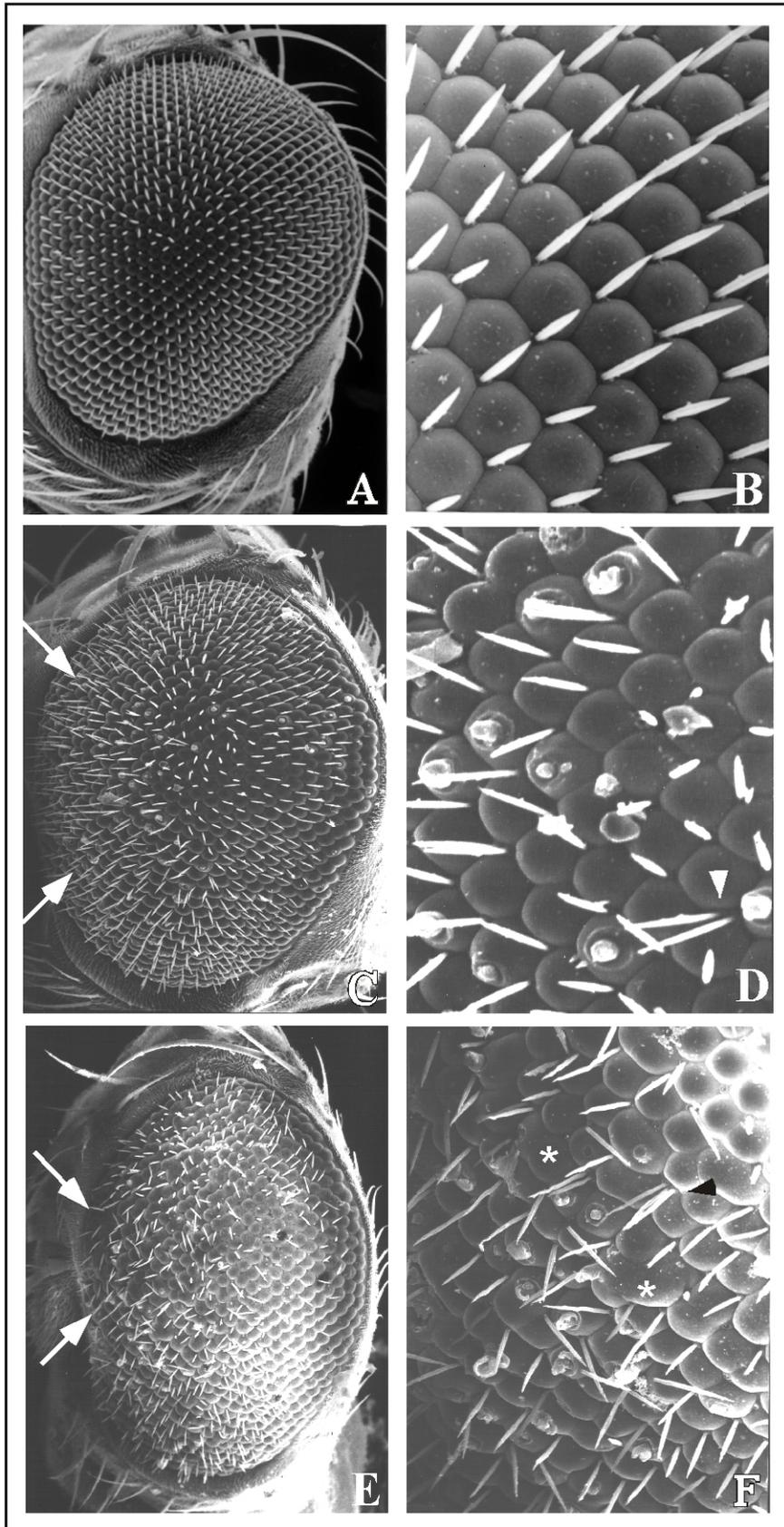


Abb. 4.5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (Vergrößerung ca. 190x und 950x) vom Wildtyp (A und B) und den Kreuzungen $Gal4^{sev} \times UAS-crb^{intra-Y10E16}$ (C und D) und $GMR-Gal4 \times UAS-crb^{intra-Y10E16}$ (E und F). Details siehe Text.

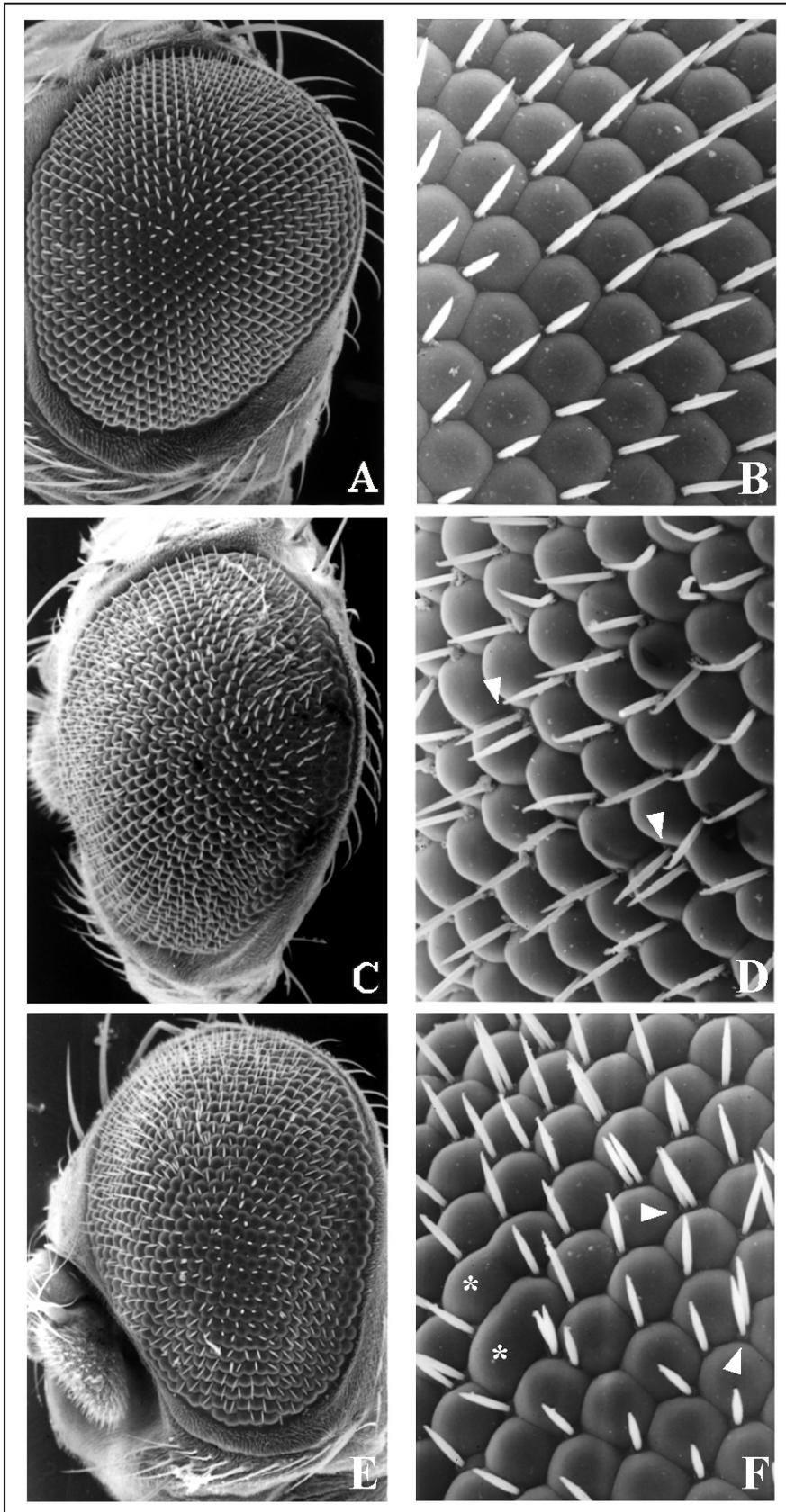


Abb. 4.6: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (Vergrößerung ca. 190x und 950x) vom Wildtyp (A und B) und den Kreuzungen $Gal4^{sev} \times UAS-crb^{intra} \Delta ERLI$ (C und D) und $GMR-Gal4 \times UAS-crb^{intra} \Delta ERLI$ (E und F). Details siehe Text und Tabelle 4.3.

4.1.3.1 Zusammenfassung der rasterelektronenmikroskopischen Analysen

Die ektopische Expression verschiedener UAS-*crb* Konstrukte im Auge von *Drosophila* führt zu rauhen Augenphänotypen unterschiedlicher Stärke, an deren Bildung verschiedene Arten von Veränderungen beteiligt sind. Trotzdem lassen sich in all diesen Kreuzungen mutante Phänotypen erkennen, die für die Überexpression von Crumbs charakteristisch sind.

Überexpression von UAS-*crb*-Konstrukten in Photorezeptorzellen unter der Kontrolle von *elav*-Gal4 zeigt keine Auswirkungen auf den Augenphänotyp

Überexpression der UAS-*crb*-Konstrukte unter der Kontrolle des Treiberstammes *elav*-Gal4, der die transgenen Konstrukte spezifisch in den Photorezeptorzellen exprimiert, zeigt bei einer Betrachtung der äußeren Strukturen durch das Stereomikroskop keine Effekte. In allen Versuchen waren die aus den Kreuzungen resultierenden Augen wildtypisch. Hiermit kompatibel ist der Befund, dass auch die transgene Linie pBD466-*crb*^{intra}38.1, in der *crb*^{intra} allein in der R7-Zelle überexprimiert wird, keinen rauhen Augenphänotyp aufweist. Diese Ergebnisse sind ein Hinweis darauf, dass eine Überexpression von *crumbs* in den Photorezeptorzellen keinen Einfluss auf die Entwicklung und Morphologie des Auges hat. Der rauhe Augenphänotyp hängt also maßgeblich von der Überexpression von UAS-*crb* in Pigment- und/oder Linsen-sezernierenden Zellen ab.

Wie sich allerdings in Semidünnschnitten von Augen mit rauhem Augenphänotyp zeigt (vgl. Kapitel 4.2), gibt die äußere Struktur des Auges nicht immer eindeutig Aufschluss über das Innenleben der Augen, d.h. über Anordnung von Photorezeptorzellen, ihren Rhabdomeren und Pigmentzellen. Daher schließt der für *elav*-Gal4-Kreuzungen getroffene Befund, der nur auf der Betrachtung äußerer Strukturen basiert, mögliche Veränderungen der Photorezeptoren oder Pigmentzellen nicht vollständig aus.

Überexpression von UAS-*crb*-Konstrukten unter der Kontrolle von GMR-Gal4 und Gal4^{sev} führt zu vergleichbaren Phänotypen unterschiedlicher Stärke

Überexpression der UAS-*crb*-Konstrukte unter der Kontrolle von GMR-Gal4 und Gal4^{sev} führt grundsätzlich zu ähnlichen Phänotypen, die sich jedoch aufgrund der unterschiedlichen Stärke der transgenen Konstrukte und eines teilweise unterschiedlichen Expressionsmusters der Treiberstämme unterscheiden. Kreuzungen unter der Kontrolle von GMR-Gal4 resultieren in stärkeren Phänotypen, da GMR-Gal4 selbst in mehr Zellen des sich entwickelnden Auges exprimiert wird. Daher sollten die Phänotypen, die in Kreuzungen unter der Kontrolle dieser beiden Treiberstämme gefunden werden, nur qualitativ, nicht aber quantitativ verglichen werden.

Zusammenfassend kann man folgende Hierarchie für die UAS-Konstrukte und die von ihnen induzierten rauhen Augenphänotypen aufstellen:

Treiber x (UAS-*crb*^{MINIGEN}30.1.2e) > UAS-*crb*^{intra}38.1.4a > UAS-*crb*^{MINIGEN}30.1.4b > UAS-*crb*^{intra}Y₁₀E₁₆ > UAS-*crb*^{intra}38.1.2b > UAS-*crb*^{intra}ΔERLI > UAS-*crb*^{intra}Y₁₀E₁₆, ΔERLI

Überexpression eines transgenen UAS-*crb*-Konstruktes, in dem sowohl Y₁₀E₁₆ als auch das ERLI-Motiv mutiert bzw. deletiert wurde, resultiert in wildtypischen Augen. Die Mutation dieser beiden Domänen genügt also, um die *crumbs*-induzierten Effekte im Auge nicht zum Ausdruck zu bringen.

Überexpression des gesamten *crumbs*-Minigens, führt beim stärkeren der beiden Konstrukte, UAS-*crb*^{MINI}30.1.2e, zu pupaler Letalität. Die Augen sind, wenn man die Tiere aus den Puppenhüllen freipräpariert und betrachtet, schwarz und stark verkleinert. Es gibt keine Ommatidienstruktur mehr. Da normalerweise Fliegen auch ohne bzw. mit stark reduzierten Augen lebensfähig sind (z.B. bei einer Mutation von *eyeless*, einem zentralen Gen der Augenentwicklung) ist anzunehmen, dass UAS-*crb*^{MINI}30.1.2e zusätzliche unbekannt Defekte hervorruft, die zu pupaler Letalität führen.

Im Gegensatz dazu führt ektopische Expression des schwächeren Minigen-Konstruktes, UAS-*crb*^{MINI}30.1.4b, sowie der meisten *crb*^{intra}-Konstrukte (UAS-*crb*^{intra}38.1.4a, UAS-*crb*^{intra}38.1.2b und UAS-*crb*^{intra}Y₁₀E₁₆) zu unterschiedlich stark veränderten Phänotypen des adulten Auges.

Allen Augen dieser Kreuzungen gemein sind ektopische und verdoppelte Borsten sowie morphologische Veränderungen der Ommatidien und ihrer Linsen, die die wildtypische hexagonale Form und Anordnung der Linsen zu einer stark variablen, in schwächer rauhen Augen bis zu einer nahezu quadratischen verschieben. Die stärkeren der transgenen Konstrukte, UAS-*crb*^{MINI}30.1.4b und UAS-*crb*^{intra}38.1.4a und schwach UAS-*crb*^{intra}Y₁₀E₁₆ weisen zudem in unterschiedlichem Maße ein Kollabieren von Linsen auf, die mit Ausnahme der Kreuzung GMR-Gal4 x UAS-*crb*^{MINI}30.1.4b im anterioren Teil des Auges auftreten. Während sich in Augen, in denen die transgenen UAS-*crb*^{intra}-Konstrukt exprimiert wurden, alle Ommatidien, deren Linsen kollabieren, schwarz verfärben und möglicherweise nekrotisch werden, zeigt bei Überexpression des schwächeren Minigen-Konstrukts nur ein geringer Teil der Ommatidien mit Linsendefekten eine solche Schwarzfärbung.

Sollte diese Verfärbung bedeuten, dass die Ommatidien nekrotisch werden und absterben, könnte man postulieren, dass obgleich beide Arten von Konstrukten, *crb*^{MINI} und *crb*^{intra}, bei Überexpression die gleichen Defekte hervorrufen, die geschädigten Ommatidien bei Überexpression des *crb*-Minigens jedoch trotzdem überleben. Überexpression des schwächeren *crb*^{intra}-Konstruktes, UAS-*crb*^{intra}38.1.2b, zeigt diese Defekte nicht, bzw. nur äußerst selten, wie zum Beispiel in homozygoten Tieren einer Rekombinante aus Gal4^{sev} und UAS-*crb*^{intra}38.1.2b oder in (selten überlebenden) homozygoten Tieren der Rekombinante GMR-Gal4-

crb^{intra} 38.1.2b. Die jeweiligen Konstrukte müssen somit in diesem Falle homozygot vorliegen, um die Linsendefekte auslösen zu können.

In Kreuzungen mit den stärkeren der transgenen Konstrukten sind die Linsen des Auges oft nicht mehr alle in einer Ebene angeordnet, sondern eingesunken, und die Retina weist eine Faltung auf. In einer Kreuzung mit GMR-Gal4 verschmelzen die Linsen des gesamten Auges sogar vollständig miteinander. Hierdurch ist es in diesen Kreuzungen oft schwierig bzw. unmöglich, Rückschlüsse auf eine Anzahl der Borsten und/oder die Anordnung der unter den Linsen liegenden Ommatidien zu ziehen.

Kreuzungen, in denen die Treiberstämme mit UAS- $crb^{intra}\Delta ERLI$ gekreuzt wurden, weisen im Vergleich zum Wildtyp die geringsten Unterschiede auf. In Augen der Kreuzung Gal4^{sev} x UAS- $crb^{intra}\Delta ERLI$ findet man nur schwache Borstendefekte (ektopische und verdoppelte Borsten), ansonsten erscheint das Auge fast wildtypisch. Das Gleiche gilt für GMR-Gal4 x UAS- $crb^{intra}\Delta ERLI$, der von den GMR-Gal4 x UAS-*crb*-Kreuzungen ebenfalls der schwächste ist.

Die beobachteten Augenphänotypen scheinen also maßgeblich vom C-terminalen ERLI-Motiv von Crumbs abhängig zu sein. Fehlt dieses, so kommt es bei Überexpression des entsprechenden Konstruktes nur zu sehr schwachen Defekten. Hingegen zeigt die Überexpression eines Konstruktes, in dem die N-terminalen Y₁₀E₁₆-Domäne mutiert wurde, verglichen mit dem wildtypischen crb^{intra} keine offensichtlichen Unterschiede. Möglicherweise ist die extrazelluläre Domäne von Crumbs in der Lage, eine Schwarzfärbung der durch Linsendefekte geschädigten Ommatidien zu unterbinden und hierdurch ein mögliches Absterben der Ommatidien zu verhindern.

4.1.4 Semi-Dünnschnitte der Augen von Tieren ausgewählter UAS-*crb*^{intra}-Kreuzungen

Um festzustellen, wie die inneren Strukturen der durch die Überexpression verschiedener UAS-*crumbs*-Konstrukte erzeugten rauen Augen aussehen, wurden Augen von adulten Tieren ausgewählter Kreuzungen fixiert und mit einem Mikrotom semi-dünn (2,5µm) geschnitten. Die Präparate wurden mit Toluidinblau gefärbt, was im Idealfall die Linsen der Ommatidien und die Rhabdomere der Photorezeptorzellen blau hervorhebt. Die Pigmentzellen erscheinen aufgrund des eingelagerten Pigments rötlich, die einzelnen Gruppen Pigmentzellen (sekundäre und tertiäre Pigmentzellen) lassen sich im Wildtyp zumindest anhand ihrer Position, nicht aber aufgrund ihrer Färbung voneinander unterscheiden.

Wie im Rahmen dieser Analyse gezeigt wird, lassen Augen von Tieren, in denen UAS-*crb*^{intra}- Transgene überexprimiert wurden, mehr Pigmentzellen erkennen. Da hiermit eine fehlerhafte Lokalisation dieser Zellen einhergeht, ist es in Semi-Dünnschnitten von Augen aus diesen Kreuzungen nicht mehr möglich, die beiden Arten von Pigmentzellen eindeutig zu unterscheiden.

Normalerweise (siehe Schema 1.4) ist an jeder zweiten Ecke der Ommatidien eine Borste lokalisiert, die man bei den Semi-Dünnschnitten jedoch nur selten identifizieren kann.

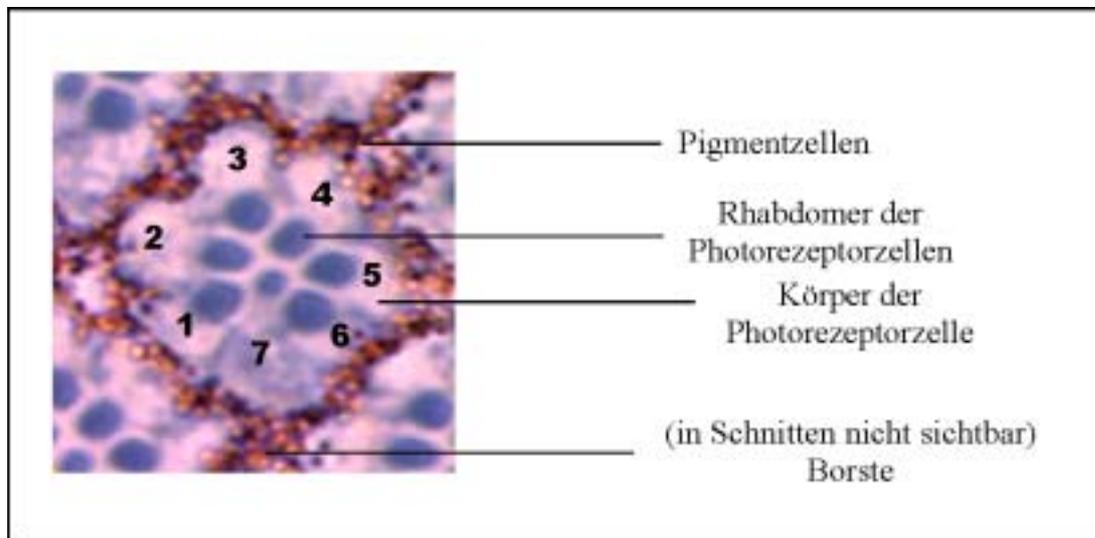


Abb. 4.7: Semidünnschnitt eines wildtypischen Auges (Ausschnitt: einzelnes Ommatidium):

Das Ommatidium ist von hexagonaler Form und wird von sekundären und tertiären Pigmentzellen umgeben (rot gefärbt). Als rötliche Punkte lässt sich das eingelagerte rote Pigment erkennen. Sekundäre und tertiäre Zellen lassen sich jedoch optisch nicht unterscheiden. Zentral sind die 7 Rhabdomere der Photorezeptorzellen (gefärbt in blau, die Zellen selbst erscheinen rosa) trapezförmig angeordnet. In den höheren Schnittebenen sind es die Rhabdomere der Photorezeptorzellen 1-7, in tiefer gelegenen Schnitten wird das Rhabdomer von Photorezeptorzelle R7 durch das von R8 ersetzt, die direkt unter R7 liegt (vgl. Einleitung, Abb. 1.4).

4.1.4.1 Semi-Dünnschnitte adulter Augen, in denen verschiedene UAS-*crb* Konstrukte unter der Kontrolle von Gal4^{sev} ektopisch exprimiert wurden

In wildtypischen Augen teilen sich benachbarte Ommatidien die sekundären und tertiären Pigmentzellen sowie die Borsten. Diese Zellen sind in Form einer Kette, Kopf an Kopf, angeordnet und trennen so als eine einzige Zellschicht die Photorezeptorzellen der einzelnen Ommatidien voneinander. Die sekundären Pigmentzellen sind zudem so organisiert, dass immer drei von ihnen die tertiären Pigmentzellen oder Borsten kontaktieren (Abb 4.13; vgl Kapitel 4.1.5). Hierdurch entsteht das hexagonale Muster der Ommatidien bzw. ihrer Linsen. In Semi-Dünnschnitten sind die Rhabdomere von sechs Photorezeptorzellen trapezförmig angeordnet; dazwischen kommt je nach Schnittebene das Rhabdomer von Photorezeptorzelle R7 bzw. R8 zu liegen (Abb. 4.7). Die Rhabdomere der Photorezeptorzellen erstrecken sich vom distalen Bereich des Auges bis zur proximal gelegenen Basallamina (Abb. 4.8 C-D, Lamina markiert mit Pfeil). Während der pupalen Augenentwicklung rotieren die Ommatidien entlang eines Äquators rechts bzw links herum, so dass die Rhabdomere der beiden Augenhälften im Bezug auf diesen Äquator spiegelverkehrt zueinander angeordnet sind (Abb. 4.8A, gestrichelte Linie markiert den Äquator).

Im Vergleich zum Wildtyp zeigen Schnitte der Augen von Tieren aus UAS-*crb*^{intra}-Kreuzungen unter der Kontrolle von Gal4^{sev} verschiedene Veränderungen.

In den Semi-Dünnschnitten schwach rauher Augen findet man vor allem eine veränderte Anordnung der Pigmentzellen. Anstelle von drei sekundären Pigmentzellen, die eine tertiäre Pigmentzelle oder Borste kontaktieren, findet man hier vier Pigmentzellen. Die vormals hexagonale Anordnung der Ommatidien verschiebt sich in Abhängigkeit von der Stärke des verwendeten Effektorstammes zu einer linear-quadratischen. Diese Anordnung von vier sekundären oder tertiären Pigmentzellen um Borsten herum wird im Weiteren als „sternförmig“ bezeichnet (Abb 4.8 E-F oder 4.9 C-D Pfeilkopf; quadratische Ommatidienform markiert durch gestrichelte Linie in 4.9 C).

Einzelne Pigmentzellen lassen sich in diesen Semi-Dünnschnitten nur in Ausnahmefällen identifizieren, daher lässt sich, zumindest in den schwach rauhen Augen, nicht eindeutig feststellen, ob zusätzliche Pigmentzellen pro Ommatidium hinzukommen, oder ob eine wildtypische Anzahl von Pigmentzellen nur fehlerhaft organisiert wird. In den Semi-Dünnschnitten stark rauher Augen ist jedoch eindeutig zu erkennen, dass hier mehr als nur eine Schicht Pigmentzellen die Photorezeptoren der einzelnen Ommatidien trennt (Abb 4.9 G-H, Pfeilkopf). Hiermit verbunden findet man Ommatidien unterschiedlicher Form und Größe.

Die Photorezeptoren und ihre Rhabdomere sind in schwach rauhen Augen der Gal4^{sev}- Kreuzungen nicht von Veränderungen betroffen. Sie weisen eine wildtypische Organisation auf und sind weitgehend normal rotiert (Abb. 4.8 E-D; Abb. 4.9 A-B).

Leichten Abweichungen hiervon liegt vermutlich die veränderte, quadratische Form der Ommatidien zugrunde. Ebenso wie im Wildtyp strecken sich die Rhabdomere dieser Photorezeptorzellen normal und reichen bis zur Basallamina.

In stark rauhen Augen mit vervielfachten Pigmentzellen kommt es jedoch teilweise zu einem Verlust der Photorezeptorzellen und ihrer Rhabdomere. Ommatidien, in denen Photorezeptoren vorhanden sind, lassen eine normale trapezförmige Organisation und teilweise auch einheitliche Rotation erkennen. An anderen Stellen sind die Photorezeptoren und Rhabdomere jedoch verloren gegangen oder kommen möglicherweise in einer anderen Schnittebene zu liegen. Das Loch in der Retina, das durch ihre Abwesenheit entsteht, wird teilweise durch die ektopischen Pigmentzellen aufgefüllt, die das Fehlen der Photorezeptorzellen im Zellverband kompensieren (Abb. 4.9, markiert durch *).

Da, wenn Photorezeptorzellen vorhanden sind, diese normal organisiert sind, wird bislang angenommen, dass es sich bei den beobachteten Verlusten von Photorezeptoren und Rhabdomeren nicht um direkte Defekte handelt, sondern eher um indirekte, sekundäre Effekte, die durch die erhöhte Anzahl von Pigmentzellen und eine dadurch veränderte Form und Morphologie der Ommatidien entstehen. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Augen aus Kreuzung Gal4^{sev} x UAS-*crb*^{intra}38.1.4a ließen defekte, kollabierte Linsen erkennen, durch die Zellen austraten. Hierbei könnte es sich möglicherweise um Photorezeptoren handeln, die dadurch in Semi-Dünnschnitten nicht mehr vorhanden sind. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass die Photorezeptoren und Rhabdomere in den proximalen Bereich und durch die Basallamina des Auges fallen.

In Rahmen dieser Analyse wurden Semi-Dünnschnitte adulter Augen von Tieren der Kreuzungen Gal4^{sev} x UAS-*crb*^{intra}38.1.2b, UAS-*crb*^{intra}38.1.4a und UAS-*crb*^{intra}ΔERLI analysiert. Zum Vergleich wurden zudem Schnitte von Augen des Wildtyps angefertigt sowie Schnitte von Augen von Tieren aus zwei ausgewählten *elav*-Gal4 x UAS-*crb* Kreuzungen (*elav*-Gal4 x UAS-*crb*^{intra}-38.1.4a und *elav*-Gal4 x UAS-*crb*^{MINI}-38.1.4b). In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Gal4^{sev}-und *elav*-Gal4-getriebenen Kreuzungen aufgelistet und auf den darauffolgenden Seiten die dazugehörigen Abbildungen aufgeführt.

Genotyp	Muster/Anordnung der Ommatidien	Anzahl und Anordnung der Pigmentzellen und Borsten	Photorezeptoren und Rhabdomere
Wildtyp (Abb. 4.8 A-D)	hexagonales Muster, Ommatidien einheitlich rotiert	wildtypische Anzahl (6 sekundäre, 3 tertiäre Zellen und drei Borsten) und Anordnung	7 Photorezeptoren, Rhabdomere trapezförmig angeordnet, Streckung bis zur Basallamina
Gal4 ^{sev} x UAS- crb ^{intra} 38.1.2b (Abb. 4.9 A-F)	quadratisches Muster, Ommatidien meist einheitlich rotiert	möglicherweise ektopische Pigmentzellen, meist sternförmig organisiert	7 Photorezeptoren, Rhabdomere trapezförmig angeordnet Streckung bis zur Basallamina
Gal4 ^{sev} x UAS- crb ^{intra} 38.1.4a (Abb. 4.9 G-H)	variables Muster mit unterschiedlich großen Ommatidien; Ommatidien an einigen Stellen noch einheitlich rotiert	ektopische Pigmentzellen umgeben die Photorezeptoren in mehreren Schichten	wo vorhanden, 7 Photorezeptoren und Rhabdomere trapezförmig angeordnet, teilweise Verlust von Photorezeptoren
Gal4 ^{sev} x UAS- crb ^{intra} ΔERLI (Abb. 4.8 E-H)	hexagonales, selten quadratisches Muster, Ommatidien einheitlich rotiert	möglicherweise wenige ektopische Pigmentzellen, selten sternförmig organisiert	7 Photorezeptoren, Rhabdomere trapezförmig angeordnet, Streckung bis zur Basallamina
Gal4 ^{sev} x UAS- crb ^{intra} Y ₁₀ E ₁₆	nicht untersucht		
Gal4 ^{sev} x UAS- crb ^{MINI} 30.1.2e	pupal letal		
Gal4 ^{sev} x UAS- crb ^{MINI} 30.1.4b	nicht untersucht		
<i>elav</i> -Gal4 x 38.1.2b	nicht untersucht		
<i>elav</i> -Gal4 x 38.1.4a (keine Abbildung vorhanden)	wildtypisch		
<i>elav</i> -Gal4 x ΔERLI	nicht untersucht		
<i>elav</i> -Gal4 x Y ₁₀ E ₁₆	nicht untersucht		
<i>elav</i> -Gal4 x 30.1.2e	nicht untersucht		
<i>elav</i> -Gal4 x 30.1.4b (keine Abbildung vorhanden)	wildtypisch, sehr selten findet man eine Lumenbildung in einzelnen Photorezeptorzellen		

Tab. 4.4: Tabellarische Zusammenfassung der Analyse von Semi-Dünnschnitten adulter Augen von Tieren aus Gal4^{sev}- und *elav*-Gal4-Kreuzungen

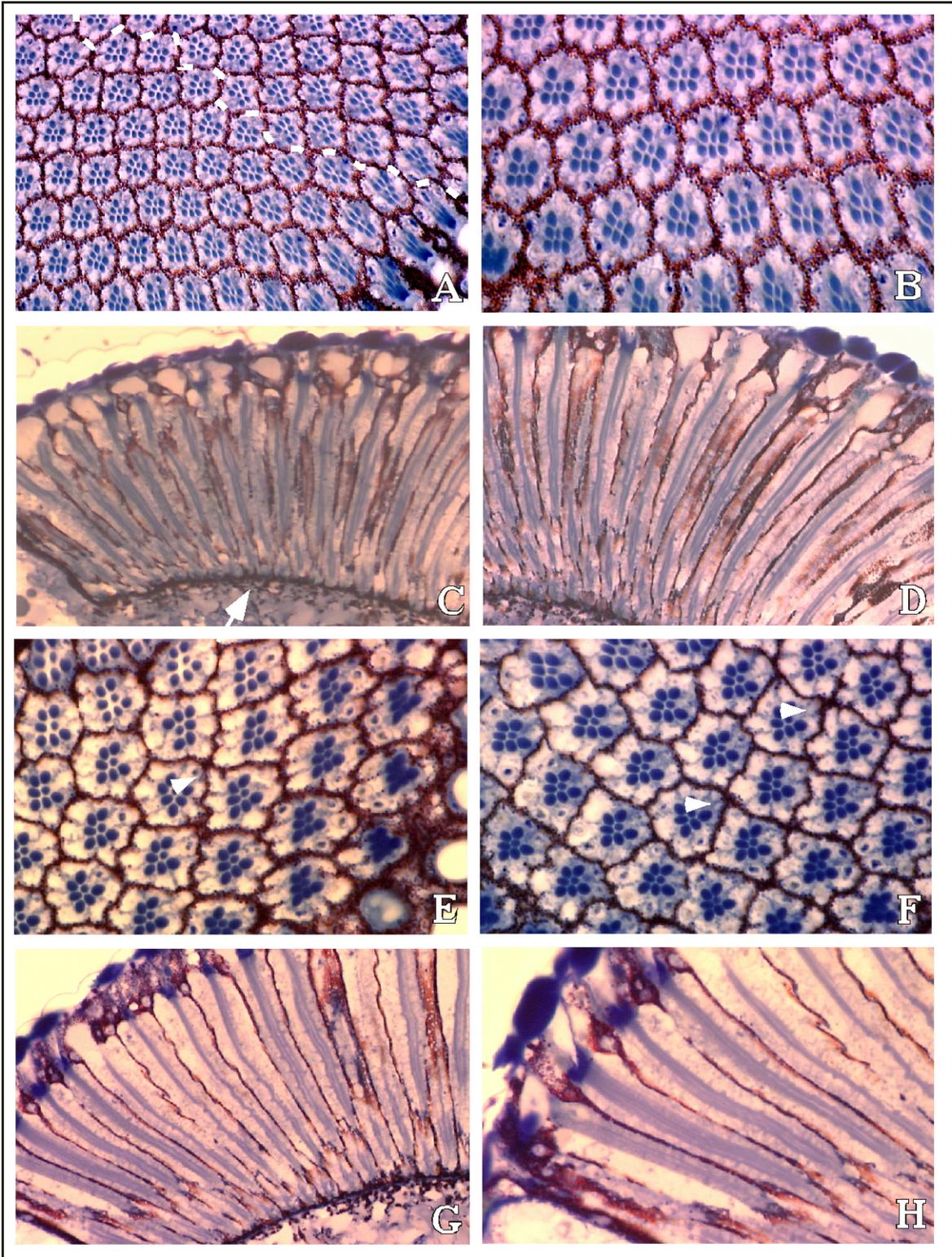


Abb 4.8: Semi-Dünnschnitte durch adulte Augen des Wildtyps (A und B) sowie Längs- (E und F) und Querschnitte (C und D) durch Augen der Kreuzung $Gal4^{sev} \times UAS-crb^{intra}\Delta ERLI$. Details siehe Text und Tabelle 4.4

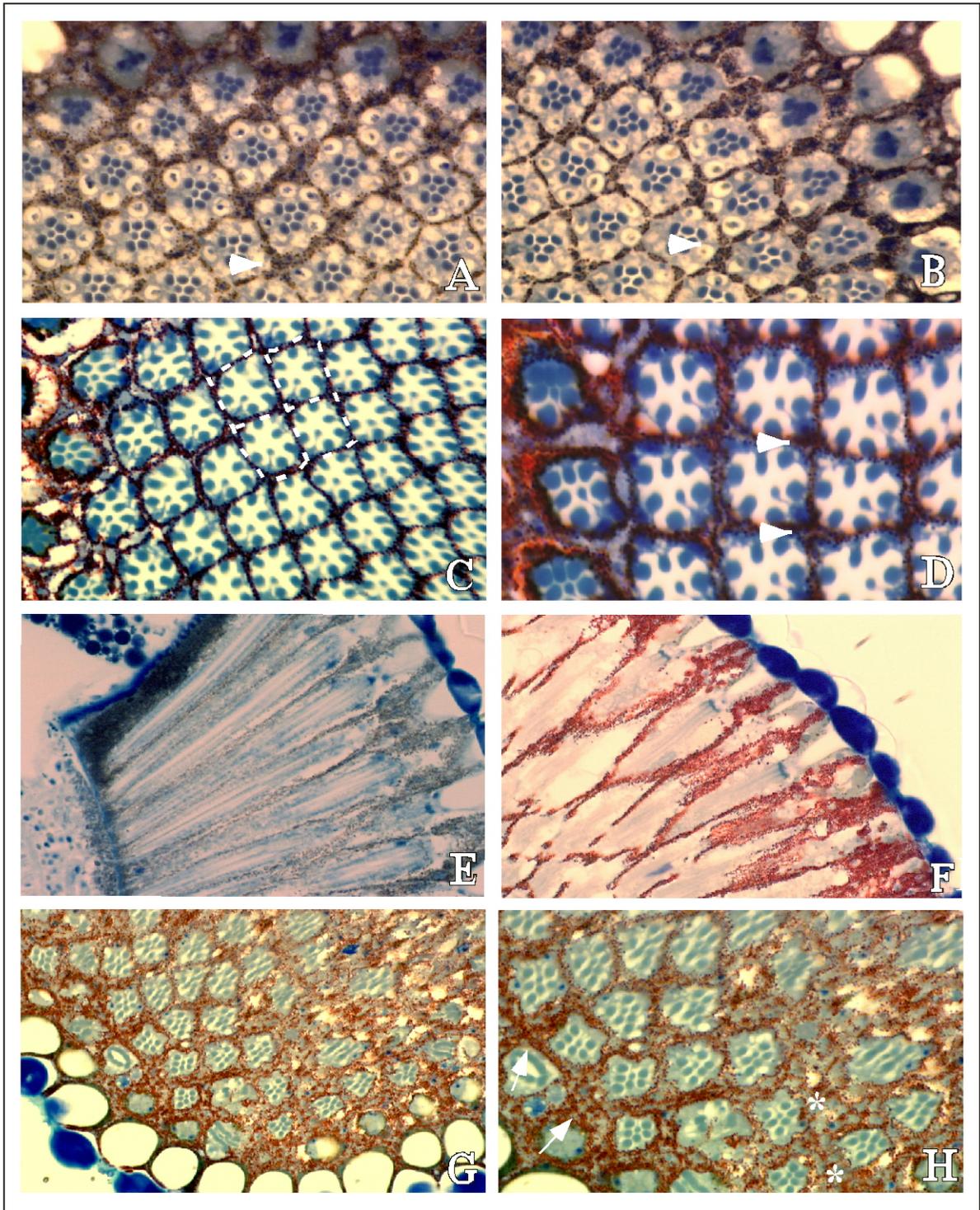


Abb 4.9: Semi-Dünnschnitte von adulten Augen der Kreuzungen $Gal4^{sev} \times UAS-crb^{intra38.1.2b}$ (A-D, Querschnitte, E-F Längsschnitte) sowie Querschnitte durch der Kreuzung $Gal4^{sev} \times UAS-crb^{intra38.1.4a}$. (G-H). Die Schnitte der Bilder entstammen vier unabhängigen Fixierungen. Details siehe Text und Tabelle 4.4.

4.1.4.2 Semi-Dünnschnitte adulter Augen, in denen verschiedene UAS-*crb* Konstrukte unter der Kontrolle von GMR-Gal4 ektopisch exprimiert wurden

Für die drei untersuchten GMR-Gal4 x UAS-*crb*-Kreuzungen, GMR-Gal4 x UAS-*crb*^{intra}38.1.2b, UAS-*crb*^{intra}38.1.4a, UAS-*crb*^{intra}ΔERLI kann generell gesagt werden, dass die Ergebnisse sehr uneinheitlich und teilweise nicht oder nur sehr schwer auszuwerten waren.

Die hier präsentierten Bilder dokumentieren zudem die schwächsten, d.h. die am wenigsten geschädigten Phänotypen, die in Augen von Tieren der jeweiligen Kreuzungen gefunden wurden.

Die Fixierung und die Herstellung von Semi-Dünnschnitten der Augen wurde mehrfach, unabhängig voneinander wiederholt, zusammen mit wildtypischen Augen als parallele Kontrolle, um auszuschließen, dass die beobachteten Phänotypen auf Fehler bei der Fixierung zurückzuführen sind. Die Fixierungsmethode mit Osmium (vgl. Methoden 3.5.8) erzielt zudem das bestmögliche Fixierungsergebnis.

Semi-Dünnschnitte der drei untersuchten Überexpressions-Kreuzungen sind äußerst instabil und zerfallen beim Schneiden mit dem Mikrotom leicht. Die Photorezeptorzellen weichen im besten Falle nur auseinander, es bilden sich ausgedehnte Zellumina, die die Pigmentzellen verdrängen, so dass diese kaum noch sichtbar sind. Die Organisation der Ommatidien bleibt jedoch noch weitgehend erhalten (Abb 4.10 A). In Linien mit stärker rauhen Augenphänotypen kann es jedoch dazu kommen, dass die Organisation der Zellen der Ommatidien zerfällt. Während die Pigmentzellen erhalten bleiben und teilweise stark vervielfacht vorliegen (Abb. 4.11 D), sind Photorezeptorzellen und ihre Rhabdomere unsortiert und können den einzelnen Ommatidien nicht mehr eindeutig zugeordnet werden (Abb 4.10 B-H). Im Falle der Kreuzung GMR-Gal4 x UAS-*crb*^{intra}38.1.4a fehlen sie vollständig, so dass nur noch ein netzartiges Geflecht von Pigmentzellen zu beobachten ist (Abb. 4.11D). Ebenso lässt sich in den Randbereichen dieser Semi-Dünnschnitte eine starke, durchgängige Blaufärbung erkennen, die die in den rasterelektronenmikroskopischen Bildern beobachtete Fusion der Linsen reflektiert.

Gewisse Variationen (nicht alle Phänotypen gezeigt) zwischen mehreren Schnitten der gleichen Kreuzungen lassen sich vermutlich dadurch erklären, dass das Gewebe generell instabil ist und beim Schneiden mit dem Mikrotom unterschiedlich reagieren kann. Sind Fixierung, Einbettung der Augen in Araldit und Schnittwinkel ideal, erhält man, wie hier in den Bildern gezeigt, noch einen zusammenhängenden Gewebeverband. Sind die Umstände weniger günstig, sind zum Beispiel möglicherweise nicht alle Zellen des Auges gleichermaßen fixiert oder ist der Schnittwinkel ungünstig, kann das Gewebe beim Schneiden zerreißen oder zerfallen.

Im Vergleich zu den untersuchten GMR-Gal4-Kreuzungen zeigt die von mir hergestellte transgene Linie GMR-*crb*^{intra}38.1 einen schwächer rauhen Phänotyp. Zwar weist sie generell ähnliche Defekte auf wie GMR-Gal4 x UAS-*crb*^{intra}38.1.2b, jedoch ist der Gewebeverband der Ommatidien zusammenhängender (4.11 A-B). In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der GMR-Gal4-getriebenen Kreuzungen aufgelistet, und auf den darauffolgenden Seiten finden sich die dazugehörigen Abbildungen.

Genotyp (Gal4-Treiber X transgene UAS-crb-Konstrukte)	Muster/Anordnung der Ommatidien	Anzahl und Anordnung der Pigmentzellen und Borsten	Photorezeptoren und Rhabdomere
GMR-Gal4 x UAS-crb ^{intra} 38.1.2b (Abb. 4.10 C-H)	Ommatidien stark deformiert, kein Muster erkennbar, einzelne Ommatidien nicht identifizierbar	noch vorhanden, möglicherweise ektopische Anzahl von Pigmentzellen, aber vollkommen variabel angeordnet	Rhabdomere vorhanden, aber variabel lokalisiert und weder trapezförmig angeordnet noch einem bestimmten Ommatidium zuzuordnen PRZs reichen nicht bis zur Basallamina
GMR-Gal4 x UAS-crb ^{intra} 38.1.4a (Abb. 4.11 C-D)	Auge und Ommatidien stark deformiert, kein Muster erkennbar, einzelne Ommatidien nicht identifizierbar	stark erhöhte, allerdings vollkommen unorganisierte Anzahl ektopischer Pigmentzellen	fast völliger Verlust von Photorezeptorzellen und Rhabdomeren
GMR-Gal4 x UAS-crb ^{intra} ΔERLI (Abb. 4.10 A-B)	Ommatidien stark deformiert, kein Muster erkennbar, einzelne Ommatidien nur noch selten identifizierbar und von unterschiedlicher Größe	noch vorhanden, möglicherweise wenige ektopische Zellen, aber vollkommen variabel angeordnet	Rhabdomere vorhanden, aber selten trapezförmig angeordnet PRZs wirken aufgebläht und reichen vermutlich nicht bis zur Basallamina
GMR-crb ^{intra} 38.1 (transgen) (Abb. 4.11 A-B) homo- und heterozygote Tiere zeigen einen identischen Phänotyp	stark variables Muster, Ommatidien unterschiedlich groß, möglicherweise teilweise verschmolzen	ektopische, unorganisierte Anzahl von Pigmentzellen	Rhabdomere vorhanden, aber fehllokalisiert PRZs reichen nicht bis zur Basallamina
GMR-Gal4 x UAS-crb ^{intra} Y10E16	nicht untersucht		
GMR-Gal4 x UAS-crb ^{MINI} 30.1.2e	pupal letal		
GMR-Gal4 x UAS-crb ^{MINI} 30.1.4b	nicht untersucht		

Tab. 4.5: Tabellarische Zusammenfassung der Semi-Dünnschnitte der Augen von Tieren aus GMR-Gal4-getriebenen Kreuzungen

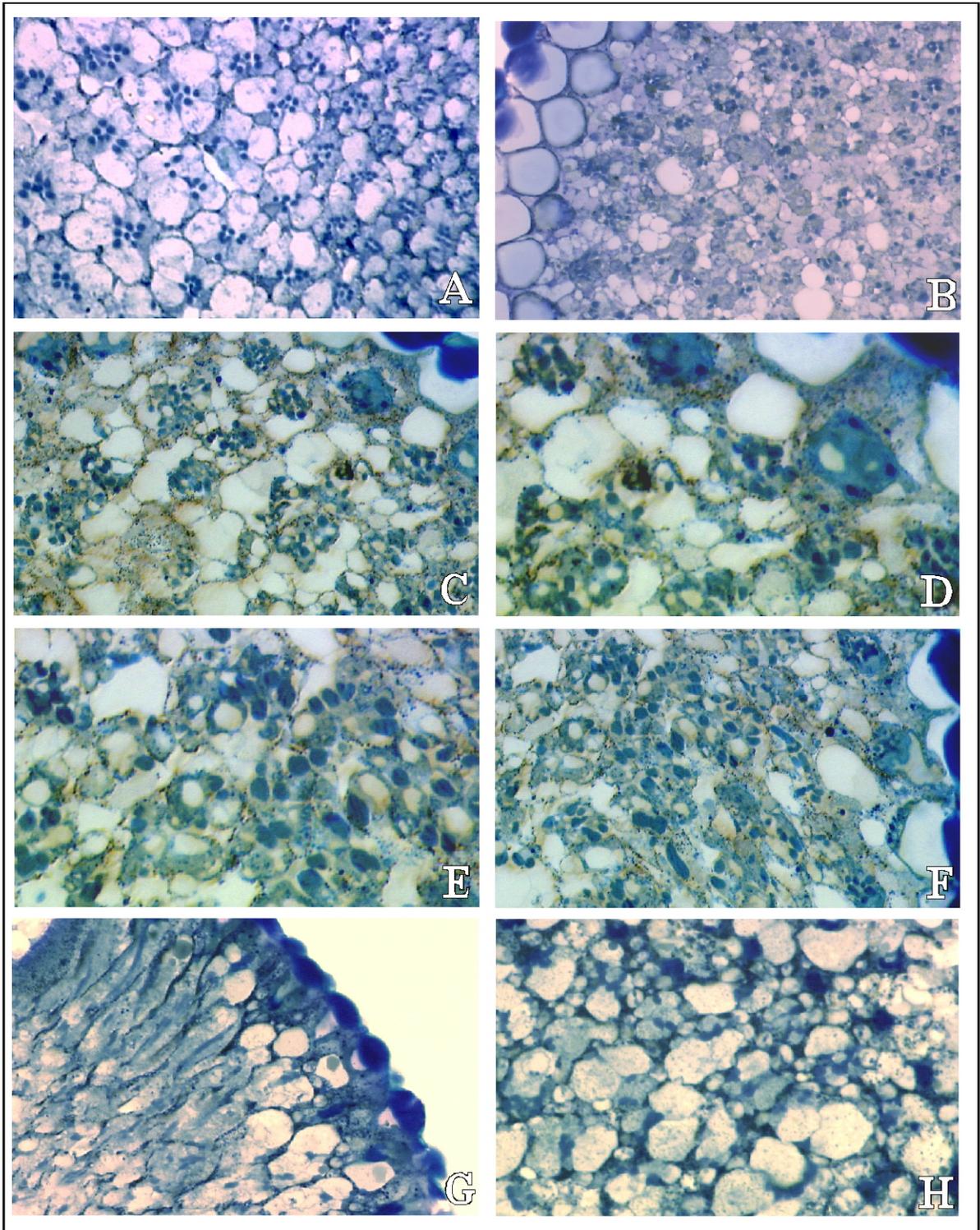


Abb 4.10: Semi-Dünnschnitte von adulten Augen der Kreuzungen GMR-Gal4 x UAS-crb^{intra}DERLI (A und B) sowie Längs- und Querschnitte durch zwei verschiedene Augen aus zwei unabhängigen Fixierungsansätzen der Kreuzung GMR-Gal4 x UAS-crb^{intra}38.1.2b (C-F und G-H, G längs geschnitten). Details siehe Text.

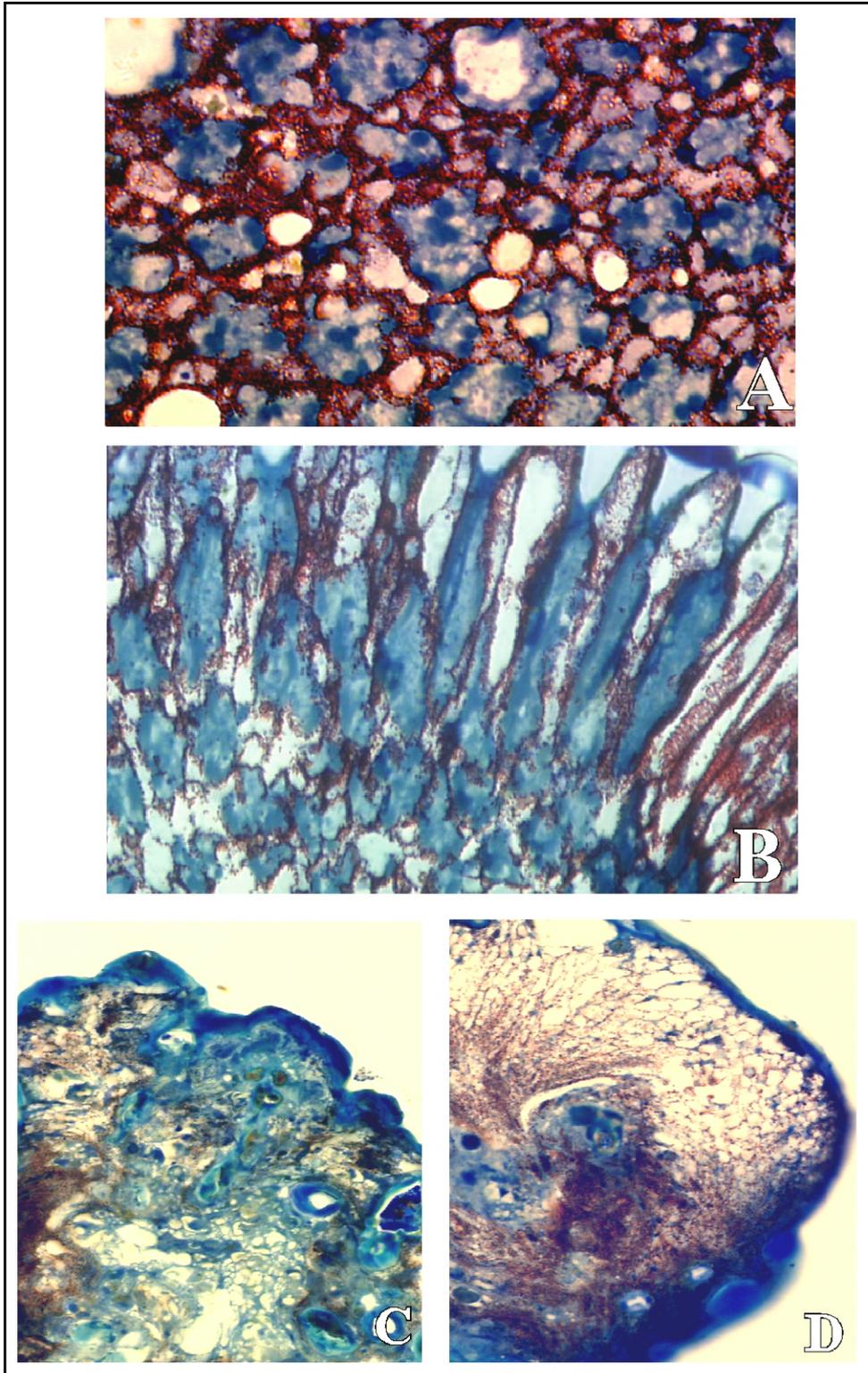


Abb 4.11: Semi-Dünnschnitte durch adulte Augen des transgenen Stammes $GMR-crb^{intra38.1}$ (A und B, Quer- und Längsschnitt von zwei verschiedenen Augen aus unterschiedlichen Fixierungen) und der Kreuzung $GMR-Gal4 \times UAS-crb^{intra38.1.4a}$. Details siehe Text und Tabelle 4.5

4.1.4.3 Zusammenfassung: Semi-Dünnschnitte adulter Augen

Von den im Rahmen dieser Analyse hergestellten Semi-Dünnschnitten lassen sich nur die der Gal4^{sev}-Kreuzungen sowie die der transgenen Linie GMR-*crb*^{intra}38.1 eindeutig auswerten. In den GMR-Gal4-Kreuzungen treten zusätzliche Defekte auf, die die Morphologie der Photorezeptorzellen und der Ommatidien stark beeinträchtigen und das Auge beim Schneiden instabil werden lassen. Diese abnorme Morphologie läßt keine eindeutigen Aussagen über den durch *crumbs*-Überexpression induzierten Phänotyp zu.

Die drei Gal4^{sev}-getriebenen Kreuzungen zeigen vergleichbare Abweichungen vom Wildtyp, unterscheiden sich aber in ihrer Stärke voneinander.

Adulte Augen von Tieren, in denen UAS-*crb*^{intra}ΔERLI oder das schwächere *crb*^{intra}-Konstrukt, UAS-*crb*^{intra}38.1.2b, überexprimiert wurde, zeigen vor allem eine erhöhte Anzahl von Pigmentzellen, die sich vor allem um Borsten herum in einem sternförmigen Muster konzentrieren. Hierdurch verändern sich Form und Anordnung der Ommatidien. Das hexagonale Muster verändert sich zu einem mehr oder weniger regelmässig quadratischen. Die Photorezeptorzellen und die Morphologie der Rhabdomere ist weitgehend normal, und leichte Abweichungen vom Wildtyp sind vermutlich indirekte Effekte, basierend auf der veränderten Form der Ommatidien.

In Augen von Kreuzungen mit dem vollständigen transgenen *crb*^{intra}-Konstrukt ist ein großer Teil der Ommatidien von diesen morphologischen Veränderungen betroffen, während bei einer Überexpression des *crb*^{intra}ΔERLI-Konstruktes sehr viel weniger Ommatidien eine quadratische Anordnung aufweisen.

In der Kreuzung Gal4^{sev} x UAS-*crb*^{intra}38.1.4a mit dem stärkeren der beiden *crb*^{intra}-Konstrukte sind die Pigmentzellen stark vervielfacht und an einigen Stellen fehlen die Photorezeptoren und Rhabdomere von Ommatidien oder liegen in anderen Schnittebenen, während die Pigmentzellen der entsprechenden Ommatidien erhalten bleiben. Rhabdomere, so noch vorhanden, sind allerdings normal trapezförmig angeordnet und mehr oder weniger einheitlich rotiert. Da keine Längsschnitte für diesen Phänotyp vorliegen, läßt sich nicht sagen, ob die Photorezeptorzellen und Rhabdomere noch die Basallamina erreichen.

Aus diesen Phänotypen läßt sich folgern, dass Überexpression von UAS-*crb*-Konstrukten mit Gal4^{sev} in Linsen-sezernierenden Zellen und Photorezeptorzellen vor allem zur Veränderung von Anzahl und Anordnung der Pigmentzellen führt. Photorezeptorzellen und Rhabdomere sind durch Überexpression von UAS-*crb* nicht direkt betroffen sondern allenfalls indirekt durch die Veränderung der Augenmorphologie. Zudem ist dieser Phänotyp abhängig von der Anwesenheit des ERLI-Motivs.

GMR-*crb*^{intra}38.1 zeigt einen Phänotyp, der teilweise mit dem von Gal4^{sev} x UAS-*crb*^{intra}38.1.4a vergleichbar ist. Auch sind mehr Pigmentzellen vorhanden. Diese sind aufgebläht und von rundlicher Form.

Die einzelnen Ommatidien sind von unterschiedlicher Form und Größe, so dass nicht eindeutig ist, ob Teile der Ommatidien fehlen, sie verschmolzen sind oder auf unterschiedliche Schnittebenen verteilt liegen.

Im Gegensatz zu Gal4^{sev} x UAS-*crb*^{intra}38.1.4a findet man in GMR-*crb*^{intra}38.1 jedoch keine trapezförmige Anordnung der Rhabdomere mehr. Die Rhabdomere, soweit vorhanden, verlagern sich an den Rand der Ommatidien und kontaktieren dort oft die Pigmentzellen. Die Photorezeptorzellen sind nicht mehr als einzelne Zellen identifizierbar sondern nur noch als diffuses Gewebe vorhanden. Dieser Phänotyp ist ausnahmslos in allen Ommatidien zu beobachten.

Dies bedeutet, dass in dieser Linie, im Gegensatz zu den Gal4^{sev}-getriebenen Kreuzungen, die ektopische Expression von *crb*^{intra} nicht nur indirekte Auswirkungen auf die Photorezeptorzellen hat, sondern dass hier Photorezeptoren und ihre Morphologie direkt von der Überexpression betroffen sind.

Die Phänotypen aller anderen GMR-Gal4-Überexpressionskreuzungen sind aufgrund ihrer stark abnormen Morphologie für diese Analysen nicht auszuwerten. Die einzige Aussage die man treffen kann, ist, dass die Kreuzung mit UAS-*crb*^{intra}ΔERLI wiederum im schwächsten Phänotyp resultiert, gefolgt von UAS-*crb*^{intra}38.1.2b und UAS-*crb*^{intra}38.1.4a, d.h. dass auch hier die schon zuvor beobachtete Hierarchie der UAS-*crb*-Effektorlinien zu finden ist. Ebenso ist es möglich, dass auch hier Photorezeptorzellen und Rhabdomere direkt von der Überexpression betroffen sind, was zu den beobachteten abnormen Veränderungen führt.

In Augen von Tieren aus der Kreuzung mit UAS-*crb*^{intra}38.1.4a sind fast alle Photorezeptorzellen/Rhabdomere verloren gegangen. Ob diese möglicherweise wie in der entsprechenden Kreuzung mit Gal4^{sev} durch beschädigte Linsen ausgetreten oder durch die Basallamina des Auges gefallen sind, lässt sich anhand der Schnitte nicht beantworten. Allerdings findet man eine stark erhöhte Anzahl von Pigmentzellen, die das Auge wie ein engmaschiges Netz durchziehen. In dieser Hinsicht stimmt der Phänotyp, selbst wenn er sehr viel stärker ist, teilweise dem der entsprechenden Gal4^{sev}-Kreuzung überein.

Überexpression von zwei starken UAS-*crb*-Konstrukten unter der Kontrolle von *elav*-Gal4 zeigt (fast) keine Auswirkung auf die wildtypische Organisation des Auges. Pellikka et al. (2002) beschreiben in ihrer Publikation eine Ausdehnung des Rhabdomerstiels und verbunden damit eine Lumenbildung, die sie bei Überexpression von transgenen Konstrukten beobachten, die die extrazelluläre Domäne von Crumbs beinhalten. Dieser Phänotyp wurde in der *elav*-Gal4-getriebenen Kreuzung (*elav*-Gal4 x UAS-*crb*^{MINI}-38.1.4b) allerdings nur äußerst selten beobachtet.

Im Querschnitt durch die entsprechenden Augen fanden sich nur zwei oder drei Photorezeptorzellen, die eine solche (schwache) Vakuolenbildung aufwiesen. Der Rest des Auges zeigte keinen Unterschied zum Wildtyp. Dies unterstützt die Ergebnisse der stereomikroskopischen Untersuchungen, dass obwohl *crumbs* selbst in Photorezeptorzellen exprimiert wird, eine Überexpression von UAS-*crb* in Photorezeptorzellen nicht verantwortlich für den rauen Augenphänotyp ist.

4.1.5 Cobaltsulfid-Färbungen an pupalen Augenimaginalscheiben

Die Cobaltsulfid-Färbung ist eine Methode, mit deren Hilfe Umrisse und Oberflächenstrukturen der Zellen pupaler Imaginalscheiben sichtbar gemacht werden können (3.4.7.2).

Für die Färbungen wurden die Imaginalscheiben zeitlich so synchronisiert, dass die Behandlung nach dem Abschluss des Zelltods, aber vor der Sezernierung der Linse erfolgte. Die gefärbten Scheiben wurden im Vergleich mit dem Wildtyp auf eine veränderte Zellzahl bzw. eine veränderte Anordnung oder Morphologie der Zellen hin untersucht.

Bei der Durchführung dieser Färbungen traten mehrere technische Probleme auf. Zum einen sind Imaginalscheiben aus Kreuzungen, die zu stark veränderten Phänotypen bei adulten Tieren führen, im gewünschten pupalen Stadium instabil und lassen sich nur schwer präparieren (vor allem Kreuzungen mit UAS-crb^{intra}38.1.4a und UAS-crb^{MINI}30.1.4b). Daher konnten Imaginalscheiben aus Tieren dieser Kreuzungen entweder nicht untersucht werden, oder die Qualität der photographischen Dokumentation der beobachteten veränderten Phänotypen war für eine Präsentation unzureichend.

Bei den pupalen Imaginalscheiben handelt es sich um Epithelien mit einer gewölbten Struktur, die wie ein Pilzhut auf dem Gehirn aufliegen (vgl. Einleitung, Abb. 1.3). Will man Bilder von einer mit Cobaltsulfid gefärbten Augenimaginalscheibe machen, so kann man die Imaginalscheibe nicht in einer Fokusebene aufnehmen. Ausschnitte der Imaginalscheibe verlieren in den Randbereichen des Bildes oft an Schärfe.

Zudem kam es fast immer vor, dass das Cobaltsulfid nicht nur in feinen Partikeln ausfiel, sondern, trotz Modifikation des Färbeprotokolls, auch in größeren Flocken. Vor allem in Kreuzungen mit starken Effektorstämmen, die stark unregelmässig geformte pupale Imaginalscheibe aufweisen, sind diese Partikeln oft als Verunreinigungen auf einigen Präparaten sichtbar.

Daher wurden den meisten der folgenden Abbildungen von Cobaltsulfid-Färbungen schematische Darstellungen beigelegt, die die Details der gefärbten Strukturen verdeutlichen sollen.

Wie bei den zuvor durchgeführten Analysen fanden sich auch mit diesem Verfahren im Vergleich zum Wildtyp eine Reihe von Veränderungen:

1.) Veränderungen oder Defekte, die die Linsen-sezernierenden Zellen oder primären Pigmentzellen betreffen:

Schwache Veränderungen der Linsen-sezernierenden Zellen äussert sich in Form einer fehlerhaften Rotation (z.B. Abb 4.16 C). Zudem findet man oft eine zusätzliche Linsen-sezernierende Zelle (Abb. 4.16, markiert durch *), wobei die Anzahl der von dieser Veränderung betroffenen Ommatidien vom verwendeten Effektorstamm abhängt. In Kreuzungen, die einen stärkeren rauhen Augenphänotyp aufweisen lassen sich zusätzliche Defekte erkennen, die möglicherweise in einer Veränderung von Zell-Zell-Adhäsion begründet sein könnten.

Die Linsen-sezernierenden Zellen verlieren den Kontakt zueinander, weichen auseinander und verlieren hierbei ihre runde Form (Abb. 4.17 / 4.18, markiert durch einen Pfeil). Sie strecken sich und ordnen sich entlang der primären Pigmentzellen an, wobei sie den Kontakt zu den primären Pigmentzellen zu maximieren, während sie nur noch geringen Kontakt zueinander aufweisen (Abb. 4.18B). Als Folge dieser abnormen Anordnung bildet sich ein Loch, durch das noch nicht genauer bestimmte Zellen, möglicherweise Photorezeptorzellen, aus den Ommatidien austreten (Abb. 4.18 und 4.19). Diese Veränderungen betreffen häufig, jedoch nicht ausschließlich die Ommatidien mit fünfter Linsen-sezernierender Zelle. Zusätzlich zu Veränderungen oder Defekten der Linsen-sezernierenden Zellen ist in Imaginalscheiben von Kreuzungen mit stark rauhem Augenphänotyp häufig auch eine mögliche dritte primäre Pigmentzelle zu beobachten. „Mögliche“ bedeutet, dass diese Zelle aufgrund ihrer Morphologie oft nicht eindeutig zu identifizieren ist und aufgrund ihrer Position sowohl eine fehlerhaft lokalisierte Linsen-sezernierende Zelle als auch eine dritte Pigmentzelle sein kann oder eine interommatidiale Pigmentzelle, die sich zwischen die primären Pigmentzellen geschoben hat (Abb. 4.16 A und B, markiert mit einem Pfeilkopf).

2.) Veränderungen oder Defekte, die die sekundären und tertiären Pigmentzellen betreffen:

Die gefundenen Veränderungen der sekundären und tertiären Pigmentzellen sind sehr variabel, und es ist aufgrund einer veränderten Morphologie dieser Zellen nicht immer möglich, sekundäre und tertiäre Pigmentzellen voneinander zu unterscheiden. Wie bereits in den Semidünnschnitten beobachtet, findet man in den pupalen Imaginalscheiben aller untersuchten Kreuzungen eine erhöhte Anzahl interommatidialer (sekundärer und tertiärer) Pigmentzellen. Diese sind in Kreuzungen mit schwächer rauhem Augenphänotyp weitgehend Kopf an Kopf angeordnet, so dass wie im Wildtyp eine Schicht interommatidialer Zellen die Ommatidien voneinander trennt. Eine bevorzugte Art, zusätzliche interommatidiale Pigmentzellen bei einer Neuorganisation in das entstehende Muster zu integrieren, ist hierbei die Bildung eines „Sterns“. Hierbei ordnen sich, anstelle von drei, vier sekundäre oder tertiäre Pigmentzellen um eine Borste herum an, und vier dieser Sterne bilden die Eckpunkte von fast quadratischen Ommatidien (Abb. 4.14 A). Mit zunehmend stark veränderten Phänotypen findet man jedoch auch unregelmäßigere Anordnungen, in denen die interommatidialen Pigmentzellen parallel zueinander zu liegen kommen. Dies bedeutet, dass mit zunehmender Stärke des Phänotyps mehr als nur eine Zellschicht die Ommatidien voneinander trennt. Hierbei stellen, wie bereits bei der Bildung der „Sterne“ beobachtet, vor allem Borsten Punkte dar, um die herum sich interommatidiale Pigmentzellen in erhöhtem Maße sammeln (Abb. 4.14 C, 4.17 A, 4.18 A).

3.) Veränderungen oder Defekte der Borsten

Wie schon bei den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen lassen sich auch hier schwache Defekte, wie z. B. eine Fehlsortierung von Borsten, erkennen (Abb. 4.13). Ebenso findet man stärkere Defekte, die mit einer erhöhten Anzahl von Borsten einhergehen.

Man muss auch hier zwischen ektopischen Borsten im gesamten Auge und einer Verdopplung von Borsten an bestimmten Stellen im Auge unterscheiden (Abb. 4.14 A, ektopische Borsten, im Vergleich zu 4.14 B und C, verdoppelte Borsten).

4.) Veränderungen, die die Ommatidien bzw. die Morphologie des gesamten Auges betreffen:

Aufgrund der abweichenden Anzahl und Organisation der Pigmentzellen verändert sich die Form der Ommatidien, die sich häufig zu einer quadratischen verschiebt (4.15 B). Zudem kann man Unterschiede in den von Defekten betroffenen Regionen finden. Vor allem die abnorme Organisation von Linsen-sezernierenden Zellen, Bildung eines Lochs und Austritt von Zellen findet man bevorzugt im anterioren Bereich des Auges, während ektopische Pigmentzellen in der Regel im gesamten Auge zu finden sind. Die Randommatidien („Perimeter Cluster“) wurden in allen Kreuzungen wie im Wildtyp durch Zelltod eliminiert (ohne Abbildung).

Wie bereits in den vorherigen Versuchen wurden Imaginalscheiben von folgenden UAS-*crumbs*-Überexpressionskreuzungen untersucht:

Gal4^{sev} x UAS-*crb*^{intra}ΔERLI, UAS-*crb*^{intra}38.1.b, UAS-*crb*^{intra}38.1.4a und UAS-*crb*^{intra} Y₁₀E₁₆ sowie GMR-Gal4 x UAS-*crb*^{intra}ΔERLI, UAS-*crb*^{intra}38.1.b, UAS-*crb*^{intra} Y₁₀E₁₆ und UAS-*crb*^{MINI}30.1.4b.

In der folgenden Tabelle werden die Ergebnisse der bei Tieren aus diesen Kreuzungen gefundenen Phänotypen aufgelistet:

Kreuzung / Genotyp	Linsen-sezernierende (LS) und primäre Pigmentzellen (PPCs)	Interommatidiale Pigmentzellen (IOPs) = sekundäre und tertiäres Pigment	Borsten	Struktur des Auges und der Ommatidien
Wildtyp (Abb. 4.12)	4 LS, einheitlich rotiert, umgeben von 2 PPCs	6 sekundäre und 3 tertiäre Pigmentzellen (IOCs)	3 Borsten	hexagonales Muster, keine Randommatidien
Gal4 ^{sev} x UAS- <i>crb</i> ^{MINI} 30.1.2e	Schwerwiegende morphologische Defekte; Scheibe konnte nicht präpariert werden, daher keine Abbildung vorhanden			
Gal4 ^{sev} x UAS- <i>crb</i> ^{MINI} 30.1.4b (keine Abbildung)	ektopische LS und PPCs, adhäsive Defekte der LS Zellen	ektopische IOCs, meist variabel, teilweise sternförmig angeordnet	ektopische und verdoppelte Borsten	variables Muster, teilweise quadratisches Muster, adhäsive Defekte vor allem anterior, keine Randommatidien
Gal4 ^{sev} x UAS- <i>crb</i> ^{intra} 38.1.2b (Abb. 4.14)	weitgehend 4 LS, einheitlich rotiert, 2 PPCs, selten zusätzliche LS-Zellen oder PPCs	ektopische IOCs, häufig sternförmig angeordnet	ektopische und verdoppelte Borsten	quadratisches Muster, keine Randommatidien

Kreuzung	Linsen-sezernierende (LS) und primäre Pigmentzellen (PPCs)	Interommatidiale Pigmentzellen (IOPs) = sekundäres und tertiäres Pigment	Borsten	Struktur des Auges und der Ommatidien
Gal4 ^{sev} x UAS-crb ^{intra} 38.1.4a (Abb. 4.18)	ektopische variabel rotierte LS, und PPCs, adhäsive Defekte der LS Zellen	ektopische IOCs, variabel, nur noch selten sternförmig angeordnet	ektopische und verdoppelte Borsten	variables, selten quadratisches Muster, adhäsive Defekte vor allem anterior, keine Randommatidien
Gal4 ^{sev} x UAS-crb ^{intra} Y ₁₀ E ₁₆ (Abb. 4.16)	ektopische LS, weitgehend einheitlich rotiert, und PPCs schwache adhäsive Defekte	ektopische IOCs, häufig sternförmig angeordnet	ektopische und verdoppelte Borsten	variables, oft quadratisches Muster, schwache adhäsive Defekte vor allem anterior, keine Randommatidien
Gal4 ^{sev} x UAS-crb ^{intra} ΔERLI (Abb. 4.13)	wildtypisch, 4 LS, einheitlich rotiert, umgeben von 2 PPCs	sehr wenige ektopische IOCs, teilweise sternförmig angeordnet	selten ektopische und verdoppelte Borsten	hexagonales Muster, keine Randommatidien
GMR-Gal4 x UAS-crb ^{MINI} 30.1.2e	Morphologische Defekte zu schwer; Scheibe konnte nicht präpariert werden, daher keine Abbildung vorhanden			
GMR-Gal4 x UAS-crb ^{MINI} 30.1.4b (Abb. 4.19)	ektopische, variabel rotierte LS und PPCs, adhäsive Defekte der LS Zellen	ektopische IOCs, variabel, teilweise auch sternförmig angeordnet	ektopische und verdoppelte Borsten	variables Muster, teilweise quadratisches Muster, adhäsive Defekte betreffen das gesamte Auge, keine Randommatidien
GMR-Gal4 x UAS-crb ^{intra} 38.1.2b (Abb. 4.15)	meist 4 variabel rotierte LS, 2 PPCs, selten ektopische Zellen	ektopische IOCs, häufig sternförmig angeordnet (im Bild nicht gezeigt)	ektopische und verdoppelte Borsten	häufig quadratisches Muster, keine Randommatidien
GMR-crb ^{intra} 38.1 (transgen)	nicht untersucht			
GMR-Gal4 x UAS-crb ^{intra} 38.1.4a	Morphologische Defekte zu schwer; Scheibe konnte nicht präpariert werden, daher keine Abbildung vorhanden			
GMR-Gal4 x UAS-crb ^{intra} Y ₁₀ E ₁₆ (Abb. 4.17)	ektopische LS, variabel rotiert, und PPCs schwache adhäsive Defekte	ektopische IOCs, variabel und teilweise sternförmig angeordnet	ektopische und verdoppelte Borsten	variables Muster, teilweise quadratisches Muster, adhäsive Defekte vor allem anterior, keine Randommatidien
GMR-Gal4 x UAS-crb ^{intra} ΔERLI (keine Abb.)	4 variabel rotierte LS, meist 2, selten ektopische PPCs	sehr wenige ektopische IOCs, teilweise sternförmig angeordnet	selten ektopische und verdoppelte Borsten	hexagonales Muster, keine Randommatidien

Tab. 4.6: Tabellarische Zusammenfassung der Cobaltsulfidfärbungen von Augenimaginalscheiben, in denen UAS-*crb*-Transgene unter der Kontrolle von Gal4^{sev} oder GMR-Gal4 überexprimiert wurde (LS = Linsen-sezernierende Zellen, PPCs = Primäre Pigmentzellen, IOCs = Interommatidiale Pigmentzellen)

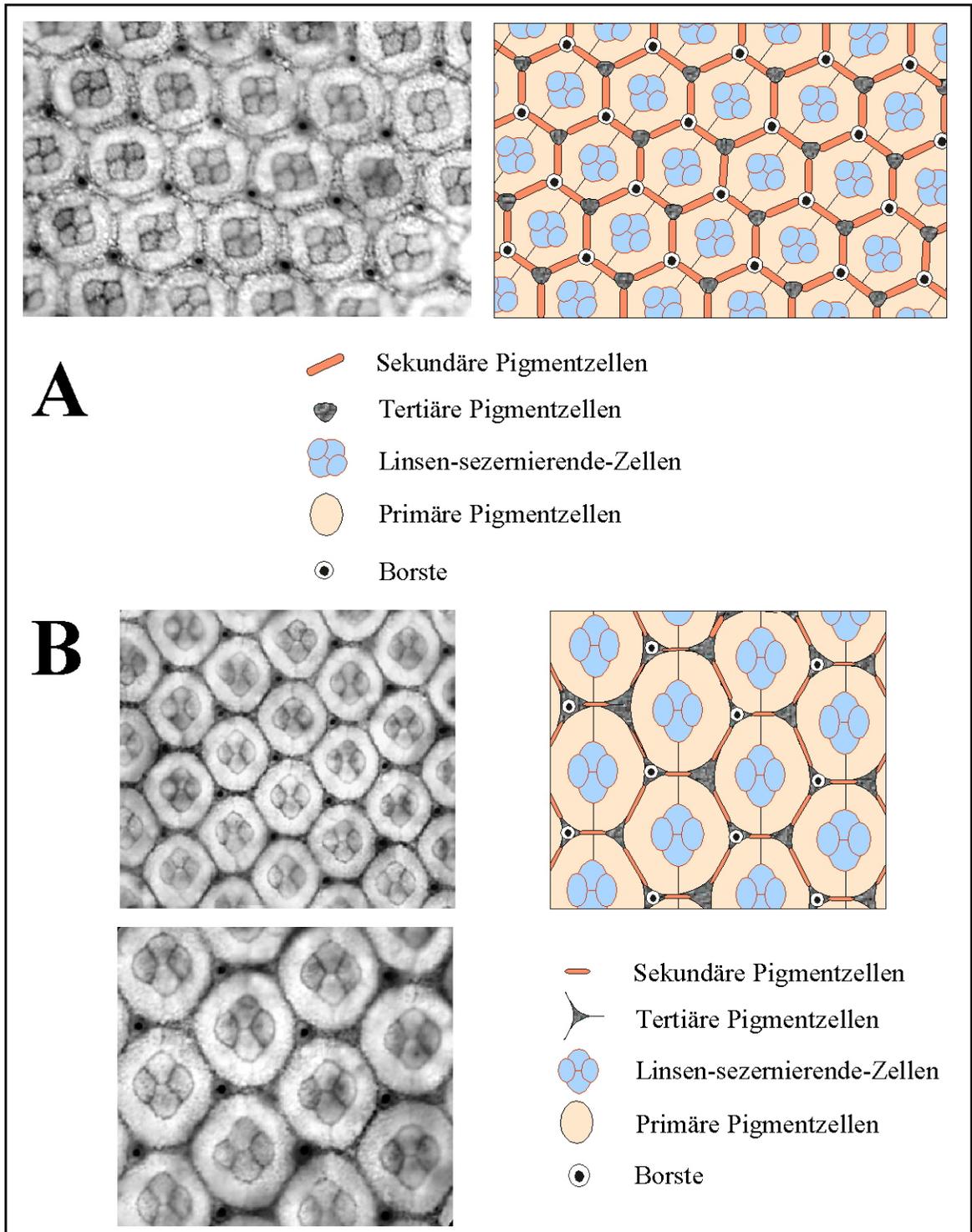


Abb. 4.12: Cobaltsulfidfärbungen pupaler Augenimaginalscheiben des Wildtyps in zwei verschiedenen Stadien mit einer schematischen Darstellung beider Scheiben

Beide (A und B) haben die Zelltodphase bereits abgeschlossen. In (A) sind die sekundären und tertiären Pigmentzellen jedoch noch zu erkennen wohingegen sie in (B) bereits stark durch die primären Pigmentzellen zurückgedrängt wurden sind. Ansonsten zeigen beide Stadien ein regelmäßiges hexagonales Muster. Vier Linsen-sezernierende Zellen und zwei primäre Pigmentzellen werden von sekundären und tertiären Pigmentzellen umschlossen, wobei sich die benachbarten Ommatidien sowohl Pigmentzellen als auch Borsten teilen. Details siehe Text und Tabelle 4.6.

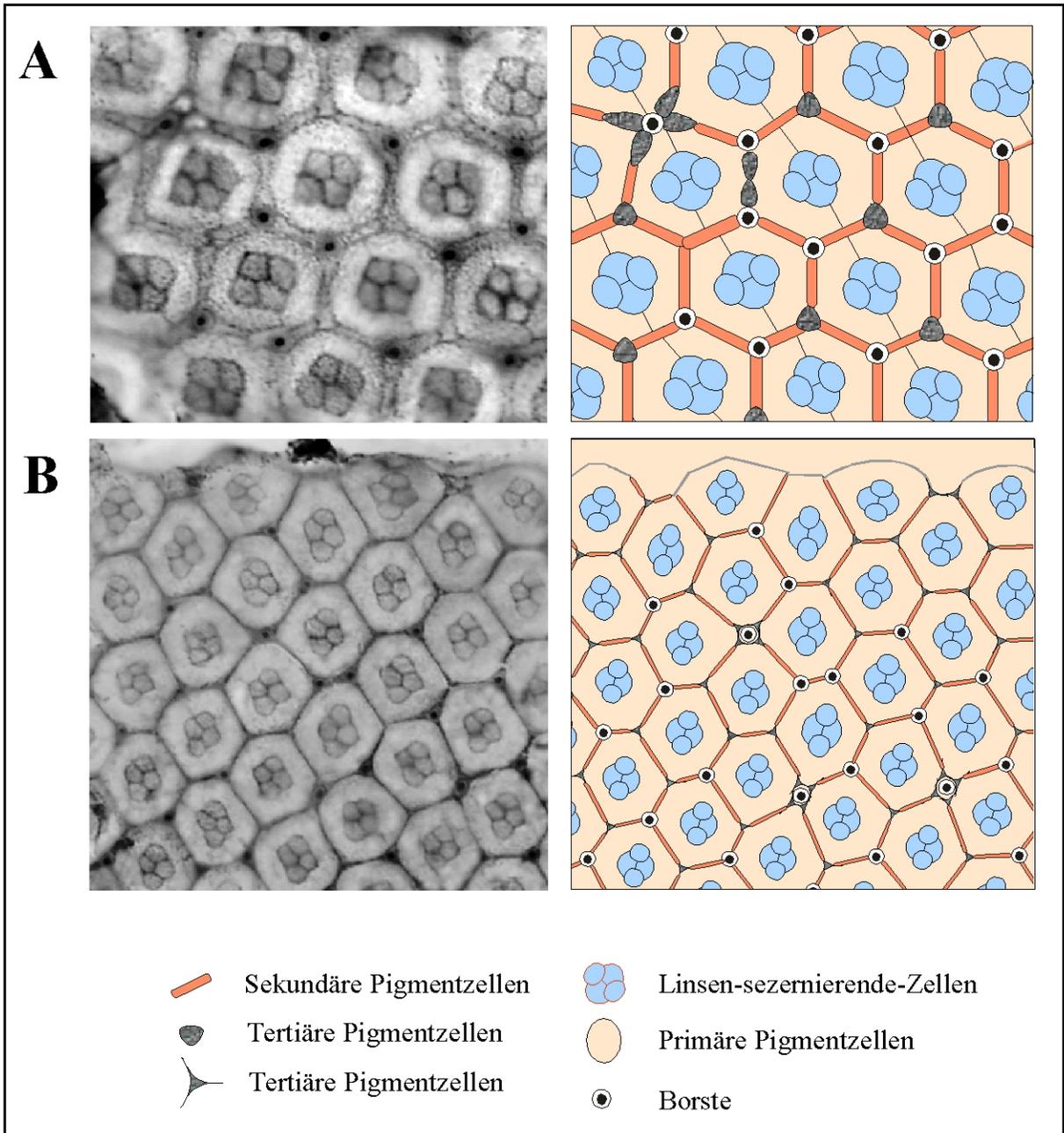


Abb. 4.13: Cobaltsulfidfärbungen pupaler Augenimaginalscheiben der Kreuzung $Gal4^{sev} \times UAS-crb^{intra}\Delta ERLI$ in zwei verschiedenen Stadien zusammen mit einer schematischen Darstellung beider Scheiben

Beide (A und B) haben die Zelltodphase bereits abgeschlossen. In (A) sind die sekundären und tertiären Pigmentzellen jedoch noch zu erkennen, wohingegen sie in (B) bereits stark durch die primären Pigmentzellen zurückgedrängt worden sind.

Beide Scheiben zeigen noch ein weitgehend hexagonales Muster. Nur an wenigen Stellen sind mehr tertiäre Pigmentzellen zu erkennen. Ebenso sind Borsten teilweise fehlerhaft sortiert, so dass in einigen Regionen eine erhöhte Anzahl zu erkennen ist, wohingegen an anderen Stellen Borsten fehlen. Für Details siehe Text und Tabelle 4.6.

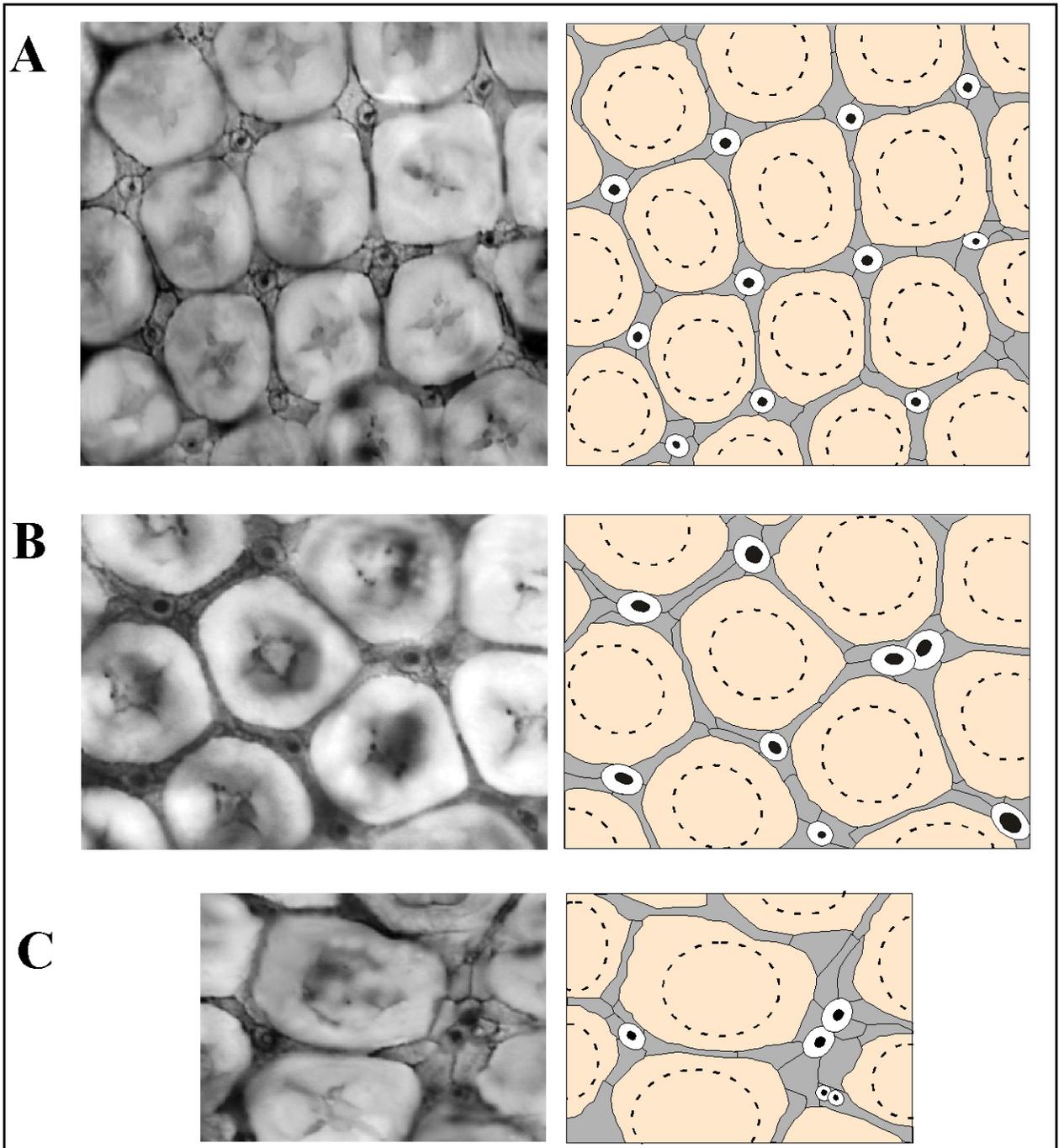


Abb. 4.14: Cobaltsulfidfärbungen pupaler Augenimaginalscheiben der Kreuzung $Gal4^{sev} \times UAS-crb^{intra38.1.2b}$

Abbildung A-C zeigen Ausschnitte von drei verschiedenen Scheiben. In allen drei Bildern sind sekundäre und tertiäre Pigmentzellen (grau) vervielfacht, wobei deren Morphologie allerdings so verändert ist, dass sekundäre und tertiäre Pigmentzellen nicht mehr eindeutig unterschieden werden können.

In (A) lässt sich ein relativ regelmäßiges Sternmuster erkennen. Eine Borste wird von zumeist vier Zellen umgeben. Vier dieser "Sterne" bilden die vier Eckpunkte von fast quadratischen Ommatidien.

(B) und (C) zeigt Regionen von zwei Scheiben, in welchen die Pigmentzellen vervielfacht sind, und teils parallel zueinander angeordnet sind, teil sich in Gruppen um die Borsten herum sammeln.

Details siehe Text und Tabelle 4.6.

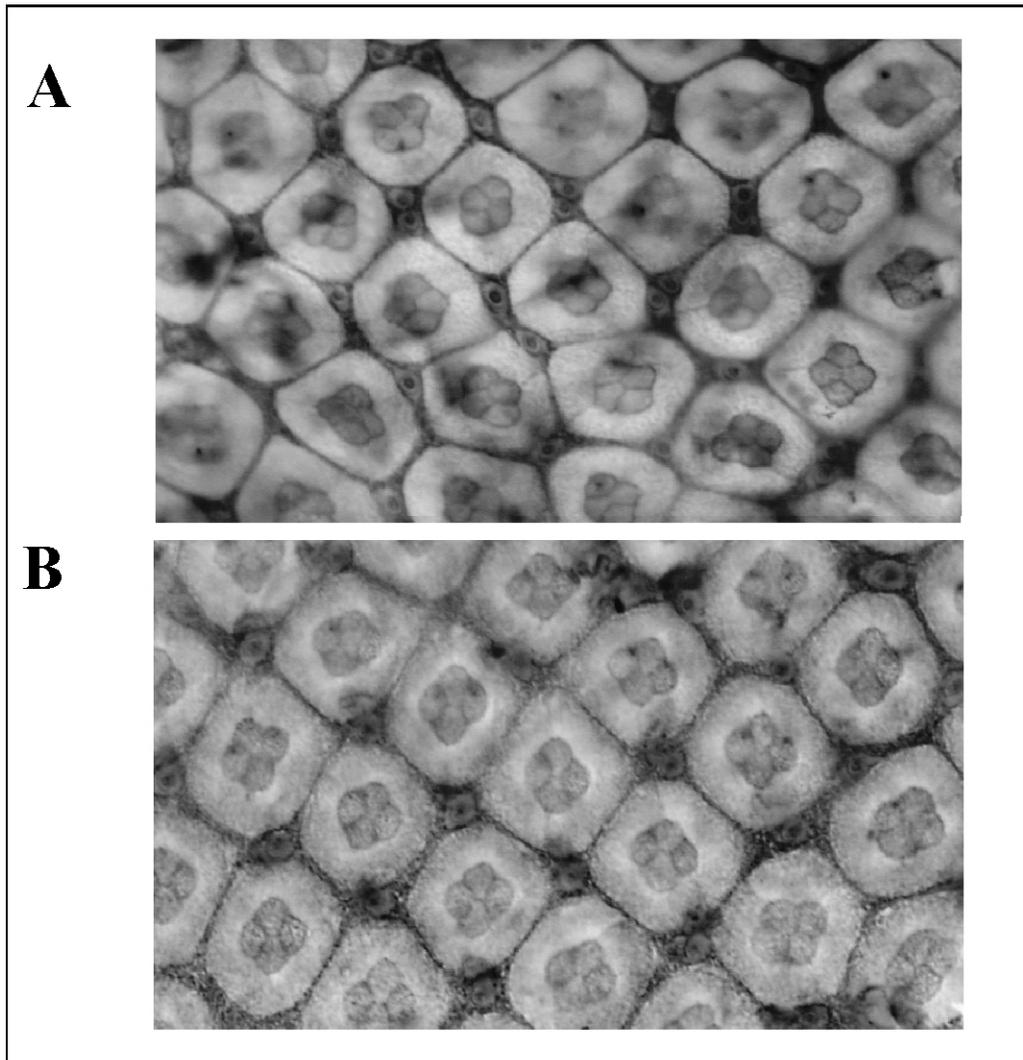


Abb 4.15: Cobaltsulfidfärbungen pupaler Augenimaginalscheiben der Kreuzung GMR-Gal4 x UAS-*crb*^{intra38.1.2b}.

Für diese Färbungen sind keine schematischen Abbildungen beigelegt, da die Bilder der beiden Färbungen auch ohne diese eindeutig sind. Abbildungen A und B zeigen Ausschnitte von späten Scheiben dieser Kreuzung, in welchen sekundäre und tertiäre Pigmentzellen bereits von den primären zurückgedrängt worden und nicht zu sehen sind. Die Anzahl der Borsten ist erhöht, in jüngeren Scheiben, hier nicht zu erkennen, sind um diese Borsten herum vier interommatidiale Pigmentzellen angeordnet. Hierdurch sind die Ommatidien in einem weitgehend quadratischen Muster organisiert. Linsen-sezernierende Zellen liegen in normaler Anzahl vor, wengleich nicht immer einheitlich rotiert. Details siehe Text und Tabelle 4.6.

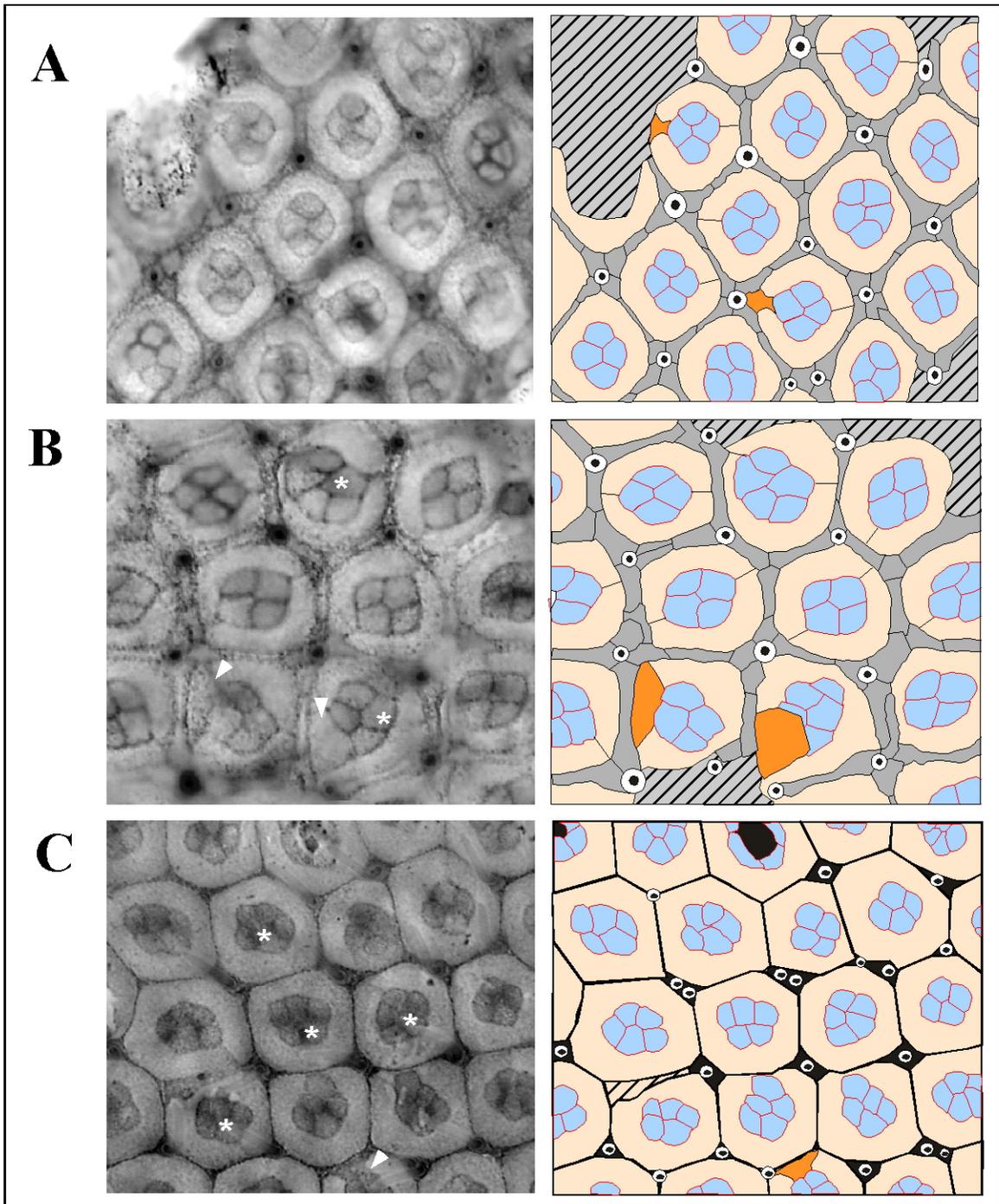


Abb 4.16: Cobaltsulfidfärbungen pupaler Augenimaginalscheiben der Kreuzung $Gal4^{sev} \times UAS-crb^{intraY_{10}E_{16}}$ in zwei verschiedenen Stadien

(A/B) Borsten sowie sekundäre und tertiäre Pigmentzellen sind stark vervielfacht, sekundäre und tertiäre Pigmentzellen können allerdings nicht mehr eindeutig unterschieden werden. Sie bilden teilweise (vgl A und B) ein regelmäßiges Sternmuster. Eine Borste wird von zumeist vier Zellen umgeben. Vier dieser "Sterne" bilden die vier Eckpunkte von fast quadratischen Ommatidien. Teilweise tritt auch eine zusätzliche Linsen-sezernierende Zelle auf (*), sowie eine Zelle (markiert in orange), die entweder eine dritte primäre Pigmentzelle oder eine weitere linsen-sezernierende Zelle sein könnte.

(C) In älteren Scheiben weicht ein Teil der Linsen-sezernierenden Zellen auseinander. Als Resultat dieses Defektes tritt bislang unbestimmte Zellen, möglicherweise Photorezeptorzellen, aus den Ommatidien aus. Details siehe Text und Tabelle 4.6. Farblich gekennzeichnete Strukturen vgl. Abb. 4.17 und 4.18.

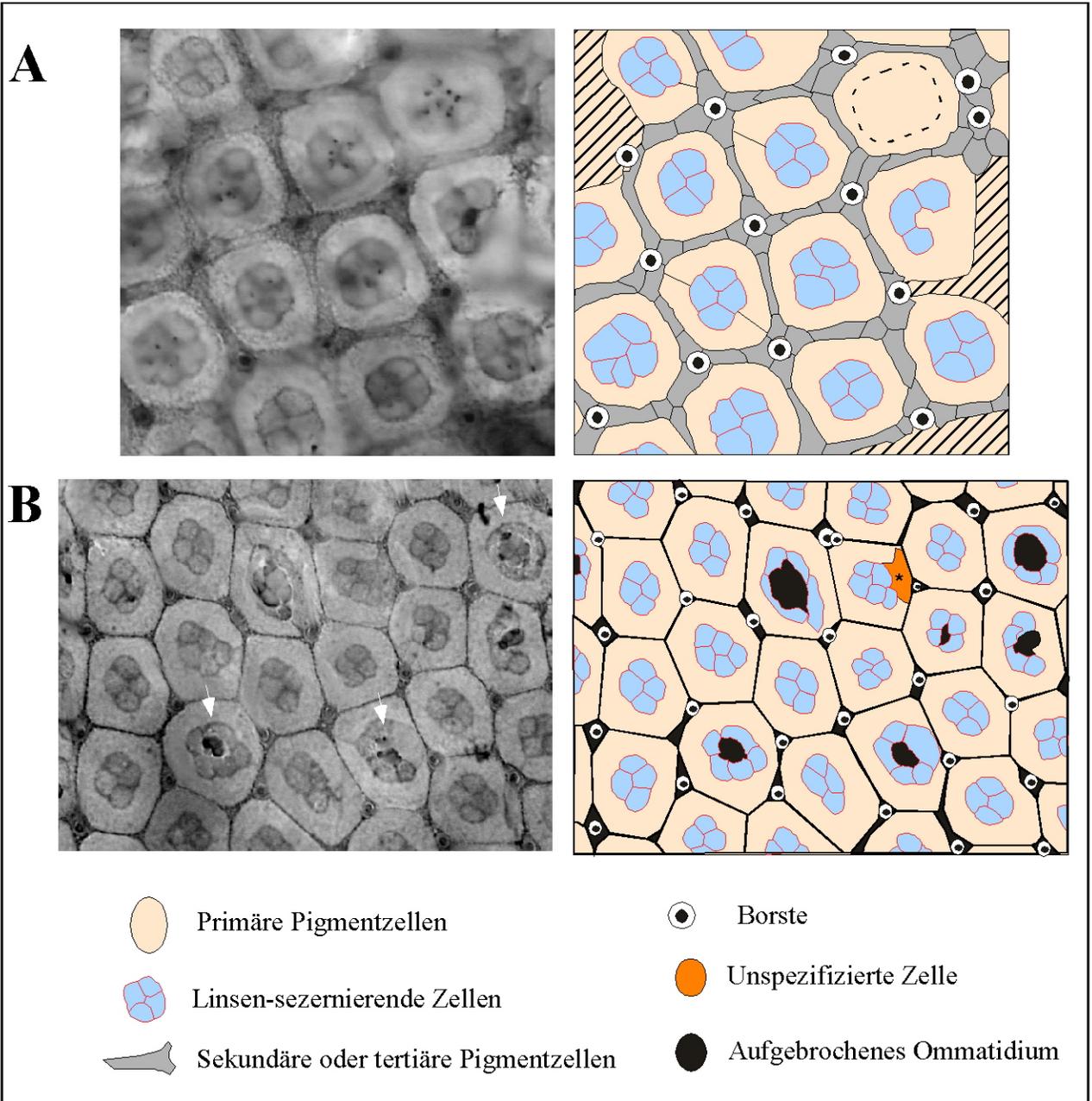


Abb. 4.17: Cobaltsulfidfärbungen pupaler Augenimaginalscheiben der Kreuzung GMR-Gal4 x UAS-*crb*^{intra}_{Y10E16} in zwei verschiedenen Stadien.

(A) Borsten sowie sekundäre und tertiäre Pigmentzellen sind stark vervielfacht, wobei ihre Morphologie so stark verändert ist, dass sekundäre und tertiäre Pigmentzellen nicht mehr eindeutig unterschieden werden können. Sie bilden häufig ein regelmäßiges Sternmuster. Eine Borste wird von zumeist vier Zellen umgeben. Vier dieser "Sterne" bilden die vier Eckpunkte von fast quadratischen Ommatidien. Teilweise tritt auch eine zusätzliche linsen-sezernierende Zelle auf.

(B) In älteren Scheiben erkennt man eine stark unregelmäßige Organisation der unterschiedlich geformten Ommatidien. Ein Teil der linsen-sezernierenden Zellen weicht auseinander (Pfeil), wobei diese Defekte teilweise, aber nicht ausschließlich Ommatidien mit fünf Linsen-sezernierenden Zellen betreffen. Nicht näher bestimmte Zellen treten aus den Ommatidien aus. Manche Ommatidien weisen Zellen auf, die aufgrund ihrer Position und Morphologie nicht eindeutig spezifiziert werden können. Vermutlich handelt es sich hierbei um eine dritte primäre Pigmentzelle oder eine zusätzliche Linsen-sezernierende Zelle. Details siehe Text und Tabelle 4.6.

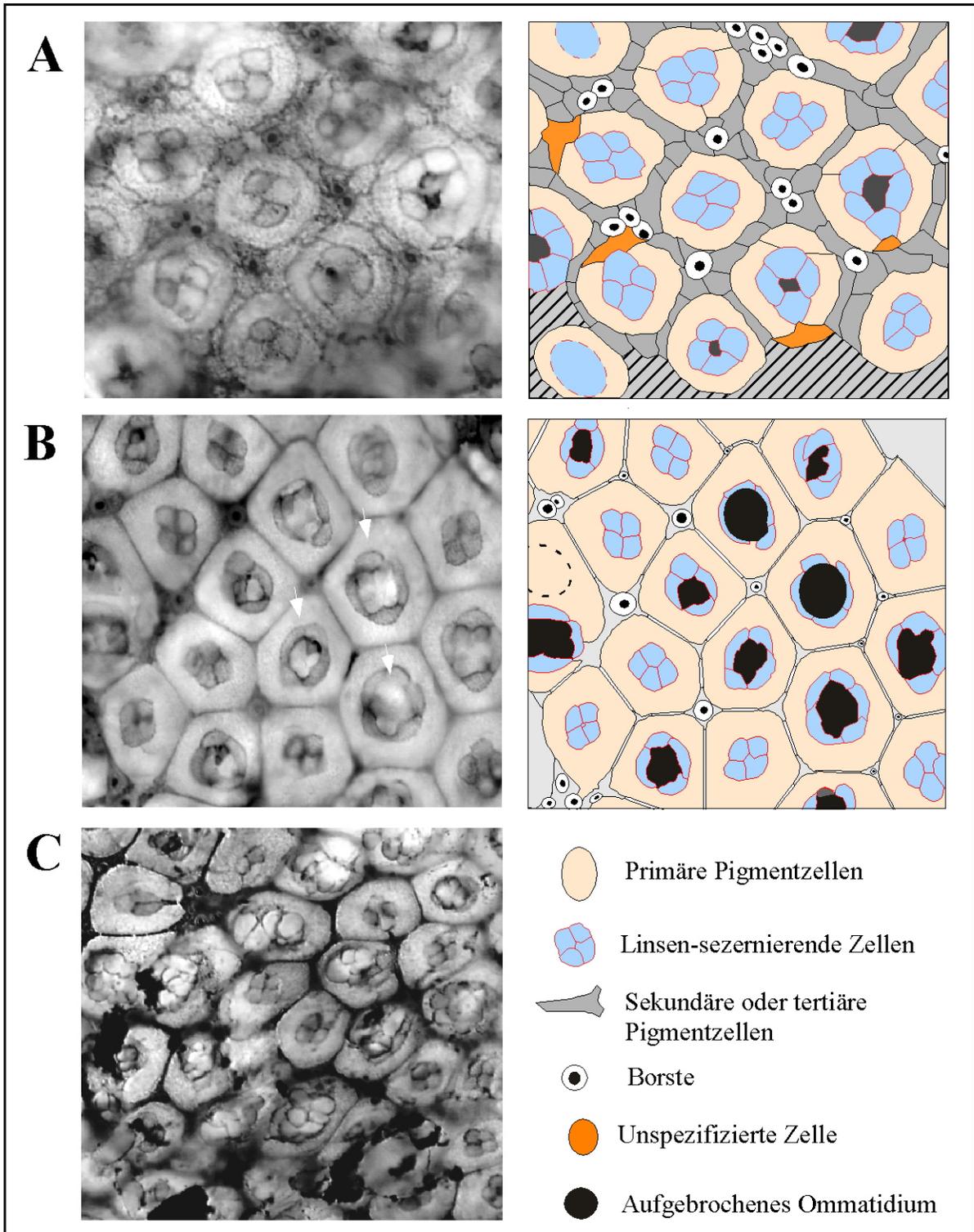


Abb. 4.18: Cobaltsulfidfärbungen pupaler Augenimaginalscheiben der Kreuzung $Gal4^{sev} \times UAS-cr^{intra}38.1.4a$ in drei verschiedenen Stadien.

(A) Borsten sowie sekundäre und tertiäre Pigmentzellen sind stark vervielfacht und bilden ein weitgehend variables, Muster. Teilweise tritt eine zusätzliche Linsen-sezernierende Zelle auf, sowie eine Zelle (markiert in orange), welche entweder eine dritte primäre Pigmentzelle oder eine weitere Linsensezernierende Zelle sein kann.

(B/C) In älteren Scheiben weichen viele der Linsen-sezernierenden Zellen auseinander (Pfeil). Als Resultat dieses Defektes treten Zellen, möglicherweise Photorezeptorzellen, aus den Ommatidien aus. Bei den schwarzen Regionen in (C) handelt es sich um ausgefallenes Cobaltsulfid. Details siehe Text und Tabelle 4.6.

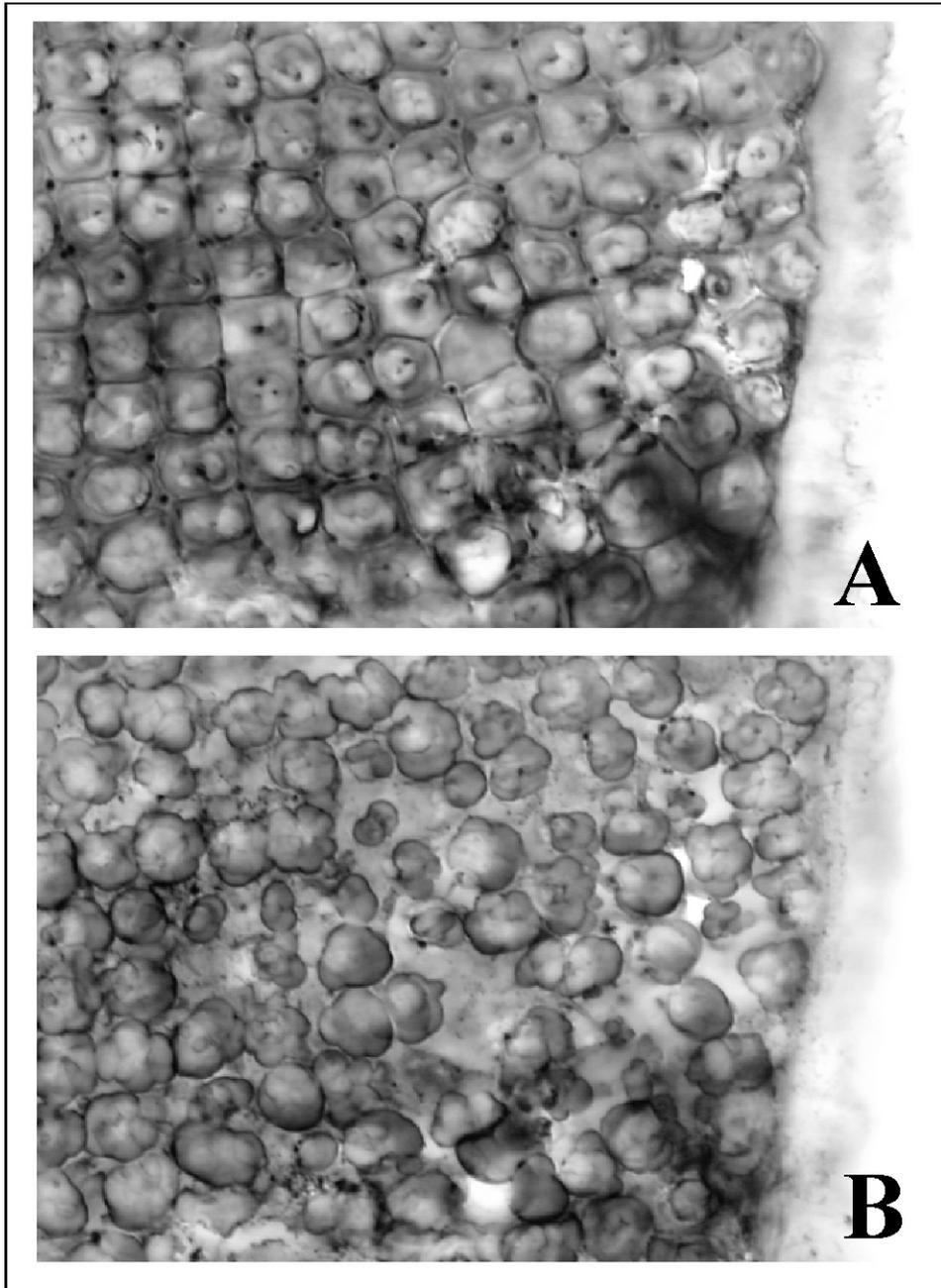


Abb 4.19: Cobaltsulfidfärbungen pupaler Augenimaginalscheiben der Kreuzungen GMR-Gal4 x UAS-cr^b^{MINI}30.1.4b, aufgenommen in zwei verschiedenen Fokusebenen

(A) zeigt die tiefergelegene der beiden Ebenen. Die Ommatidien lassen eine quadratische Form erkennen, sowie eine erhöhte Anzahl Borsten, die in Form kleiner schwarzer Punkte meist an den Ecken der Ommatidien lokalisiert sind.

(B) zeigt die höher gelegene Fokusebene. Zellen, vermutlich Photorezeptorzellen, treten durch die linsen-sezernierenden Zellen nach oben hin aus den Ommatidien aus.

4.1.5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse der Cobaltsulfidfärbungen:

Bei Betrachtung der Ergebnisse aller Färbungen lassen sich zwei Feststellungen für alle Kreuzungen treffen: Zum einen lassen sich zwischen den Gal4^{sev}- und GMR-Gal4-Kreuzungen keine erheblichen Unterschiede der Phänotypen feststellen. Die beobachteten Defekte sind in GMR-Gal4-Kreuzungen oft ein wenig stärker, und durch eine uneinheitliche Rotation der Linsen-sezernierenden Zellen wirkt die Anordnung aller Zellen dieser Imaginalscheiben unregelmäßiger. Die grundlegenden Veränderungen und Defekte sind jedoch dieselben. Das Gleiche gilt für UAS-crb^{intra}- und UAS-crb^{MINIGEN}-Konstrukte, deren Phänotypen sich qualitativ ebenfalls nicht auffällig voneinander unterscheiden.

Zum anderen handelt es sich bei den gefundenen Veränderungen hauptsächlich um zwei Defekte, die in unterschiedlicher Stärke allein oder in Kombination auftreten:

- Ektopische (primäre, sekundäre und tertiäre) Pigmentzellen und Borsten, verbunden mit einer veränderten Anordnung dieser Zellen
- Ektopische linsensezernierende Zellen sowie Veränderungen, die möglicherweise auf veränderte Adhäsion zurückzuführen sind.

Die unterschiedliche Stärke der rauen Augenphänotypen ist zum einen von der relativen Stärke dieser beiden Arten von Defekten abhängig, einzeln oder zusammen auftretend, zum anderen aber auch davon, wie viele Ommatidien des Auges von ihnen betroffen sind.

Imaginalscheiben von Tieren aus Kreuzungen mit UAS-crb^{intra}ΔERLI zeigen, wie in allen anderen Untersuchungen zuvor, die schwächsten Phänotypen. Diese beruhen überwiegend auf wenigen zusätzlichen interommatidialen Pigmentzellen und selten auf ektopischen oder verdoppelten Borsten. Die regelmäßige hexagonale Organisation, welche im Wildtyp zu finden ist, verschiebt sich hierdurch leicht. Veränderungen, die auf Defekten in der Adhäsion basieren könnten, sind nicht zu beobachten.

Imaginalscheiben von Tieren aus Kreuzungen mit UAS-crb^{intra}38.1.2b, UAS-crb^{intra}38.1.4a, UAS-crb^{intra}Y₁₀E₁₆ und UAS-crb^{MINI}30.1.4b zeigen ebenfalls eine Vervielfachung der Pigmentzellen und Borsten in unterschiedlichem Umfang sowie eine abnorme Organisation der Pigmentzellen. In Kreuzungen mit schwachen Effektorstämmen, wie bei UAS-crb^{intra}38.1.2b, zeigen sie eine sternförmige Anordnung. Hierbei ordnen sich vier interommatidiale Pigmentzellen um eine Borste herum an und vier dieser „Sterne“ bilden die Ecken von fast quadratischen Ommatidien.

In den Kreuzungen mit den stärkeren Effektorlinien UAS-crb^{intra}38.1.4a und UAS-crb^{intra}Y₁₀E₁₆ fällt die Anordnung variabler aus, da zum einen mehr interommatidiale Pigmentzellen vorhanden sind und zum anderen eine erhöhte Anzahl primärer Pigmentzellen und Linsen-sezernierender Zellen für Störungen des quadratischen Musters sorgt.

Kreuzungen mit UAS-crb^{intra}38.1.4a, UAS-crb^{intra}Y₁₀E₁₆ und UAS-crb^{MINI}30.1.4b zeigen Veränderungen, die möglicherweise auf Adhäsionsdefekten beruhen.

4.1.6 Untersuchung des Zelltods in der Augenimaginalscheibe des 3. Larvalstadiums und pupaler Imaginalscheiben

Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen der adulten UAS-*crumbs*-Überexpressionsphänotypen sowie Cobaltsulfidfärbungen an pupalen Imaginalscheiben zeigen, dass es durch die Überexpression im Auge zu einer Vervielfachung der Borsten kommt sowie zu einer Veränderung des wildtypischen hexagonalen Musters. Querschnitte durch das Auge legen, zumindest basierend auf der Analyse der Gal4^{sev}-Kreuzungen, die Vermutung nahe, dass die Photorezeptorzellen des Auges sowie die dazugehörigen Rhabdomere nicht direkt von Defekten betroffen sind. Statt dessen sind die Pigmentzellen vervielfacht beziehungsweise abnormal organisiert. Dies trifft auch auf die Linsen-sezernierenden Zellen und primären Pigmentzellen zu, die in den Kreuzungen mit den stärkeren Effektorlinien verdoppelt sein können.

Eine mögliche Erklärung für diesen Phänotyp wäre, dass durch die Überexpression der transgenen UAS-*crumbs*-Konstrukte der während der Larval- und Pupalentwicklung auftretende Zelltod im Auge unterdrückt wird. In den entsprechenden Imaginalscheiben wären hierdurch zu viele Zellen vorhanden, die sich zu ektopischen Borsten oder Pigmentzellen entwickeln könnten.

Um diese Hypothese zu testen, wurde untersucht, ob bereits im Larvalstadium in den späten L3 - Augenimaginalscheiben, Veränderungen des wildtypischen Zelltodes zu beobachten sind. Die Imaginalscheiben dieser Kreuzungen wurden direkt nach der Färbung mit Fluoreszenzlicht am AxioPhot ausgewertet. Zum Vergleich wurden Imaginalscheiben rein wildtypischer Fliegen und Imaginalscheiben von Fliegen des Treiberstammes (Gal4^{sev}) herangezogen, wobei diese beiden Linien allerdings keinen Unterschied aufwiesen. Die von Zelltod betroffenen Regionen der Imaginalscheiben sowie der Umfang von Zellen, die der Apoptose unterliegen, sind bei Tieren der Linie Gal4^{sev} und des Wildtyps vergleichbar.

Neben normalen Imaginalscheiben wurden auch mit Röntgenstrahlen behandelte untersucht. Diese verursachen in den Zellen der Imaginalscheibe Schäden an der DNA, an Proteinen und Lipiden (Ashburner, 1989). Zusätzlich zu den Untersuchungen larvaler Augenimaginalscheiben wurden unbestrahlte pupale Imaginalscheiben von Tieren untersucht, in welchen einige der UAS-*crb*-Transgene überexprimiert worden waren. Die pupalen Imaginalscheiben (im Stadium des pupalen Zelltods) wurden ebenfalls mit Acridin-Orange auf Zelltod hin untersucht um festzustellen, ob die Unterdrückung des Zelltods allein den ersten Zelltodschritt in den larvalen Imaginalscheiben betrifft, oder ob Überexpression von UAS-*crb* auch den zweiten Zelltod-Schritt während der Pupalentwicklung beeinflusst. Der dritte Schritt, in dem die Randommatidien („*Perimeter Cluster*“) am Rand der pupalen Imaginalscheiben eliminiert werden, wurde nicht untersucht, da in den Cobaltsulfid-

Färbungen der Kreuzungen keine solchen Ommatidien mehr gefunden wurden. Dies bedeutet, dass der dritte Zelltodschrift offensichtlich von der Überexpression nicht betroffen ist.

4.1.6.1 Zelltod in wildtypischen larvalen Augenimaginalscheiben

Unter der Kontrolle von Gal4^{sev} und GMR-Gal4 werden die transgenen UAS-*crumbs*-Konstrukte spezifisch in der Augen-Imaginalscheibe, nicht aber in der damit verbundenen Antennen-Imaginalscheibe exprimiert. Somit sollten Veränderungen, wenn sie durch *crumbs*-Überexpression ausgelöst werden sollten, nur im Augenanteil der Doppelscheibe zu beobachten sein. Die Antennen-Imaginalscheiben vom Wildtyp und Tieren, in deren Augen transgene UAS-*crumbs*-Konstrukte überexprimiert worden waren, sollten bestrahlt oder unbestrahlt, eine vergleichbare Menge an Zelltod aufweisen.

Die Antennenscheibe dient somit als interne Kontrolle, die zeigt, ob eine beobachtete Veränderung des Zelltods in Imaginalscheiben glaubwürdig ist, oder ob sie auf technischen Artefakten beruht.

In Abb 4.20 A ist der im Wildtyp beobachtete Verlauf des Zelltods schematisch dargestellt. Die Imaginalscheiben sind so ausgerichtet, dass das mit dem larvalen Gehirn verbundene posteriore Ende der Scheibe links liegt, das anteriore Ende, das in die kleinere Antennenscheibe übergeht, rechts. Die morphogenetische Furche wandert von posterior (links) nach anterior (rechts) über die Imaginalscheibe. Das Schema zeigt die Zonen, in denen der natürliche, programmierte und der induzierte, ektopische Zelltod einen Teil der überschüssigen Zellen eliminieren.

In der unbestrahlten larvalen Imaginalscheibe (4.20 B) lassen sich zwei Regionen erkennen, in denen Zelltod stattfindet. Zum einen tritt natürlicher Zelltod in einer breiten Zone hinter der morphogenetischen Furche (links) auf, in der Region, wo die durch Zellproliferation entstandenen Zellen spezifiziert werden und danach beginnen, sich entsprechend ihres späteren Schicksals als ommatidiale Vorläufer anzuordnen. Zum anderen tritt Zelltod in geringem Maße vor der morphogenetischen Furche auf, anfangs vor allem im Randbereich der Scheibe, später in einem durchgehenden Bereich vor der Furche. Die morphogenetische Furche selbst (gekennzeichnet durch Pfeilköpfe) ist frei von Zelltod. Die leicht gestauchte Antennenscheibe ist gestrichelt gekennzeichnet und weist wie die Augenimaginalscheibe Zelltod auf.

In der bestrahlten Imaginalscheibe (4.20 C), in der durch Röntgenbestrahlung ektopischer Zelltod ausgelöst wurde, erkennt man ein vergleichbares Muster, wenngleich stärker als im Wildtyp. Zelltod ist sowohl hinter als auch vor der morphogenetischen Furche zu beobachten. Die Furche selbst ist auch hier frei von Zelltod. Die etwas außerhalb der Fokusebene liegende Antennenscheibe zeigt ebenfalls mehr abgestorbene Zellen.

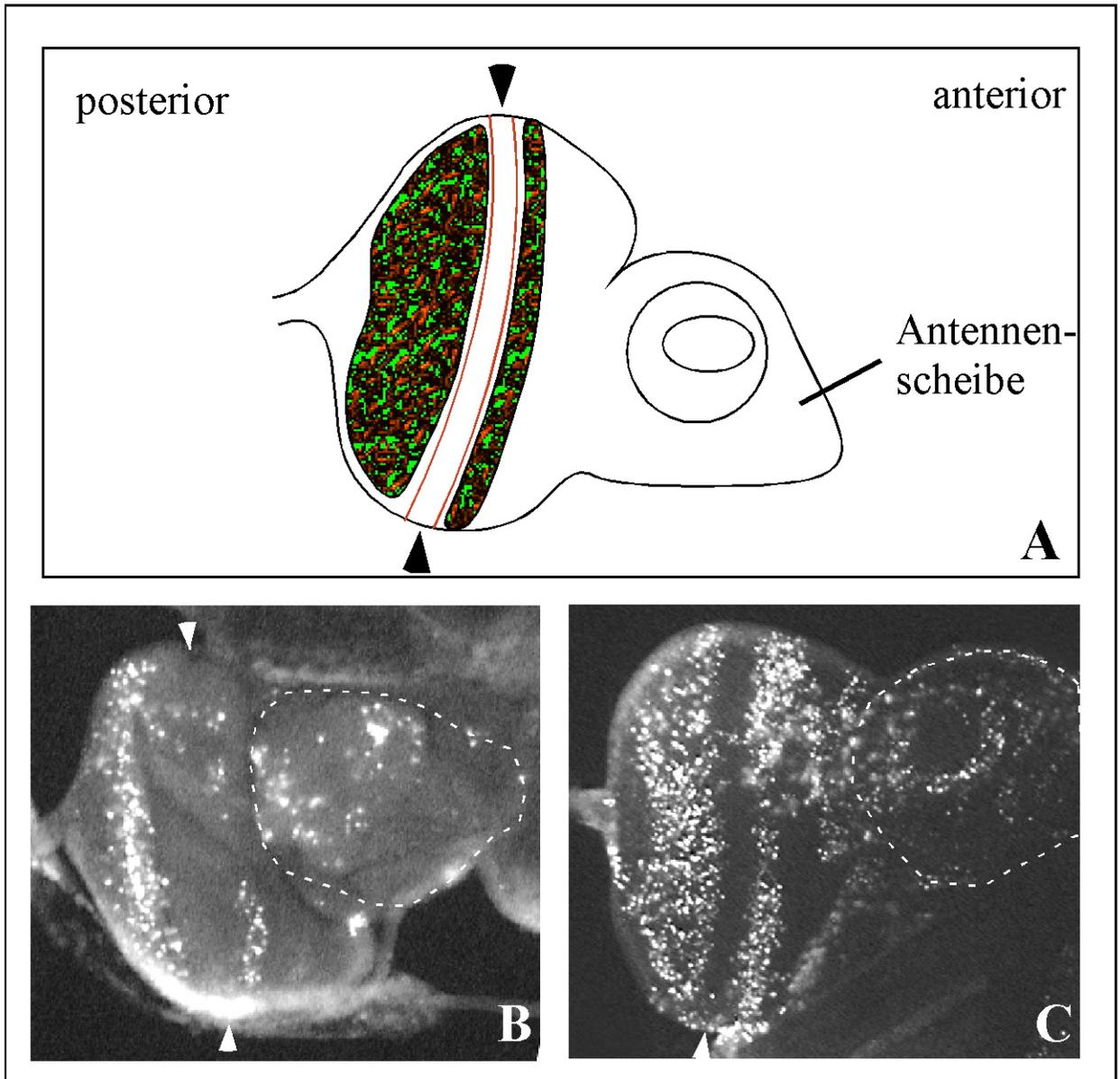


Abb. 4.20: Zelltod in wildtypischen L3-Augenimaginalscheiben

Die Imaginalscheiben sind so ausgerichtet, dass das mit dem larvalen Gehirn verbundene posteriore Ende der Scheibe links liegt, das anteriore Ende, das in die kleinere Antennenscheibe übergeht, rechts. Die morphogenetische Furche (in A gekennzeichnet als Zelltod-freie Region zwischen den beiden roten Linien, in B und C gekennzeichnet durch zwei Pfeilköpfe) wandert von posterior (links) nach anterior (rechts) über die Imaginalscheibe.

(B) In unbestrahlten Scheiben tritt programmierter Zelltod in zwei Zonen auf: hinter der morphogenetischen Furche, wo Zellen der ommatidialen Vorläufer spezifiziert und angeordnet werden, und vor der morphogenetischen Furche, anfangs vor allem im Randbereich der Scheibe, später in einem durchgehenden Bereich vor der Furche. Die morphogenetische Furche selbst ist Zelltod-frei.

(C) In bestrahlten Scheiben bleibt das wildtypische Muster bestehen, verstärkt sich jedoch in beiden Regionen vor und hinter der Furche.

Die Antennen-Anteile der beiden Imaginalscheiben sind gestrichelt markiert und weisen beide Zelltod auf, in bestrahlten Scheiben erhöht.

Zelltod tritt somit im Wildtyp in beiden Gruppen von Imaginalscheiben, bestrahlten und unbestrahlten, in identischen Regionen auf, nur wird die Anzahl betroffener Zellen durch die Bestrahlung in diesen Regionen erhöht.

Augen adulter Tiere, in deren Imaginalscheiben durch Bestrahlung ektoptischer Zelltod erzeugt wurde, zeigen einen sehr schwach rauhen Augenphänotyp (keine Abbildung).

4.1.6.2 Auswirkungen von ektoptischer *crumbs*-Expression auf den Zelltod in larvalen (L3-)Augenimaginalscheiben

Abb 4.21 - 4.23 zeigen die Analyse des Zelltods bei der Überexpression unterschiedlicher UAS-*crumbs*-Konstrukte unter der Kontrolle von Gal4^{sev} bzw. GMR-Gal4, bestrahlt und unbestrahlt im Vergleich zum Wildtyp (jeweils A und B jeder Abbildung).

4.1.6.2.1 Überexpression der transgenen Konstrukte UAS-*crb*^{intra} und UAS-*crb*^{intra}Y₁₀E₁₆ führt zur Unterdrückung des Zelltods posterior zur morphogenetischen Furche.

Im Vergleich zum Wildtyp ist bei Überexpression der drei Konstrukte UAS-*crb*^{intra}38.1.2b, UAS-*crb*^{intra}38.1.4a und UAS-*crb*^{intra}Y₁₀E₁₆ unter der Kontrolle von Gal4^{sev} in der Augenimaginalscheibe ein vom Wildtyp abweichendes Muster zu erkennen: Unbestrahlte Scheiben (4.21 E, 4.22 C und 4.22 E) zeigen in allen drei Fällen eine starke Reduktion des natürlichen Zelltods hinter der morphogenetischen Furche. Normalerweise ist die Position der Furche zwischen den beiden Zelltod-Zonen leicht auszumachen. In diesen unbestrahlten Imaginalscheiben jedoch ist die Furche nur anhand der zwei Einbuchtungen am Rand der Imaginalscheibe, bzw. an dem vor der Furche einsetzenden Zelltod zu erkennen. Zwischen den unbestrahlten Imaginalscheiben der drei Kreuzungen ist im Bezug auf den natürlichen, programmierten Zelltods kein Unterschied zu sehen.

In den bestrahlten Scheiben (4.21 F, 4.22 D und 4.22 F) bleibt die Induktion des ektoptischen Zelltods vor der morphogenetischen Furche erhalten. Hinter der Furche, wo die drei UAS-*crb*^{intra}-Konstrukte exprimiert werden, wird der Zelltod jedoch in unterschiedlichem Maße unterdrückt.

Während bei Überexpression von UAS-*crb*^{intra}38.1.2b (4.22 D), der schwächeren der beiden UAS-*crb*^{intra}-Effektorlinien, noch Zelltod hinter der morphogenetischen Furche zu beobachten ist, der induzierte, ektoptische Zelltod also nicht vollständig unterdrückt werden konnte, so kommt es bei der Überexpression von UAS-*crb*^{intra}38.1.4a (4.22 F), der stärkeren der beiden Effektorlinien, fast zu einem vollständigen Verlust des induzierten Zelltods hinter der Furche. UAS-*crb*^{intra}Y₁₀E₁₆ zeigt ebenfalls eine Unterdrückung des ektoptischen Zelltods, stärker als bei Überexpression von UAS-*crb*^{intra}38.1.2b, schwächer jedoch als UAS-*crb*^{intra}38.1.4a.

Da dies mit der beobachteten Stärke der phänotypischen Veränderungen (vergleiche 4.1, rasterelektronenmikroskopische Analysen) korreliert, ist anzunehmen, dass eine Unterdrückung des Zelltods und spätere pupale/adulte Augenphänotypen in einem Zusammenhang stehen und die Unterdrückung des Zelltods in der L3- Imaginalscheibe zumindest teilweise für den späteren adulten Phänotyp verantwortlich ist.

4.1.6.2.2 **Überexpression des transgenen Konstruktes UAS-crb^{intra} ΔERLI liefert ein fast wildtypisches Zelltodmuster**

Analyse des Zelltods von Imaginalscheiben aus einer Kreuzung mit Gal4^{sev} x UAS-crb^{intra}ΔERLI zeigt ein dem Wildtyp vergleichbares Muster (Abb 4.21 C-D). Im unbestrahlten Zustand (4.21 C) erkennt man posterior und anterior der morphogenetischen Furche natürlichen, programmierten Zelltod. Während das Signal vor der Furche mit dem des Wildtyps vergleichbar ist, ist es hinter der morphogenetischen Furche im Vergleich zum Wildtyp leicht abgeschwächt.

Die Färbungen der bestrahlten Imaginalscheiben (4.21 D) zeigen ein vergleichbares Ergebnis. Wie bei der unbestrahlten Scheibe ist ektopischer Zelltod zu beobachten, der sowohl vor, als auch hinter der morphogenetischen Furche auftritt. Die Anzahl betroffener Zellen vor der Furche ist mit der des Wildtyps vergleichbar, während sie hinter der Furche etwas geringer ist.

Die Überexpression von Gal4^{sev} x UAS-crb^{intra}ΔERLI in der Augenimaginalscheibe hat also nur sehr geringe Auswirkungen auf den natürlichen oder den ektopisch induzierten Zelltod.

4.1.6.2.3 **Überexpression von UAS-crb^{intra} und UAS-crb^{intra}Y₁₀E₁₆ unter der Kontrolle von Gal4^{sev} und GMR-Gal4 resultiert in einem nahezu identischen Muster**

Im Rahmen der Zelltod-Analysen wurden vor allem die Gal4^{sev} x UAS-crb^{intra} Kreuzungen untersucht. Um festzustellen, ob die entsprechenden Kreuzungen mit GMR-Gal4 vergleichbare Auswirkungen auf den Zelltod im Auge haben, wurden die Kreuzungen GMR-Gal4 x von UAS-crb^{intra}38.1.2b und GMR-Gal4 x UAS-crb^{intra}Y₁₀E₁₆ ebenfalls auf Zelltod hin untersucht.

Abb 4.23 zeigt einen Vergleich der Kreuzungen Gal4^{sev} x UAS-crb^{intra}38.1.2b (C und D) und GMR-Gal4 x UAS-crb^{intra}38.1.2b (F). Die Resultate stimmen miteinander überein. In der unbestrahlten Scheibe ist der natürlich auftretende Zelltod hinter der morphogenetischen Furche beider Imaginalscheiben stark reduziert. In bestrahlten Imaginalscheiben ist der ektopische Zelltod vor der morphogenetischen Furche noch klar zu erkennen, hinter der Furche ist er jedoch ebenfalls stark reduziert. Entsprechend verhalten sich die Kreuzungen mit UAS-crb^{intra}Y₁₀E₁₆ (ohne Abbildung).

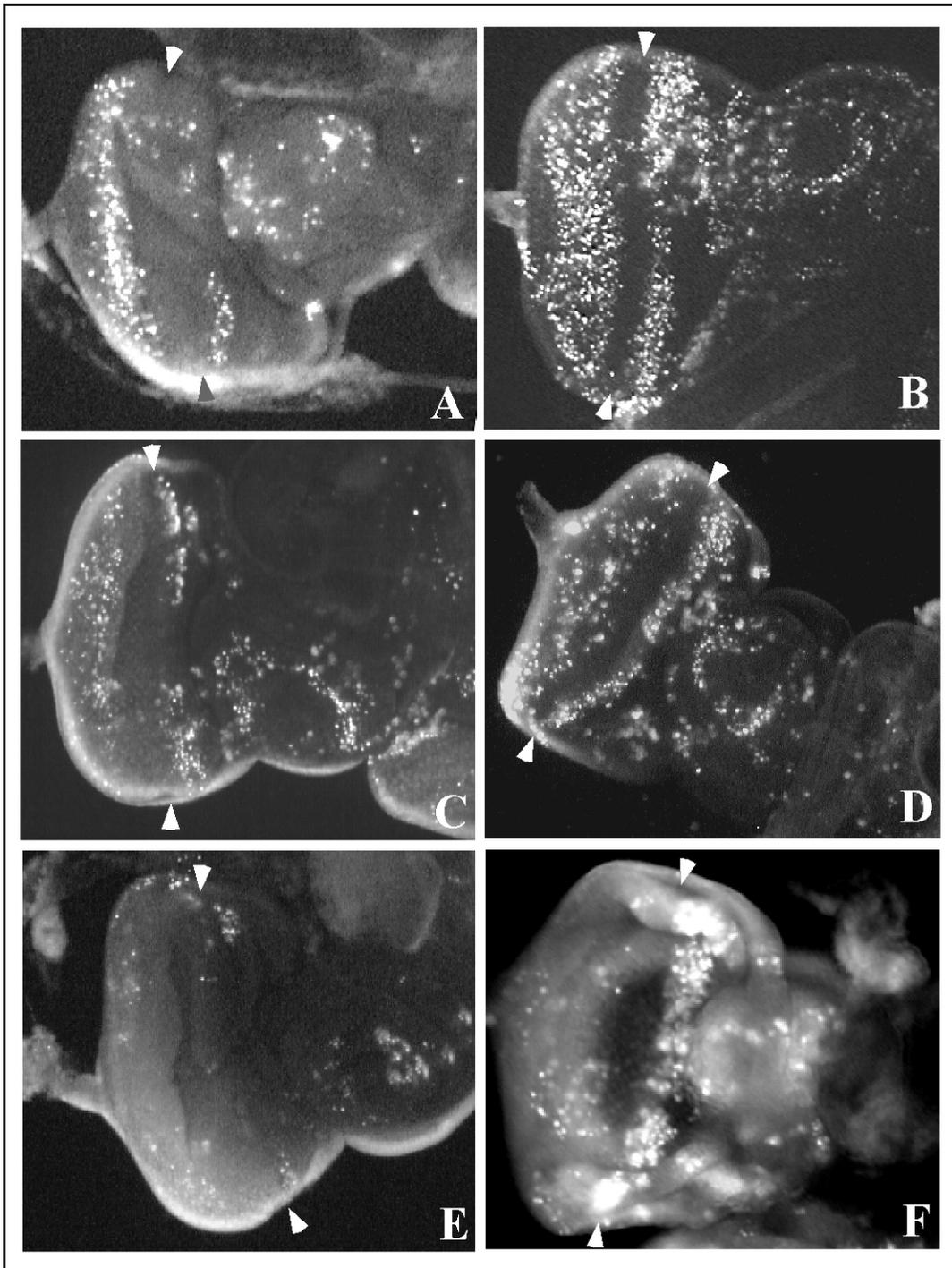


Abb. 4.21: Zelltod in L3-Scheiben der Kreuzungen $Gal4^{sev} \times UAS-crb^{intra}\Delta ERLI$ (C/D) und $Gal4^{sev} \times UAS-crb^{intra}Y_{10}E_{16}$ (E/F) im Vergleich zum Wildtyp (A/B). Die linke Spalte (A/C/E) zeigt die unbestrahlten Imaginalscheiben, die rechte Reihe (B/D/F) die bestrahlten Scheiben. Die morphogenetische Furche ist durch zwei weiße Pfeilköpfe gekennzeichnet. (C) Der natürliche Zelltod der unbestrahlten Scheibe der $UAS-crb^{intra}\Delta ERLI$ -Kreuzung ist vergleichbar mit dem des Wildtyps, der Zelltod hinter der Furche wurde leicht reduziert. (E) Die unbestrahlte Scheibe der $UAS-crb^{intra}Y_{10}E_{16}$ -Kreuzung zeigt eine nahezu völlige Unterdrückung des natürlichen Zelltods hinter der Furche, während in den Randbereichen vor der Furche noch Zelltod zu erkennen ist. (D) Das Zelltodmuster in bestrahlten Scheiben der $UAS-crb^{intra}\Delta ERLI$ -Kreuzung gleicht weitgehend dem Wildtyp und ist hinter der Furche nur leicht abgeschwächt. (F) In bestrahlten Scheiben der $UAS-crb^{intra}Y_{10}E_{16}$ -Kreuzung wird der Zelltod hinter der Furche jedoch weitgehend unterdrückt, vor der Furche ist er jedoch noch normal vorhanden.

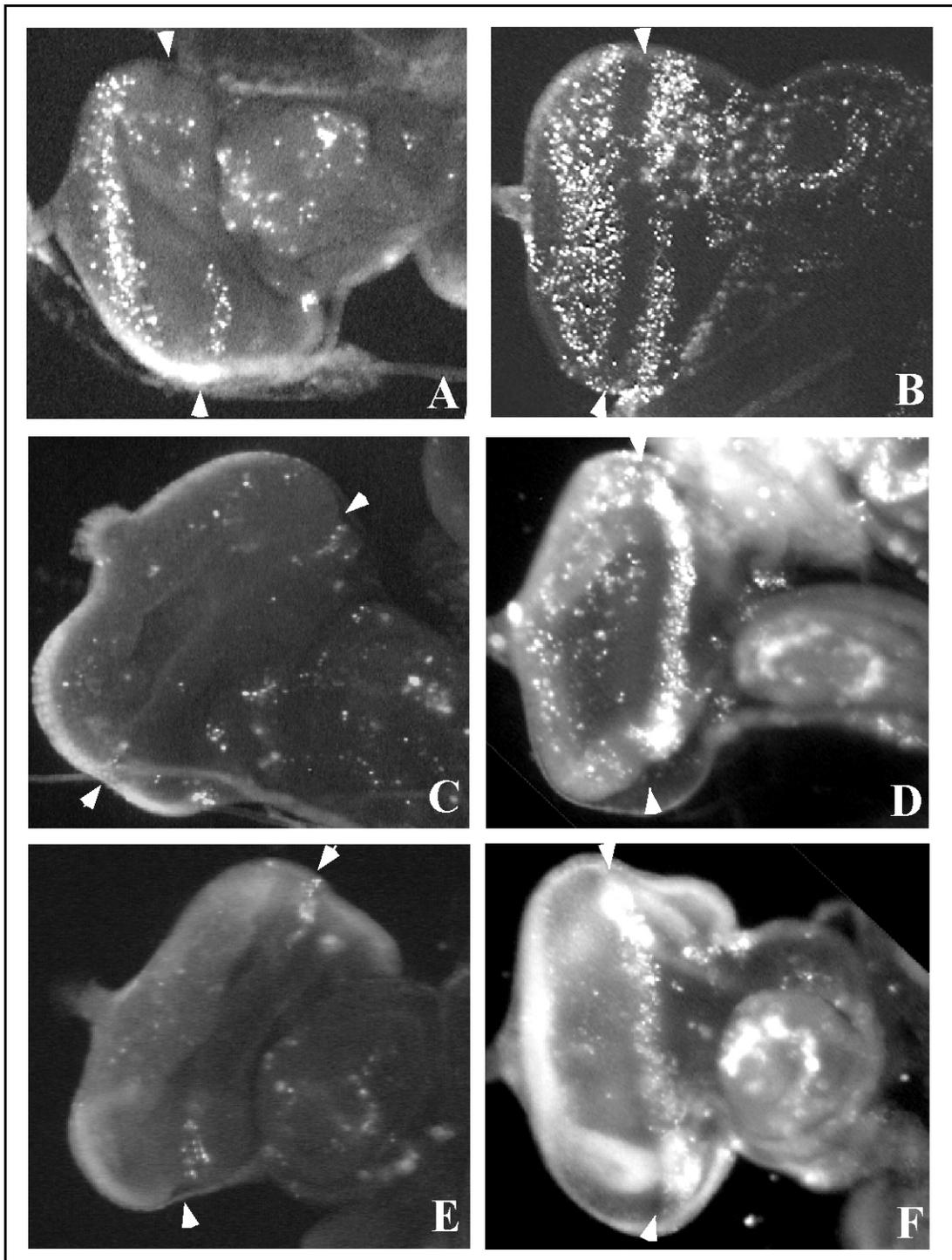


Abb. 4.22: Zelltod in L3-Scheiben der Kreuzungen $Gal4^{sev} \times UAS-crb^{intra38.1.2b}$ (C/D) und $Gal4^{sev} \times UAS-crb^{intra38.1.4a}$ (E/F) im Vergleich zum Wildtyp (A/B). Die linke Spalte (A/C/E) zeigt die unbestrahlten Imaginalscheiben, die rechte Reihe (B/D/F) die bestrahlten Scheiben. Die morphogenetische Furche ist durch zwei weiße Pfeilköpfe gekennzeichnet.

(C/E) Die unbestrahlten Scheiben zeigen beide eine Unterdrückung des natürlichen Zelltods hinter der morphogenetischen Furche. In den Randbereichen vor der morphogenetischen Furche bleibt er jedoch bestehen.

(D/F) In bestrahlten Scheiben wird der ektopisch induzierte Zelltod hinter der Furche ebenfalls reduziert, während der vor der Furche bestehen bleibt. Während bei $UAS-crb^{intra38.1.2b}$ jedoch noch Reste von induziertem Zelltod zu sehen sind, eliminiert $UAS-crb^{intra38.1.4a}$ den Zelltod hinter der Furche fast vollständig.

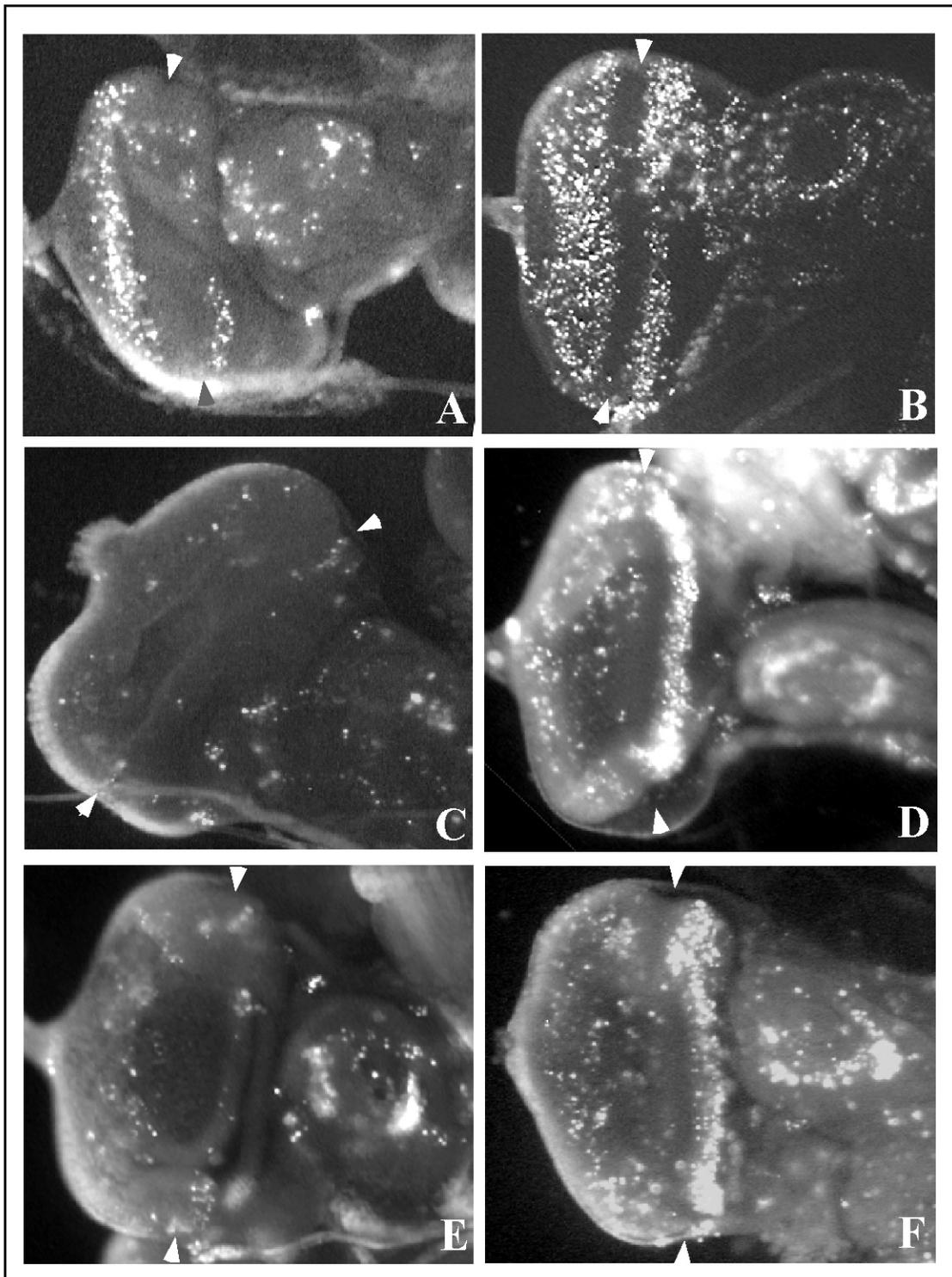


Abb. 4.23: Vergleich des Zelltods in L3-Scheiben der Kreuzungen $Gal4^{sev} \times UAS-crb^{intra38.1.2b}$ (C/D) und $GMR-Gal4 \times UAS-crb^{intra38.1.2b}$ (E/F)

Verglichen mit dem Wiltytp (A/B) zeigen bestrahlte und unbestrahlte Scheiben der beiden Kreuzungen ein nahezu identisches Muster. Der hinter der morphogenetischen Furche auftretende natürliche Zelltod wird in unbestrahlten Scheiben (C/E) fast vollständig und der ektopische Zelltod in bestrahlten Scheiben (D/F) teilweise unterdrückt. Der Zelltod vor der morphogenetischen Furche bleibt im Vergleich zum Wildtyp unverändert.

Diese Ergebnisse und die Tatsache, dass die Gal4^{sev} und GMR-Gal4-Überexpressions-Kreuzungen auch in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen vergleichbar starke Phänotypen zeigten, lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Konstrukte unter der Kontrolle beider Treiberlinien vergleichbar reagieren, selbst wenn die Zelltod-Untersuchungen nicht für alle vorhandenen Linien durchgeführt wurden.

Ob die Tatsache, dass GMR-Gal4 prozentual in mehr Zellen des sich entwickelnden Auges exprimiert wird als Gal4^{sev}, einen entscheidenden Unterschied bei der Unterdrückung des Zelltods macht, lässt sich aufgrund der vorhandenen Befunde nicht eindeutig beantworten.

4.1.6.3 Auswirkungen von ektopischer *crumbs*-Expression auf den natürlichen programmierten Zelltod pupaler Augenimaginalscheiben

Um festzustellen, ob neben dem larvalen Zelltod auch der zweite im mittleren Pupalstadium (zwischen ca. 23-38% der Pupalentwicklung) betroffen ist, wurden zeitlich synchronisierte, unbestrahlte pupale Imaginalscheiben von Tieren, in deren Augen *crumbs* ektopisch exprimiert wurde, mit Hilfe von Acridin-Orange-Färbungen auf Zelltod hin untersucht.

Da für eine Acridin-Orange-Färbung Imaginalscheiben nicht fixiert und nur kurz in der Färbelösung inkubiert werden, lassen sich die Imaginalscheiben nur selten vom darunterliegenden Gehirn freipräparieren, ohne dass sie dabei schwer beschädigt werden.

Die beobachteten Imaginalscheiben wurden daher für diesen Versuch nur von der Seite aufgenommen (vgl. Schema Abb. 4.24) und nicht in der Aufsicht. Daher ist nur etwa die Hälfte der Imaginalscheibe zu sehen. Ob Zelltod vorhanden ist oder unterdrückt wird, ist allerdings auch in dieser Lage zu beurteilen.

Wie für den Wildtyp bereits in anderen Arbeiten beschrieben, wurde auch hier ein regelmässiges Zelltodmuster gefunden, das sich über die gesamte pupale Imaginalscheiben erstreckte (Abb. 4.25 A-B). Untersucht wurde, ob dieses Muster in Imaginalscheiben, in denen *crumbs* ektopisch exprimiert wurde, ebenfalls zu beobachten ist, oder ob durch die Überexpression der Zelltod, wie in larvalen Imaginalscheiben, unterdrückt wird. Im Vergleich zum Wildtyp wurden pupale Imaginalscheiben der Kreuzungen Gal4^{sev} x UAS- *crb*^{intra}38.1.2b, UAS- *crb*^{intra}38.1.4a und UAS- *crb*^{intra}Y₁₀E¹⁶ untersucht. Da bereits zuvor gezeigt werden konnte, dass in diesen Kreuzungen ektopische Expression von *crumbs* den Zelltod in larvalen Augenimaginalscheiben unterdrücken kann, erschienen sie für einen Test auch in der pupalen Imaginalscheibe geeignete Kandidaten zu sein.

In Abbildung 4.25 sind zwei wildtypische Scheiben (A-B) sowie je zwei pupale Imaginalscheiben der drei getesteten Kreuzungen zu sehen. Das Gehirn, dem die Imaginalscheibe aufliegt, liegt hierbei in den meisten Bildern unten oder unten links (vgl. Schema 4.24).

In keiner der untersuchten Scheiben der drei Kreuzungen wird der Zelltod vollkommen unterdrückt.

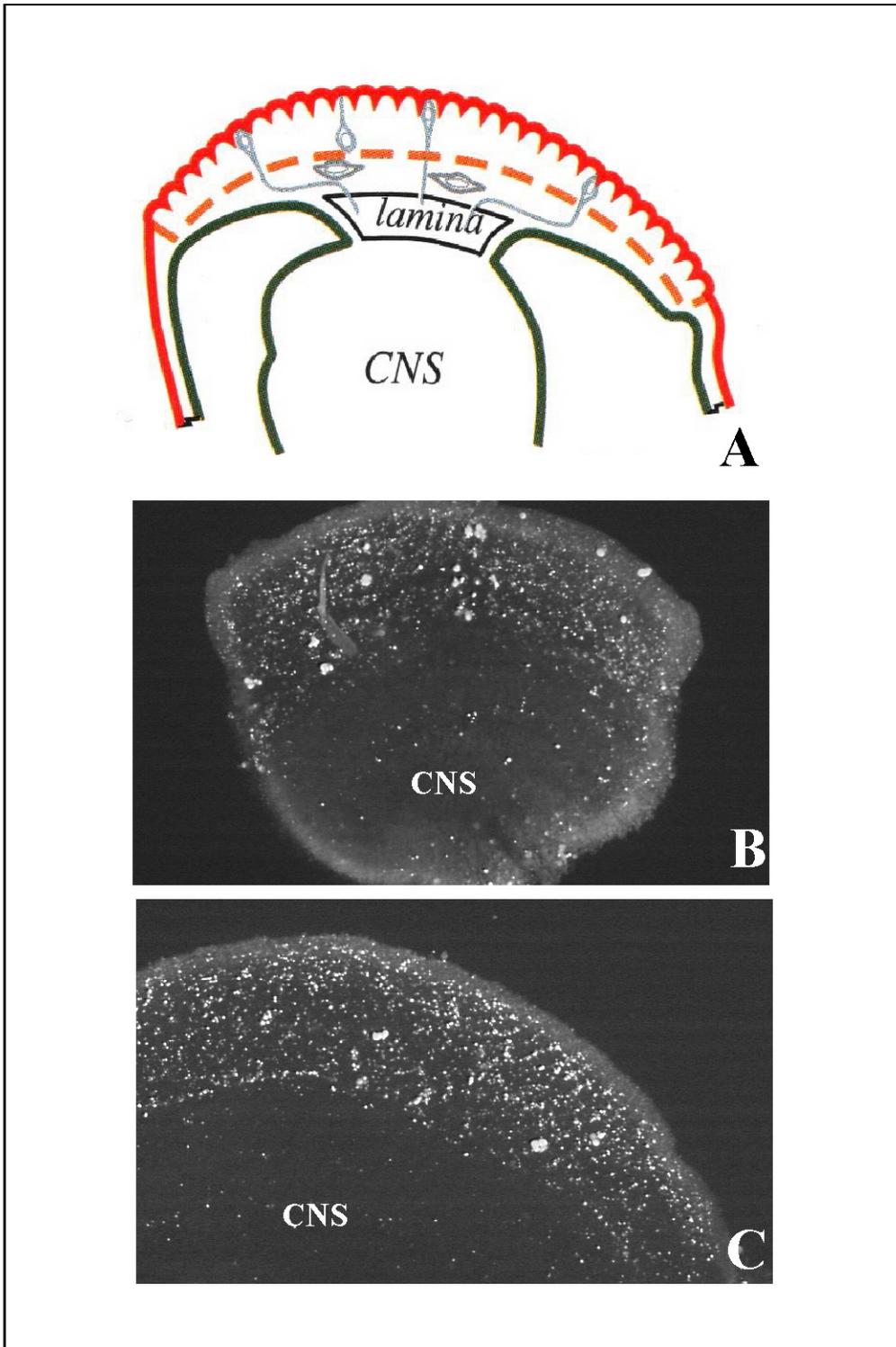


Abb. 4.24: Zelltod in pupalen Augenimaginalscheiben des Wildtyps

Die pupale Imaginalscheibe (A, schematische Darstellung, B/C Acridinorange-Färbungen), die dem darunterliegenden Gehirn aufliegt, wurde für diesen Versuch von der Seite und nicht in der Aufsicht aufgenommen, so dass nur ein Teil der Imaginalscheibe zu sehen ist. Beide Imaginalscheiben weisen ein regelmäßiges Muster auf. Details siehe Text. Abb. A übernommen aus Cagan und Ready, 1989a.

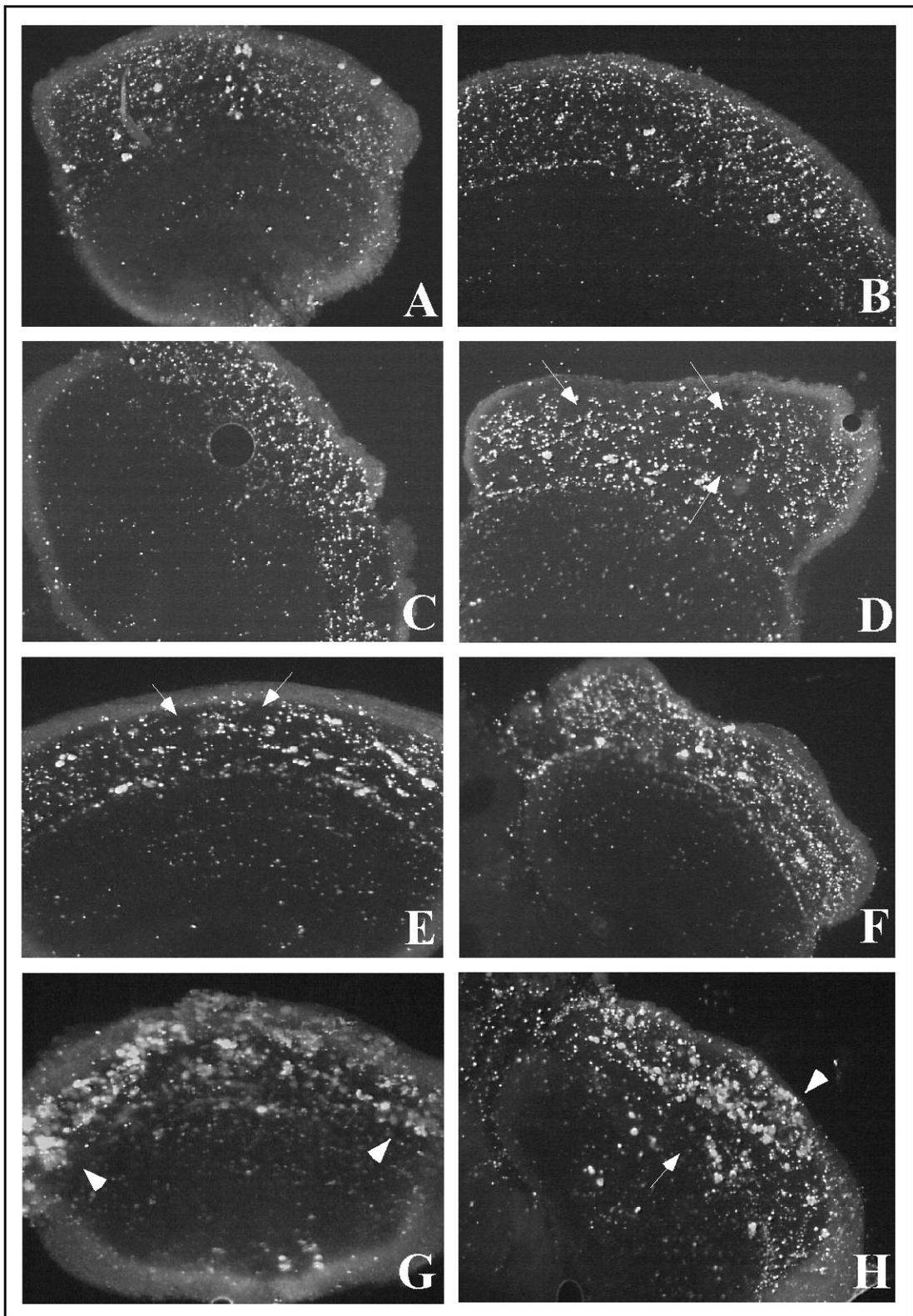


Abb. 4.25: Zelltod in pupalen Augenimaginalscheiben des Wildtyps verglichen mit Imaginalscheiben, in denen drei UAS-*crb*-Konstrukte unter der Kontrolle von Gal4^{sev} ektopisch exprimiert wurden

(A/B) Wildtyp, (C/D) Gal4^{sev} x UAS-*crb*^{intra38.1.2b}, (E/F) Gal4^{sev} x UAS-*crb*^{intraY10E16} und (G/H) Gal4^{sev} x UAS-*crb*^{intra38.1.4a}. Wie in Abb. 4.24A wurden die Imaginalscheiben von der Seite aufgenommen. Zonen erhöhten Zelltods in G/H sind mit Pfeilköpfen markiert, Regionen, in denen Zelltod reduziert wird, mit Pfeilen. Details siehe Text.

Allerdings unterscheidet sich der Umfang des Zelltods in Abhängigkeit von den verwendeten Effektorlinien. Mit zunehmender Stärke des Effektors nimmt die Anzahl betroffener Zellen ab, wobei hiervon die Regionen der Imaginalscheiben nicht gleichmässig betroffen sind. Man findet ein unregelmässiges Muster von ungefärbte Abschnitten (markiert mit einem Pfeil), in denen der Zelltod unterdrückt wird, während gleichzeitig an anderen Stellen gefärbte Zellen Zelltod signalisieren.

Neben dieser Reduktion im Umfang des natürlichen Zelltods zeigen vor allem Tiere mit Gal4^{sev} x UAS-crb^{intra} 38.1.4a (G-H) und in schwächerem Maße auch Gal4^{sev} x UAS-crb^{intra}Y₁₀E₁₆ zusätzliche Signale, die man als große helle Flecken in den Imaginalscheiben beobachten kann (Abb 4.25 G-H, markiert durch einen Pfeilkopf). Man findet diese verstärkten Signale außer in der Scheibe in erhöhtem Maße im Bereich der Basallamina (an den gezeigten Abbildungen von Imaginalscheiben nicht zu erkennen).

Das Auftreten dieser Signale könnte zwei mögliche Gründe haben. Zum einen wäre es aufgrund der veränderten Morphologie der Scheibe möglich, dass sich Pigmentzellen, die zu einem bestimmten Prozentsatz dem natürlichen Zelltod unterworfen sind, fehlerhaft an bestimmten Stellen konzentrieren. Eine stärkere Konzentration ektopischer Pigmentzellen würde zu stärkeren Signalen führen.

Außerdem zeigen diese beiden Kreuzungen in pupalen Scheiben und adulten Augen Defekte der Linsen-sezernierenden Zellen bzw. der Linsen selbst, gefolgt von möglicherweise nekrotischen Defekten. Bei den stark gefärbten Regionen könnte es sich daher auch um die später austretenden und absterbenden Zellen handeln. Die Frage, welche der beiden Möglichkeiten zutrifft, lässt sich jedoch aufgrund dieser Färbungen nicht eindeutig beantworten.

Zusammenfassung: Zelltoduntersuchungen an larvalen und pupalen Imaginalscheiben, in denen *crumbs* ektopisch exprimiert wurde:

Genotyp	Zelltod in unbestrahlten Imaginalscheiben (larval)	Zelltod in bestrahlten Imaginalscheiben (larval)	Zelltod in unbestrahlten Imaginalscheiben (pupal)
Wildtyp (CantonS)	wildtypisch	wildtypisch	wildtypisch
Gal4 ^{sev} (auf Chrom II)	wildtypisch	wildtypisch	wildtypisch
GMR-Gal4 II	wildtypisch	ungetestet	nicht getestet
UAS-crb ^{intra} 38.1.2b	wildtypisch	wildtypisch	nicht getestet
Gal4 ^{sev} x UAS-crb ^{intra} 38.1.2b	hinter der Furche reduziert	hinter der Furche reduziert	vorhanden, aber gestört und reduziert +
Gal4 ^{sev} x UAS-crb ^{intra} 38.1.4a	hinter der Furche reduziert	hinter der Furche reduziert	vorhanden, aber gestört und reduziert +++
Gal4 ^{sev} x UAS-crb ^{intra} ΔERLI	wildtypisch	wildtypisch	wildtypisch
Gal4 ^{sev} x UAS-crb ^{intra} Y ₁₀ E ₁₆	hinter der Furche reduziert	hinter der Furche reduziert	vorhanden, aber gestört und reduziert ++

Genotyp	Zelltod in unbestrahlten Imaginalscheiben (larval)	Zelltod in bestrahlten Imaginalscheiben (larval)	Zelltod in unbestrahlten Imaginalscheiben (pupal)
Gal4 ^{sev} x UAS-crb ^{MINI} 30.1.2e	nicht getestet	nicht getestet	nicht getestet
Gal4 ^{sev} x UAS-crb ^{MINI} 30.1.4b	nicht getestet	nicht getestet	nicht getestet
GMR-Gal4 x UAS-crb ^{intra} 38.1.2b	hinter der Furche reduziert	hinter der Furche reduziert	nicht getestet
GMR-Gal4 x UAS-crb ^{intra} 38.1.4a	nicht getestet	nicht getestet	nicht getestet
GMR-Gal4 x UAS-crb ^{intra} ΔERLI	nicht getestet	nicht getestet	nicht getestet
GMR-Gal4 x UAS-crb ^{intra} Y ₁₀ E ₁₆	hinter der Furche reduziert	hinter der Furche reduziert	nicht getestet
GMR-Gal4 x UAS-crb ^{MINI} 30.1.2e	nicht getestet	nicht getestet	nicht getestet
GMR-Gal4 x UAS-crb ^{MINI} 30.1.4b	nicht getestet	nicht getestet	nicht getestet

Tab. 4.7: Zusammenfassung der Ergebnisse der Zelltod-Untersuchungen

Ektopische Expression unterschiedlicher UAS-*crumbs*-Konstrukte in der L3-Augenimaginalscheibe resultiert im Vergleich mit dem Wildtyp in den meisten Fällen in einer Unterdrückung von Zelltod.

Die Überexpression der beiden UAS-crb^{intra} Konstrukte (38.1.2b und 38.1.4a) und ebenso UAS-crb^{intra}Y₁₀E₁₆, in dem die Aminosäuren Y₁₆ und E₁₆ der zytoplasmatischen Domäne mutiert worden sind, zeigen eine Reduktion des natürlichen und auch des ektopisch induzierten Zelltods. Diese Reduktion betrifft spezifisch die Region hinter der morphogenetischen Furche, in der die UAS-*crb*-Konstrukte unter der Kontrolle der Treiber exprimiert wurden. Der Effekt ist in diesem posterioren Bereich der larvalen Imaginalscheibe je nach UAS-Effektorlinie unterschiedlich stark und korreliert mit der Stärke der in den anderen Experimenten (4.1.1 - 4.1.3) beobachteten Phänotypen der entsprechenden Linien.

Im Gegensatz zu diesen drei Linien vermag die Expression des Konstruktes UAS-crb^{intra} ΔERLI, dem das C-terminale ERLI-Motiv fehlt, weder den natürlichen, noch den ektopisch induzierten Zelltod stark abzuschwächen. Der Bereich, in dem Zelltod auftritt, stimmt in der Lage mit dem des Wildtyps überein, quantitativ ist er jedoch etwas schwächer.

Dies legt die Vermutung nahe, dass die Unterdrückung des natürlichen und ektopisch induzierten Zelltods über den C-Terminus der zytoplasmatischen Domäne, d.h. über das ERLI-Motiv vermittelt wird. Überexpression von UAS-crb^{intra}ΔERLI, in dem dieses Motiv deletiert wurde, hat fast keinen Einfluss auf den Zelltod in der L3-Imaginalscheibe.

Überexpression des vollständigen UAS-*crb*^{intra}-Konstruktes oder von UAS-*crb*^{intra}Y₁₀E₁₆, in dem zwar Y₁₀ und E₁₆ mutiert wurden, in dem jedoch das ERLI-Motiv vorhanden ist, resultiert hingegen in einer Unterdrückung des natürlichen und ektopisch induzierten Zelltods hinter der morphogenetischen Furche. Hierbei macht es keinen Unterschied, ob die Konstrukte unter der Kontrolle von Gal4^{sev} oder GMR-Gal4 überexprimiert werden. Die Auswirkungen auf den Zelltod sind, soweit aufgrund der Acridin-Orange-Färbungen eindeutig zu beurteilen, identisch und in etwa gleich stark.

Später in den Semidünnschnitten der adulten Augen beobachtete Defekte und starke Unterschiede zwischen den Gal4^{sev}- und GMR-Gal4-Kreuzungen sind in den larvalen Augenimaginalscheiben noch nicht zu erkennen und treten erst später, vermutlich während der späten Pupalentwicklung, auf.

Auch in pupalen Imaginalscheiben, in denen *crumbs* ektopisch exprimiert wurde, lassen sich Unterschiede zum wildtypischen programmierten Zelltod beobachten. Allerdings sind hier die Auswirkungen weniger stark als in den larvalen Imaginalscheiben und keines der transgenen Konstrukte ist bei ektopischer Expression in der Lage, den pupalen Zelltod vollständig zu unterdrücken.

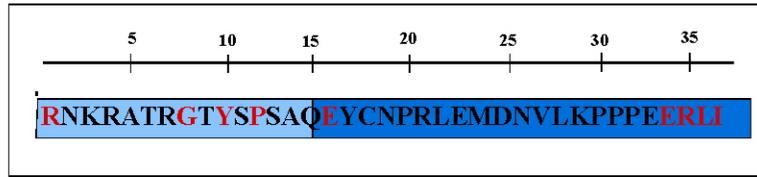
Die Stärke der beobachteten Veränderungen gegenüber dem Wildtyp ist jedoch auch hier abhängig von der Stärke der für die Kreuzung verwendeten Effektorstämme. Der Zelltod wird hierbei an bestimmten Stellen der Scheibe unterdrückt, während andere Bereiche Zelltod aufweisen. Zudem findet man starke Acridin-Orange-Signale, die auf ektopischen Zelltod hinweisen, der sich an bestimmten Stellen der Imaginalscheiben besonders stark konzentriert.

Diese Befunde lassen die Möglichkeit zu, dass *Crumbs* in pupalen Augenimaginalscheiben nicht direkt an der Unterdrückung des Zelltods beteiligt ist, sondern eventuell nur indirekt, d.h. über eine erhöhte Anzahl von Zellen, die während der Larvalentwicklung nicht eliminiert wurden und/oder eine abnorme Organisation der interommatidialen Pigmentzellen.

Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass die rauhen Augenphänotypen, die bei Überexpression transgener UAS-*crb* Konstrukte im Auge von *Drosophila* gefunden wurden, vermutlich vor allem durch eine Unterdrückung des larvalen sowie später auch des pupalen Zelltods hervorgerufen werden.

4.1.7 Zusammenfassende Darstellung der in 4.1 analysierten, durch *crb*-Überexpression im Auge von *Drosophila* induzierten Augenphänotypen

Im Folgenden sind die verwendeten transgenen UAS-*crb*-Konstrukte und die im Rahmen der Analyse gefundenen mutanten Phänotypen zusammenfassend graphisch dargestellt.



	Signalpeptid	Myc	Transm. Domäne	Cytoplasmatische Domäne		Unterdrückung von Zelltod in L3-Scheibe	Unterdrückung von Zelltod in pupaler Scheibe	Mehr Borsten, Linsen-sezernierende Zellen und Pigment	Adhäsive Defekte / Defekte der Linsen	Absterben von Ommatidien
Wildtyp						-	-	-	-	-
<i>crb</i> ^{intra} _{Y10E16} ΔERLI				A A		-	-	-	-	-
<i>crb</i> ^{intra} ΔERLI						(+)	-	(+)	-	-
<i>crb</i> ^{intra} _{38.1.2b}						+	-	+	-	-
Gal4 ^{sev} -38.1.2b GMR-38.1.2b (homozygot)						+	??	+	+	+
<i>crb</i> ^{intra} _{38.1.4a}						+	-	+	+	+
<i>crb</i> ^{intra} _{Y10E16}				A A		+	-	+	+	+
<i>crb</i> ^{MINI} _{30.1.4b}	Extrazelluläre Domäne					??	??	+	+	(+)

Abb. 4.26: Zusammenfassung der Ergebnisse der gefundenen UAS-*crb*-Überexpressionsphänotypen

Links oben ist die Sequenz der cytoplasmatischen Domäne von Crumbs dargestellt. In Y_{10E16} und ΔERLI wurden die markierten Aminosäuren mutiert bzw. deletiert. In der Tabelle sind die jeweiligen Ergebnisse mit Plus und Minus gekennzeichnet. (+) bedeutet, dass die jeweiligen Phänotypen zwar beobachtet wurden, diese allerdings nur sehr schwach und kaum vom Wildtyp zu unterscheiden sind. (??) bedeutet, dass die entsprechenden Versuche bislang nicht durchgeführt wurden.

Ektopische Expression von transgenen UAS-*crb*-Konstrukten greift in die wildtypischen Entwicklungsprozesse im Auge ein und resultiert in rauen Augenphänotypen. Die unterschiedliche Stärke dieser Phänotypen ist abhängig von zwei Faktoren: a) von den für die Kreuzungen verwendeten Treibern und b) von der Domänenstruktur und der Stärke der verwendeten transgenen Konstrukte.

Eine Überexpression der transgenen Konstrukte unter der Kontrolle von *elav*-Gal4 in den Photorezeptoren des sich entwickelnden Auges ist nicht in der Lage, veränderte Phänotypen hervorzurufen. Überexpression unter der Kontrolle von Gal4^{sev} in Photorezeptoren und Linsen-sezernierenden Zellen oder unter der Kontrolle von GMR-Gal in allen sich entwickelnden Zellen resultiert in veränderten Phänotypen.

Die rauen Augenphänotypen scheinen zudem massgeblich vom C-terminalen ERLI-Motiv von Crumbs abhängig zu sein. Fehlt dieses, so kommt es bei Überexpression des entsprechenden Konstruktes nur zu sehr schwachen Defekten. Hingegen zeigt die Überexpression eines Konstruktes, in dem die N-terminalen Y₁₀E₁₆-Domäne mutiert wurde, verglichen mit dem wildtypischen *crb*^{intra} keine offensichtlichen Unterschiede. Möglicherweise ist zudem die extrazelluläre Domäne von Crumbs in der Lage, eine Schwarzfärbung der durch Linsendefekte geschädigten Ommatidien zu unterbinden und hierdurch ein mögliches Absterben der Ommatidien zu verhindern.

Überexpression von *crumbs* hat während der Larval- oder Pupalentwicklung einen Einfluss auf die Bildung von Linsen-sezernierenden Zellen und primären Pigmentzellen, was zur Bildung einer zusätzlichen Linsen-sezernierenden Zelle bzw. einer zusätzlichen primären Pigmentzelle pro Ommatidium führen kann (z.B. Abb 4.16 C). Die Bildung der zusätzlichen Pigmentzellen ist jedoch unabhängig von der (erhöhten) Anzahl Linsen-sezernierender Zellen.

Zusätzlich wird der natürliche Zelltod in larvalen Imaginalscheiben hinter der morphogenetischen Furche unterdrückt, so dass die Imaginalscheiben mit allen unspezifizierten interommatidialen Zellen in die Pupalentwicklung eintreten (Abb 4.21 E; Abb 4.22 C und E). Die folgende pupale (zweite) Zelltodphase findet zwar auch bei Überexpression von Crumbs statt, sie ist jedoch je nach ektopisch exprimiertem Konstrukt im Vergleich zum Wildtyp abgeschwächt und unterschiedlich stark gestört. Eine Reduktion zusätzlich vorhandener interommatidialer Zellen kann somit nur unvollkommen stattfinden. In Cobaltsulfid-Färbungen der pupalen Augenimaginalscheiben ist daher eine erhöhte Anzahl von sekundären und tertiären Pigmentzellen sowie Borsten zu finden (z.B. Abb 4.14 und 4.18). Zusätzlich kann es in pupalen Imaginalscheiben zu Defekten der Linsen-sezernierenden Zellen kommen, die möglicherweise auf Veränderungen der Adhäsivität beruhen. Sie weichen auseinander, und durch das entstehende Loch treten bislang nicht genauer bestimmte Zellen, möglicherweise die Photorezeptorzellen, aus.

Die dritte Zelltodphase, in der die ‚Perimeter-Cluster‘ eliminiert werden, ist von der Überexpression von *crumbs* nicht betroffen, die überschüssigen Ommatidien werden wie im Wildtyp eliminiert.

Wie in den pupalen Scheiben findet man in den Semidünnschnitten der adulten Augen eine erhöhte Anzahl von Pigmentzellen, die entweder direkt zu sehen sind (Abb. 4.9 G-H oder 4.11 A) oder auch nur indirekt aus dem quadratischen Muster der Ommatidien und Pigmentzellen abzuleiten sind, das auf den zu „Sternen“ angeordneten ektopischen Pigmentzellen basiert (Abb. 4.9 C-D). In Gal4^{sev}-Kreuzungen sind Morphologie und Anordnung der Photorezeptorzellen und Rhabdomere meist intakt, wengleich in Kreuzungen mit starken Effektorlinien (UAS-crb^{intra}38.1.4a) teilweise sekundäre Defekte zu beobachten sind.

In GMR-Gal4-getriebenen Kreuzungen hat die ektopische Expression von crb^{intra} vermutlich eine direkte Auswirkung auf die Morphologie der Photorezeptorzellen und Rhabdomere (Abb. 4.10 C-D; 4.11 A). Augen adulter Tiere, in denen UAS-crb ektopisch exprimiert wurde, weisen eine erhöhte Anzahl von Borsten auf. Die Anordnung ihrer Linsen ist unregelmäßig und spiegelt die Organisation der pupalen Imaginalscheibe wieder. In Kreuzungen, in denen die pupalen Imaginalscheiben ein Aufbrechen der Linsen und ein Austreten von Zellen aus den Ommatidien zeigten, weisen auch die adulten Augen ein Kollabieren der Linsen auf. In den meisten Fällen färben sich die so geschädigten Ommatidien schwarz und werden möglicherweise nekrotisch.

Überexpression von UAS-crb^{intra}ΔERLI zeigt im Gegensatz zur Überexpression der anderen UAS-crb-Konstrukte diese Phänotypen nicht oder in sehr abgeschwächter Form. In Kreuzungen mit diesem transgenen Konstrukt ist der Umfang des larvalen Zelltods im Gegensatz zum Wildtyp nur sehr leicht verringert, so dass die Imaginalscheibe mit einer fast wildtypischen Anzahl zusätzlicher interommatidialer Zellen in die Pupalentwicklung eintritt. Die Anwesenheit dieser überzähligen Zellen verursacht später die Ausprägung zusätzlicher Borsten und interommatidialer Pigmentzellen, die das Auge sehr schwach rauh erscheinen lassen. In allen anderen Punkten der Entwicklung unterscheiden sich Augen dieser Kreuzung nicht vom Wildtyp.

4.2 Suche nach Modifikatoren eines Crumbs-induzierten „rauhem“ Augenphänotyps („Modifier Screen“)

Wie in der Einleitung genauer beschrieben, sind bereits einige Komponenten (Sdt, Dlt, β H-Spectrin, DMoesin) bekannt, die zusammen mit Crumbs an der Bildung des subapikalen Komplexes (SAC) mitwirken bzw. Crumbs mit dem apikalen Spektrinzytoskelett verbinden, und somit an der Aufrechterhaltung der *zonula adherens* und der Erhaltung der Zellpolarität ektodermaler Gewebe beteiligt sind. Bislang unbeantwortet ist jedoch die Frage nach dem genauen Zusammenhang zwischen Crumbs und der eigentlichen Etablierung der Zellpolarität bzw. der Bildung und Aufrechterhaltung der *zonula adherens*, denn bislang sind beispielsweise keine Komponenten oder Mechanismen bekannt, die Crumbs selbst apikal lokalisieren. Diese bislang unbekannt Komponenten gilt es zu ermitteln.

Generell gibt es verschiedene Möglichkeiten, solche unbekannt Komponenten zu identifizieren, z.B. mit Hilfe eines „Two-Hybrid-Screens“ mit den Komponenten des SAC als „Köder“ (engl. ‚*bait*‘). In einem solchen Screen kann in der Hefe als artifiziellem Test-System die Interaktion von bekannten Proteinen getestet werden, oder es können mit einem Teil eines bereits bekannten Proteins als „Köder“ unbekannt Bindungspartner „geangelt“ werden. Eine andere Möglichkeit stellt ein sogenannter ‚*Pulldown Essay*‘ dar, in dem zunächst der Subapikale Komplex mit daran gebundenen Interaktionspartnern und später diese Interaktionspartner isoliert werden und schließlich durch eine Sequenzierung identifiziert werden.

„Nachteil“ dieser beiden Versuchsansätze ist, dass man mit ihrer Hilfe zwar weitere Komponenten identifizieren kann, die direkt an Crumbs oder den subapikalen Komplex binden, man erhält aber keine Informationen über großräumige genetische Interaktionen und damit über Komponenten, die nur indirekt mit Crumbs interagieren. Ebenso wenig geben die beiden Methoden Aufschluss über eine Interaktion der gefundenen Komponenten mit Crumbs *in vivo*.

Unter Berücksichtigung dieser Aspekte und mit dem Ziel, neue mit *crumbs* interagierende Gene zu identifizieren, wurde in dieser Arbeit als Ansatz die Methode des sogenannten „Modifier-Screens“ gewählt. Hierbei handelt es sich um eine Methode, welche erstmalig zur Identifikation von Faktoren angewandt wurde, welche direkt mit *sevenless* interagieren oder indirekt mit ihm in einer gemeinsamen Interaktionskaskade wirken (Simon et al., 1991). Auch in anderen Fällen konnten mit Hilfe dieser Methode neue Faktoren verschiedener bekannter Genkaskaden identifiziert werden (z.B. Zhang et al., 1999; Greaves et al., 1999; Tanenbaum et al., 2000; Therrien et al., 2000).

Generell wird in einem solchen Screen nach Mutanten von Genen gesucht, welche in der Lage sind, einen mutanten dominanten Phänotyp zu modifizieren (vgl. Methoden 3.2.5)

Das Gen *crumbs* weist bei Überexpression im Auge einen rauhen Augenphänotyp auf, der sich durch Kreuzung mit Mutationen von *crumbs* modifizieren bzw. in diesem Falle abschwächen lässt. Der gleiche Effekt tritt bei Mutationen von Genen auf, die mit *crumbs* funktionell interagieren, wobei je nach Art der Interaktion der gefundenen Gene mit *crumbs* der Überexpressionsphänotyp verstärkt oder abgeschwächt werden kann. Die Mutanten agieren somit als Enhancer (Verstärker) oder Suppressoren (abschwächende Faktoren) des *crumbs*-induzierten dominanten Augenphänotyps.

Es handelt sich bei diesem Screen also um ein artifizielles System, das empfindlich auf Konzentrationsveränderungen von Genprodukten reagiert und in welchem zum einen Mutationen bereits bekannter Gene getestet und auf Interaktion mit *crumbs* hin untersucht werden können. Außerdem ist es möglich, unbekannte Mutanten auf eine Modifikation hin zu testen und so neue funktionelle Interaktionspartner von *crumbs* zu identifizieren.

Für den Modifier-Screen wurden mit Hilfe von Rekombination zwei rauhäugige Linien erzeugt, GMR-Gal4-*crb*^{intra}38.1.2b und Gal4^{sev}-*crb*^{intra}38.1.2b („142“, zur Verfügung gestellt von A. Klebes), die als Ausgangslinien für den Screen eingesetzt wurden und gegen die die jeweiligen zu testenden Mutationen gekreuzt wurden. Eine ektopische Expression der intrazelluläre Domäne (Konstrukt UAS-*crb*^{intra}38.1.2b) von *crumbs* verursacht in beiden Fällen, wie schon in Kapitel 4.1 ausführlich beschrieben, in einem mittelstarken rauhen Augenphänotyp (vgl. Abb. 4.26 für eine Übersicht der transgenen UAS-*crb*-Konstrukte).

4.2.1 Ergebnisse des „Modifier Screens“

4.2.1.1 „Modifier Screen“ mit Gal4^{sev}-*crb*^{intra} 38.1.2b

Für einen ersten Screen war eine Rekombinationslinie der Stämme Gal4^{sev} und UAS-*crb*^{intra}38.1.2b erzeugt worden. Gal4^{sev}-*crb*^{intra} 38.1.2b („142“) weist einen mittelstark rauhen Augenphänotyp auf. Ältere Augen homozygoter Tiere zeigen zudem nekrotische Defekte einzelner Ommatidien.

Diese Linie wurde mit einer Kollektion von P-Element induzierten Mutantenen (EP-Linien, P. Roehrt, 1993; zur Verfügung gestellt von A. Ephrussi) sowie dem „Defizienzen-Kit“ (in 4.2.1.2 näher beschrieben) aus Bloomington gekreuzt, um Mutationen zu identifizieren, die den rauhen Augenphänotyp modifizieren können. Allerdings war die Ausbeute des Screens gering, die Modifikation des rauhen Augenphänotyps sehr schwach, und es wurde zudem festgestellt, dass die verwendete Rekombinante eine zusätzliche Mutation trug.

Schnitte von Augen dieser Linie zeigten (Bilder nicht gezeigt), dass diese Mutation in der Bildung zusätzlicher R7-Zellen resultiert, ein Effekt, der in Augen von keiner der untersuchten UAS-*crb*-Kreuzungen beobachtet werden konnte (vgl. 4.1).

Bereits früher wurde gezeigt, dass Veränderungen in der Anzahl der R7-Zellen einen rauhen Augenphänotyp hervorrufen können (Simon et al., 1991).

Schnitte modifizierter Augen zeigten, dass Modifikatoren, die in diesem ersten Screen identifiziert worden waren, maßgeblich den R7-Phänotyp modifizieren. Gleichzeitig aber zeigten Cobaltsulfidfärbungen von pupalen Augenimaginalscheiben dieses Stammes zusätzliche Pigment- und Linsen-sezernierende Zellen (ohne Abbildung), und in L3-Scheiben konnte eine Unterdrückung des Zelltods beobachtet werden, was weitgehend mit den in anderen Kreuzungen gefundenen „normalen“ Phänotypen ektopischer *crumbs*-Expression im Auge übereinstimmt. Da also nicht eindeutig bestimmt werden konnte, welchen der beiden Phänotypen die gefundenen Mutanten modifizierten, wurde der Modifier-Screen mit einem anderen, stärker rauhäugigen Stamm und einer anderen Fliegen-Kollektion wiederholt.

4.2.1.2 Modifier-Screen mit GMR-Gal4-crb^{intra}38.1.2b und dem „Defizienzen-Kit“

Mit Hilfe von Rekombination zwischen GMR-Gal4 und UAS-crb^{intra}38.1.2b wurde der Stamm GMR-Gal4-crb^{intra}38.1.2b etabliert. Er zeigt einen mittelstark rauhen Augenphänotyp (vgl 4.1.1). Der Stamm ist nur heterozygot lebensfähig. Selten schlüpfende homozygote Tiere sind kleiner als ihre heterozygoten Artgenossen, zeigen einen sehr stark rauhen Augenphänotyp und sterben in der Regel nach etwa ein oder zwei Tagen.

Stamm GMR-Gal4-crb^{intra}38.1.2b wurde mit den Linien des sogenannten „Defizienzen-Kits“ gekreuzt. Hierbei handelt es sich um eine vom Fliegen-Stockcenter in Bloomington zusammengestellte Defizienzen-Kollektion, die zusammen etwa 70-80% des Genoms von *Drosophila* abdecken. Zusätzlich wurden mir weitere Linien mit Defizienzen auf dem dritten Chromosom (ebenfalls aus der Bloomington-Kollektion) von C. Klämbt zur Verfügung gestellt. Eine komplette Liste dieser Linien, zusammen mit den von der Bloomington-Internet-Seite angegebenen Bruchpunkten der Defizienzen, befindet sich im Anhang.

Die F1-Generation der Kreuzungen wurde mit dem Stereomikroskop auf Modifikationen des rauhen Augenphänotyps hin analysiert und die im Rahmen des Screens gefundenen Modifikatoren wurden in verschiedene Klassen eingeteilt.

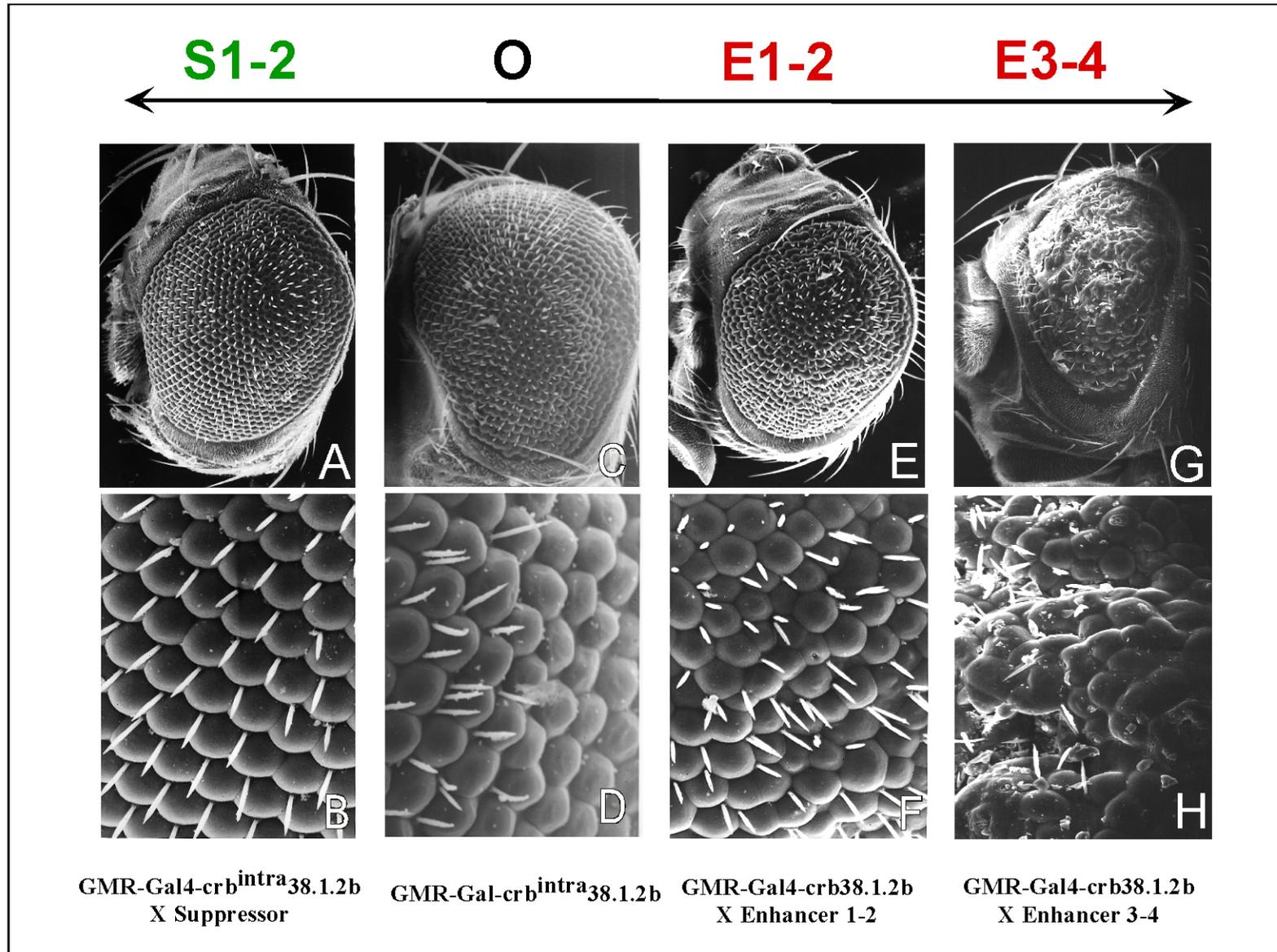


Abb. 4.27: Übersicht der im Rahmen des Modifier-Screens gefundenen Modifier unterschiedlicher Stärke

C-D zeigt die Ausgangssituation, in der Skala mit "0" bezeichnet. Dieser Phänotyp kann sowohl positiv (A-B, Suppressor S1-2) als auch negativ (E-H, Enhancer E1-4) beeinflusst/modifiziert werden, wobei S2 und E4 die jeweils stärksten Suppressoren bzw. Enhancer bezeichnen.

Abb. 4.27 stellt eine Übersicht der möglichen Phänotypen dar. GMR-Gal4-crb^{intra}38.1.2b (= Abb. 4.3 C-D), in der Skala über den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen mit „0“ bezeichnet, zeigt den Ausgangsphänotyp. Dieser Phänotyp lässt sich sowohl positiv als auch negativ modifizieren. Bilder A-B zeigen eine Kreuzung von GMR-Gal4-crb^{intra}38.1.2b mit einer als Suppressor agierenden Defizienz. Das Auge weist einen sehr viel regelmäßigeren Phänotyp auf als der Ausgangsstamm und nähert sich optisch dem Wildtyp an. Linien, die als Suppressoren wirkten, wurden in meinem Screen mit „S“ (Suppressor) bezeichnet, und je nach Stärke mit S1 oder S2 bezeichnet. S2 ist hierbei der stärkere Suppressor, dessen modifizierter Phänotyp dem Wildtyp am nächsten kommt. Das gleiche gilt für die gefundenen Enhancer (Abb. 4.27, E-H). Da hier die Variabilität grösser als bei den Suppressoren war, wurden die Enhancer in vier Klassen (E1-4) eingeteilt, von denen E4 der stärkste ist. In der folgenden Tabelle und den darauf folgenden schematischen Abbildungen sind die gefundenen, als Suppressor oder Enhancer agierenden Regionen aller drei Chromosomen aufgelistet. Die Enhancer und Suppressoren wurden farblich markiert, die Zahlen geben die Stärke der jeweiligen Modifikatoren an. Die später im Embryo auf abschwächende Wirkung des mutanten *crumbs*-Phänotyps hin untersuchten Defizienzen (auf dem 1. und 2. Chromosom) wurden zusätzlich blau gekennzeichnet und die letztendlich genauer kartierten Regionen violett.

In einigen Fällen war es nicht möglich eindeutig zu bestimmen, ob die getestete Linie als Enhancer oder Suppressor wirkt. Wie zuvor bereits beschrieben (Methoden 3.3.5), wurde die Modifikation durch einen Vergleich der potentiell modifizierten Fliegen (Def/GMR-Gal4-UAS-crb^{intra}) mit einer Gruppe Fliegen ermittelt, in der das Überexpressionskonstrukt über einem Balancer-Chromosom vorlag (Bal/GMR-Gal4-UAS-crb^{intra}).

Das Balancer-Chromosom ist hierbei in den meisten Fällen durch eine dominante Mutation zu identifizieren, die als Marker dient. Die Linien, in denen eine Modifikation nicht eindeutig zu ermitteln war, wurden als Stamm zwar heterozygot über einem Balancer-Chromosom gehalten, jedoch war dieses nicht durch einen dominanten Marker gekennzeichnet, so dass in F1-Tieren der Kreuzungen zwar zwei Gruppen von Tieren mit rauhen Augen identifiziert werden konnten, aber nicht eindeutig bestimmt werden konnte, welche Gruppe welchem Genotyp entsprach.

Soweit wie möglich wurde versucht, die kleinste gemeinsame Region überlappender Defizienzen zu bestimmen (→), allerdings war das in einigen Fällen, speziell auf dem dritten Chromosom, wegen stark überlappender Defizienzen nicht möglich. Daher findet sich hier nur „???“ in der Tabelle. In diesen Fällen müssten weitere, kleinere Defizienzen näheren Aufschluss über die entsprechenden Regionen geben.

Bruchpunkte Chromosom 1	Stamm- Nr.	Name der Defizienz	Modifikator
01A1; 02A	1329	Df(1)BA1	-
01B2-14; 03A3	1546	Df(1)sc-J4	Enhancer 1
01B; 02A	1098	Df(1)AD11	-
→ 02A; 03A3			
02E1-2; 03C2	936	Df(1)64c18	Suppressor 0-1
02F6; 03C5	935	Df(1)JC19	Suppressor 0-1
03A1-2; 03A4-5	1517	Df(1)62g18	Suppressor 0-1
03A3; 03A4-6	721	Df(1)65j26	Suppressor 0-1
→ 03A3; 03A4-5			
03A4-6; 03C5-6	733	Df(1)w258-42	nicht eindeutig: 3 Klassen Weibchen treten auf: 2 x "normal rauh" (= GMR- Gal4-cr ^b ^{intra} "), mit unterschiedlichen Augenfarben und 1 x stark modifizierte Augen (Enhancer 5)
03A9-B1; 03C2-3	735	Df(1)w258-48	-
03B2-3; 03C2-3	902	Df(1)w258-45	Enhancer 1
03C2-3; 03E3-4	729	Df(1)N-8	-
03B6-7; 03D2-3	731	Df(1)N-264-105	Suppressor 1-2
03D6-E1; 04F5	940	Df(1)A113;	Enhancer 3
04C15-16; 05A1-2	944	Dp(1;2)w+64b	-
→ 03D6-E1;		Df(1)JC70	
04C15-16			
06E2; 07A6	3196	Df(1)Sxl-bt	Enhancer 1
07A2-3; 07C1	948	Df(1)ct-J4, In(1)dl-49	-
→ 06E2; 07A2-3			
07B2-4; 07C3-4	3221	Df(1)ct4b1	Enhancer 1
07D1; 07D5-6	2984	Df(1)C128	Enhancer 1
07D1; 07D5-6	949	Df(1)C128	Enhancer 4
07D10; 08A4-5	950	Df(1)RA2	Suppressor 1
09F; 10C3-5	3560	Df(1)v-N48	Enhancer 3-4
10A9; 10F6-7	957	Df(1)KA7	Enhancer 1-2
10C1-2; 11A1-2	959	Df(1)HA85	Suppressor 1
10C2-3; 10E1-2	728	Df(1)m259-4	Suppressor 1
10C2-3; 10E1-2	905	Df(1)m259-4	Suppressor 1
→ 10C2-3; 10E1-2			
10F1; 10F9-10	961	Df(1)RA47	Suppressor 1
10F7; 11D1	962		Suppressor 1
→ 10F7; 10F9-10			
11F10; 12F1	727	Df(1)g	-
12D2-E1; 13A2-5	998	Df(1)RK2	Enhancer 1
12F5-6; 13A9-B1	1039	Df(1)RK4	Enhancer 1
→ 12F5-6; 13A2-5			
13F1, 14B1	3347	Df(1)sd72b	Suppressor 0-1
14C2-4; 15B2-C1	993	Df(1)r-D1; Dp(1;4)r[+]	Enhancer 1
19F1-2; 20E-F	977	Df(1)DCB1-35b	-
20A-F	3714	Df(1)A209	Suppressor 1
→ ??			
21A01; 21B7-8	3638	Df(2L)net-PMF	Enhancer 3
21D1-2; 22B2-3	3084	Df(2L)ast2	Enhancer 1
22A2-3; 22D5-E1	3133	Df(2L)dp-79b	-
→ 21D1-2; 22A2-3			(Linie 3084 zeigt bereits einen rauhen Augenphänotyp, daher kann der verstärkte Phänotyp unecht sein)

Bruchpunkte Chromosom 2	Stamm- Nr.	Name der Defizienz	Modifikator
23C3-5; 23D1-2 23C; 23E3-6 → 23C3-5, 23D1-2	97 3573	Df(2L)JS32 Df(2L)23C;23E3-6	Enhancer 1 -
23D2, 23E3	4954	Df(2L)S2590	Suppressor 1
24C2-8; 25C8-9 25A5; 25E5 25D2-4; 26B2-5 25F-26A1; 26D3-11 → ???	693 3813 781 490	Df(2L)sc19-8 Df(2L)sc19-4 Df(2L)cl-h3 In(1)w[m4]; Df(2L)E110	Suppressor 2 Suppressor 2 Suppressor 1 Suppressor 1
27C2-9; 28B3-4 27D-E, 28C → 27C2-9; 27D-E	1357 3077	Df(2L)J-H Df(2L)spd	Suppressor 2 -
28E4-7; 29B2-C1	179	In(1)w[m4h], y[1]; Df(2L)TE29Aa-11	Suppressor 2
29C1-2; 30C8-9 30C1-2; 30F → 29C1-2; 30C1-2	2892 556	Df(2L)N22-14 Df(2L)s1402	Enhancer 2 -
30D-30F;31F	1045	Df(2L)Mdh	Da kein Balancer vorhanden, ist kann nicht bestimmt werden, ob der Stamm als E oder S wirkt: Enhancer 1 oder Suppressor 1
32F1-3; 33F1-3 33B2-3; 34 A1-2 → 33B2-3; 33F1-3	3079 3344	Df(2L)PrI Df(2L)prd1.7	Enhancer 1-2 Enhancer 1-2
34B12-C1; 35B10- C1 35B4-6; 35F1-7 35F-36A; 36D 36C2-4; 37B9-C1 36E4-F1; 38A6-7 → 35B4-C1 und 36C2-D	3138 3588 2583 420 3189	Df(2L)b87e25 Df(2L)TE35BC-24 Df(2L)cact-255rv64 Df(2L)TW137 Df(2L)TW50	Enhancer 3 Enhancer 3 Enhancer 4 Enhancer 1 Enhancer 2-3
41A-B; 42A2-3 41A 42A1-2; 42E6-F1 42B3-5; 43E15-18 42E; 44C → ???	749 739 1006/ 1007 1888 3368	In(2R)bw[VDe2L]Cy[R] Df(2R)M41A4 Df(2R)nap9 Df(2R)ST1 Df(2R)cn9	Enhancer 1 Enhancer 2 Enhancer 1 Enhancer 3 Kein Balancer vorhanden, Enhancer 1 oder Suppressor1
46F1-2; 47D1-2 47A; 47F 47D3; 48B2 48A3-4; 48C6-8 → ???	596 520 190 1145	Df(2R)stan2 Df(2R)E3363 Df(2R)en-A Df(2R)en30	- Suppressor 1 Enhancer 2 - (Linie 520 zeigt rauhen Augenphänotyp, daher kann der beobachtete Effekt als Enhancer fehlerhaft sein)
48E; 49A	4960	Df(2R)CB21	Enhancer 1
49A-B; 49D-E 49A4-13; 49E7-F1 49C1-4; 50C23-D2 → ???	1642 754 442	Df(2R)vg135 Df(2R)vg-C Df(2R)CX1	- Suppressor 1 Suppressor 0-1

Bruchpunkte Chromosom 2 und 3	Stamm- Nr.	Name der Defizienz	Modifikator
51B5-11; 51F5-13 51C3; 52F5-9 52F5-9; 52F10- 53A1 → ???	1150 3518 3520	Df(2R)knSA3 N[fa-g]; Df(2R)Jp1 N[fa-g]; Df(2R)Jp8	- Suppressor 0-1 Suppressor 0-1
54E8-F1; 55B9-C1 55A; 55F → 55B9-C1; 55F	3064 1547	Df(2R)Pcl7B Df(2R)PC4	- Suppressor 1
55E2-4; 56C1-11	757	Df(2R)P34	Enhancer 1
56F5; 56F15 56F9-11; 57D11-12 → 56F9-11; 57D11-12	543 3467	Df(2R)017 Df(2R)AA21	Suppressor 1 Suppressor 1
58A1-2; 58E4-10 oder 58B1-2; 58E1-4 57B4; 58B → ???	283 2606	Df(2R)X58-7 Df(2R)Pu-D17	- - Enhancer 1
59D5-10; 60B3-8 59D6-E1; 60C-D 60A3-7; 60B4-7 60C5-6; 60D9-10 60E2-3; 60E11-12 → 60C5-6; 60D9-10	1682 1587 4542 2604 2471	Df(2R)or-BR6 Df(2R)bw[VDe2L]Px[KR] Df(2R)Chi[g230] Df(2R)Px2 Df(2R)M60E	- Suppressor 1 - Suppressor 1 -
61A; 61D3 61C3-4; 61E 61C5-8; 62A8	2577 1479 439	Df(3L)jmc-E12 Df(3L)Ar11 Df(3L)Ar14-8	- Suppressor 0-1 -
62A7-B1; 62E6-F1 62F; 63D 63A1; 63D1 63A2-7; 63B9-10 63C1; 63D02 63C2; 63F7 63E1-2; 64B17 63E6-9; 64A8-9 63F4-7; 64B9-11 64A3; 64A6 63F4-7; 64C13-15 63-64 64C; 65C 65A; 65E → ????	X 3560 3647 49 3648 3649 3687 463 416 X7 3686 X9 3096 X10	Def (3L) Aprt-148 Df(3L)M21 Df(3L)HR370 Df(3L)HR218 Df(3L)HR232 Df(3L)HR119 Df(3L)GN50 Df(3L)GN34 Df(3L)GN19 Df(3L) C175 Df(3L)GN24 XXX Df(3L)ZN47 Df(3L)W5.4	Kein Balancer vorhanden (E1 oder S1) Kein Balancer vorhanden (E1 oder S1) Kein Balancer vorhanden (E1 oder S1) - - Enhancer 1 Suppressor 0-1 Suppressor 1 Suppressor 0-1 Suppressor 1 - Suppressor 2 Suppressor 0-1 -
66B1; 66B2	1520	Df(3L)pbl-NR	Suppressor 1
66B8-9; 66C9-10 66C7-10; 66C7-10 → 66C7-10	1541 209	Df(3L)66C-G28 Df(3L)66C-I65	Suppressor 1 Suppressor 1
66F5; 66F5 66F5; 67B1 67A2; 67D7-13 or 67A5; 67D9-13 → 66 F5 (;67A1)	1688 2479 977	Df(3L)Rdl-2 Df(3L)29A6 Df(3L)AC1	Suppressor 1 Suppressor 1 - -

Bruchpunkte Chromosom 3	Stamm- Nr.	Name der Defizienz	Modifikator
67E1-2; 68C1-2 67F2-3; 68D6 68A2-3; 69A1-2 → 67F2-3; 68A2-3	89 2547 -	Df(3L)lxd6 Df(3L)vin2	Suppressor 1 Suppressor 1 -
68A2-3; 69A1-2 68B1-3; 68F3-6 68C5-6; 68E3-4 68C8-11; 69A4-5 68C8-11; 69B4-5 68E; 69A1 → ???	2611 A/B 2610 2609 2553 2612 2991	Df(3L)vin5 Df(3L)vin4 Df(3L)vin3 Df(3L)vin6 Df(3L)vin7 Df(3L)BK9	- Suppressor 1 Suppressor 1 Suppressor 1 Suppressor 1 Suppressor 1
70C1-2; 70D4-5 70C6-15; 70E4-5 70D1-2; 70E7 70D2-3; 71E4-5 → ???	3124 3125 3123 3126	Df(3L)fz-GF3b Df(3L)fz-GS1a Df(3L)fz-D21 Df(3L)fz-M21	- Suppressor 1 - -
71F1-4; 72D1-10 71F3-5; 72D12 72C1-D1; 73A3-4 72D1-2; 73A9-10 72D1-5 72D10-11; 73D1-2 → ???	3640 3641 2993 3201 3342 197	Df(3L)brm11 Df(3L)th102 Df(3L)st-f13 Df(3L)st-g24 Df(3L)th117 Df(3L)st-b11	Enhancer 1 Enhancer 1 - (roe = rauhägiger Balancer) Enhancer 1 (roe= rauhägiger Balancer) Enhancer 1 (roe= rauhägiger Balancer) -
75A6-7; 75C1-2 75B8; 75F1 75B10; 75C1-2 75C1-2 → ???	2608 2990 2607 1576	Df(3L)W10 Df(3L)Cat Df(3L)W4 Df(3L)H99	Suppressor 1 Kein Balancer vorhanden (E1 oder S1) Enhancer 2 Suppressor 1
76A3; 76B2 76B1-2; 76D5 → 76B1-2	3000 3617	Df(3L)VW3 Df(3L)kto2	Suppressor 1-2 -
79F; 80A	4370	Df(3L)Delta1AK	Suppressor 1
81F3-6; 82F5-7 81F; 82F10-11 82D; 82F3-6 → ???	1518 3688 339	Df(3R)ME15 Dp(3;1)2-2 Df(3R)6-7	- Suppressor 1 Suppressor 1
83C1-2; 84B1-2 83D1-2; 84A4-5 84A5; 84B1 84A4-5; 84C2-3 84A5; 84B1 84A6-B1; 84D4-D9 84B1-2; 84D11-12 or 84A6; D14 84B2; 84D3 84B3; 84D1-2 84C1-3; 84E1 84C8-D1; 84F6-7 84D3-5; 84F1-2 84D3; 84F1-2 84D4-6; 85B6 84D8; 85B3-5	1990 1984 1884 2013 2182 3354 1842 1941 2009 1862 1869 1898 1876 1968 1873	Df(3R)Tpl10 Df(3R)Tpl6 Df(3R)Scr Df(3R)Antp-X1 Df(3R)CP1 Df(3R)roe Df(3R)Antp17 Df(3R)Antp2 Df(3R)Scx4 Df(3R)dsx2M Df(3R)dsx29 Df(3R)D7 Df(3R)dsx10M Df(3R)p712 Df(3R)dsx37	Suppressor 2 Suppressor 1 Suppressor 1 Suppressor 2 - Suppressor 2 Suppressor 1 Suppressor 1 Suppressor 1 Suppressor 1 Kein Balancer vorhanden (E1 oder S1) Kein Balancer vorhanden (E1 oder S1) Suppressor 0-1 Kein Balancer vorhanden (E1 oder S1) Suppressor 0-1

84D9; 85A1-3 → ???	1868	Df(3R)dsx27	Suppressor 0-1
Bruchpunkte Chromosom 3	Stamm- Nr.	Name der Defizienz	Modifikator
84D11; 84F16	1847	Df(3R)dsx2D	Enhancer 3
84E12-13; 85A6-11	3053	Df(3R)CA1	Enhancer 3
84F2; 85B1	1943	Df(3R)p13	Enhancer 3
→ 84F2; 84F16			
85A2; 85C1-2	1962	Df(3R)p-XT103	Suppressor 1
85D8-12; 85E7-F1	1931	Df(3R)by10	Enhancer 1
85D11-14; 85F16	1893	Df(3R)by62	Enhancer 4
85D12; 85E10	1937	Df(3R)GB104	Enhancer 2
→ 85D12-E10			
86C1-2; 86D8	771	Df(3R)cu	Enhancer 3
86C1; 87B1-5	3128	Df(3R)M-Kx1	Enhancer 3
86D1-2; 86D4	1714	Df(3R)M86D	-
86E2-4; 87C6-7	3003	Df(3R)T-32	Enhancer 3
86F1; 87A9	U-A	Df(3R)T47	-
86F1-2; 87C6-7	3005	Df(3R)T-10	???
→ ???			
87B11-13; 87E8-11	3007	Df(3R)ry615	Suppressor 2
87B15-C1; 87F15-88A1	3358 699	Df(3R)ry85 Df(3R)ry81	- -
87C1-3; 87D14-E2	1534	Tp(3;Y)ry506-85C	Enhancer 1
87D1-2; 88E5-6	3808	Df(3R)ry75	-
87D2; 87D14-E1	1726	Df(3R)CbX[TwtL]	-
87E-F; 88B	3009	Df(3R)l26c	-
87E1-2; 87F11-12	1917	Df(3R)red31	Enhancer 1
87F12-14; 88C1-3			
→ ???			
88B1; 88D3-4	3341	Df(3R)red1	-
88E7-13; 89A1	383	Df(3R)ea	Suppressor 1
88F9-90A1; 89B9-10	756 3524	Df(3R)sbd105 Df(3R)Po2	Kein Balancer vorhanden (E1 oder S1)
89A1-2; 89A11-13			Suppressor 0-1
→ 89A ??			
89B4; 89B10	3678	Df(3R)sbd45	Kein Balancer vorhanden (E1 oder S1)
89B7-8; 89E7-8	1467	Df(3R)P115	Kein Balancer vorhanden (E1 oder S1)
89B9-10; 89C7-D1	1705	Df(3R)sbd26	Suppressor 0-1
89C1-2; 89E1-2	4383	Df(3R)P10	Enhancer 2-3
→ ???			
89D; 92A2-14	1452	Df(3R)P47	Kein Balancer vorhanden (E1 oder S1)
89E1-F4; 91B1-2	4431	Df(3R)DG2	Suppressor 2
89E3-4; 90A1-7	3071	Df(3R)C4	Suppressor 1
→ 89E3-4; 90A1-7			
90F1-4; 91F5	3011	Df(3R)Cha7	-
91F1-2; 92D3-6	3012	Df(3R)DI-BX12	Enhancer 3-4
93B3-5; 93D2-4	3340	Df(3R)e-R1	Enhancer 1
93E-F; 94C-D	1605	Df(3R)5C1	Suppressor 0-1
93F11-14; 94D10-13	2252	Df(3R)hh	-
→ 93E			
95A5-7; 95D6-11	2585	Df(3R)mbc-R1	Suppressor 1
95A7-11; 95F15	4432	Df(3R)crb-F89-4	Suppressor 1
95E8-F1; 95F15	2362	Df(3R)crb87-4	Suppressor 1

95F7; 96A21-25 → ??? /crb (95F)	2363	Df(3R)crb87-5	Suppressor 1
Bruchpunkte Chromosom 3	Stamm- Nr.	Name der Defizienz	Modifikator
97A; 98A1-2	1910	Df(3R)TI-P	Enhancer1-2
97E3; 98A5	2198	Df(3R)ro80b	Suppressor 1
99A1-2; 99B6-11	669	Df(3R)Dr-rv1	-
99B5-6; 99E4-F1	3547	Df(3R)L127	Suppressor 0-1
99D1-2; 99E1	2352	Df(3R)X3F	Suppressor 1
→ 99D1-2; 99E1			
99F1-2; 100B4-5	2599	Df(3R)tll-g	Enhancer 1
100A; 100F	2155	Df(3R)A113	Enhancer 1
100C; 100D	3369	Df(3R)awd-KRB	Suppressor 2
→ 100C-D			
100D;100F5	1011	Df(3R)faf-BP	Enhancer 2

Tab. 4.8: Tabellarische Auflistung der gefundenen Enhancer- und Suppressor-Regionen auf den Chromosomen 1-3

Die modifizierenden Regionen wurden in rot und grün markiert.

Die Zahlen geben die Stärke der jeweiligen Modifikatoren an, wobei 4-5 bei den Enhancern die stärksten Modifikatoren kennzeichnet (Augen extrem stark rauh, vgl. Abb 4.27E-H) und 2 bei den Suppressoren die stärksten Modifikatoren (Augen beinahe wildtypisch, vgl. Abb 4.27 A-B).

Die später im Embryo weiter untersuchten Regionen (auf dem 1. und 2. Chromosom) wurden blau gekennzeichnet und die später weiterhin kartierten violett.

Soweit möglich wurde versucht, die kleinste überlappende Region zu bestimmen (→), allerdings war das in einigen Fällen, speziell auf dem dritten Chromosom, aufgrund der stark überlappenden Defizienzen nicht möglich. Daher findet sich hier nur ???. In diesen Fällen müssten weitere, kleinere Defizienzen näheren Aufschluss über die spezifischen Regionen geben.

Die Karten auf den folgenden Seiten (Abb. 4. 28-30) zeigen die Lage der gefundenen Modifikatoren auf den Chromosomen an.

Schematische Übersicht der gefundenen, modifizierenden Regionen des ersten Chromosoms

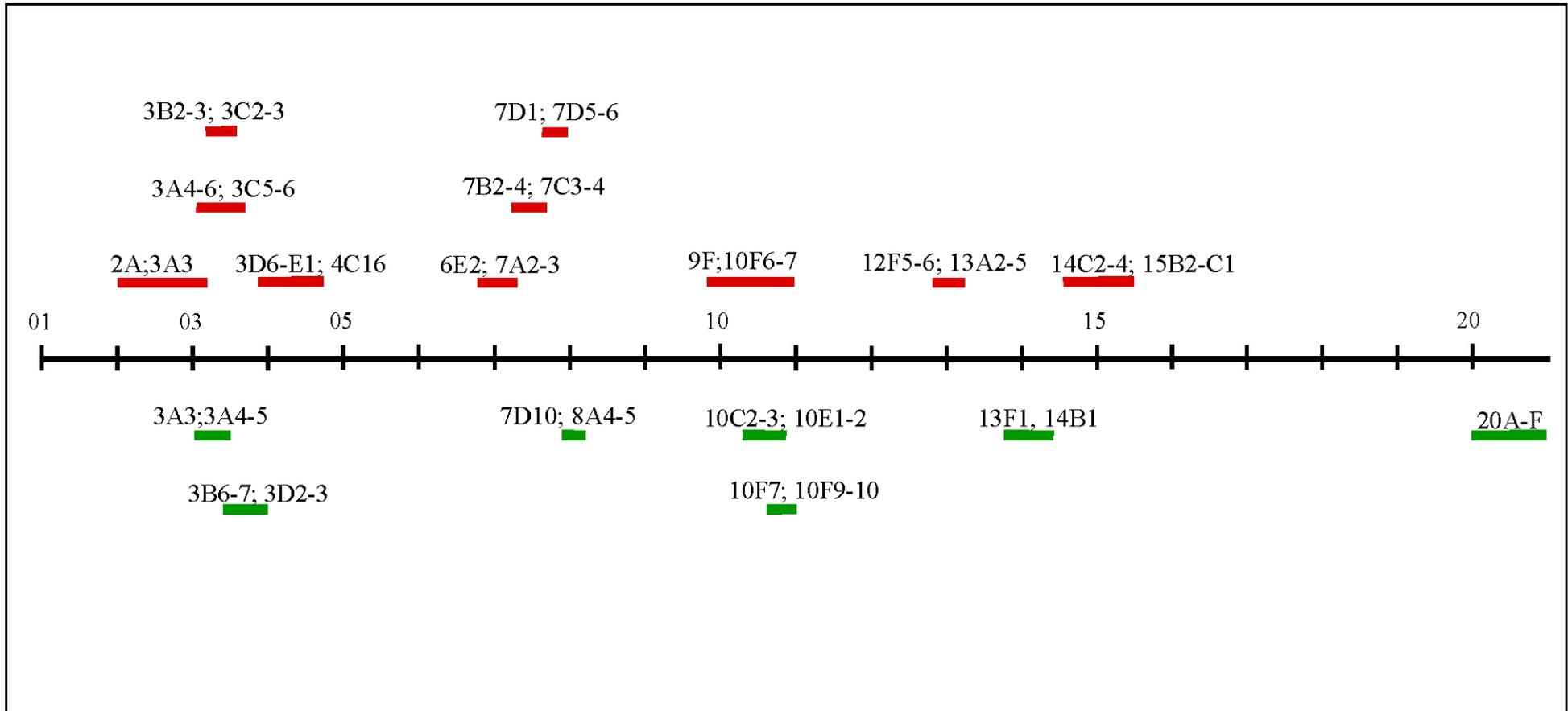


Abb. 4.28: Allgemeine schematische Übersicht der gefundenen Modifier-Regionen des ersten Chromosoms

Die Enhancer-Regionen sind rot markiert, die Suppressoren grün. Wo es möglich war, die kleinste überlappende Region mehrerer Defizienzen in einer Region zu bestimmen, wird diese angegeben. Wo es nicht möglich ist werden die Bruchpunkte der ursprünglich im Modifier-Screen gefundenen Defizienz angegeben. Die Stärke der Enhancer und Suppressoren wird nicht im Detail angegeben. Diese Daten lassen sich Tabelle 4.8 entnehmen.

Schematische Übersicht der gefundenen, modifizierenden Regionen des zweiten Chromosoms

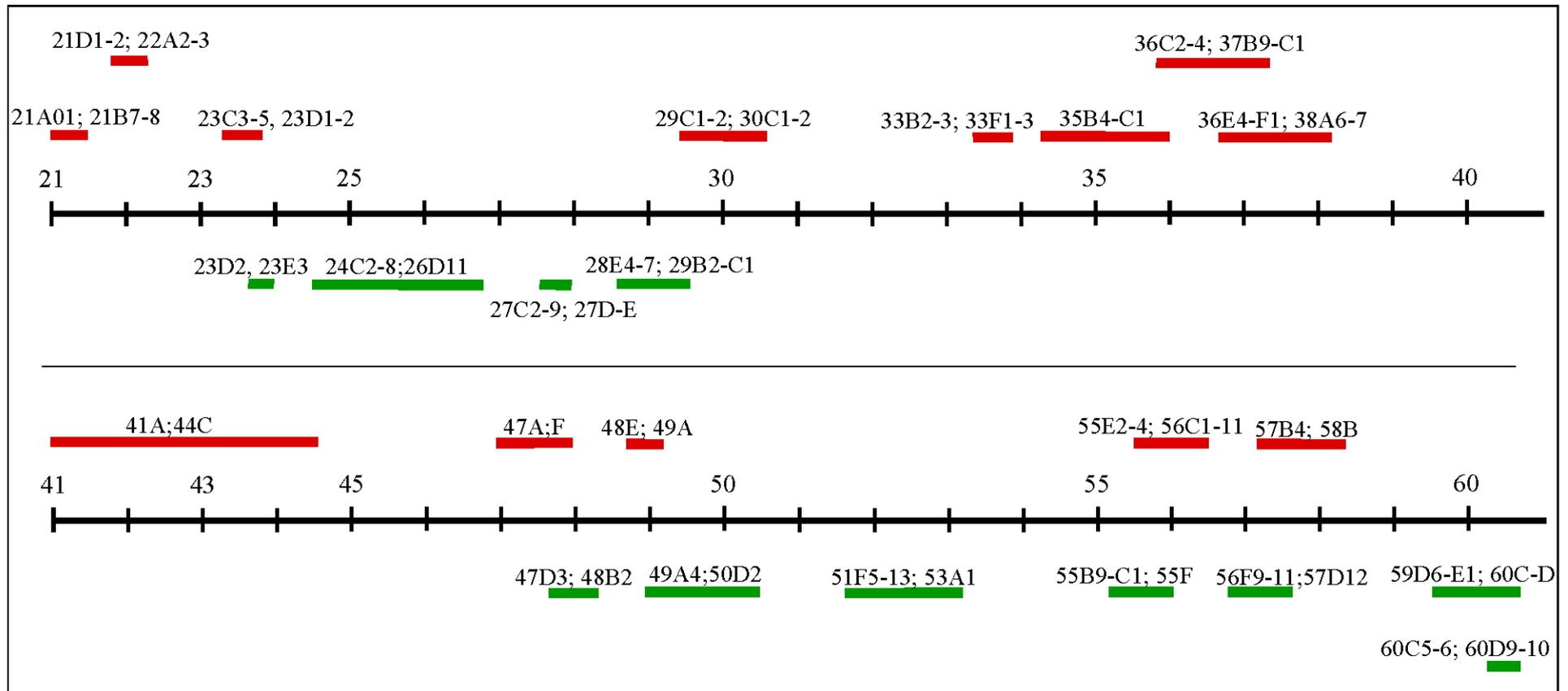


Abb. 4.29: Allgemeine schematische Übersicht der gefundenen Modifier-Regionen des zweiten Chromosoms

Die Enhancer-Regionen sind rot markiert, die Suppressoren grün. Wo es möglich war, die kleinste überlappende Region mehrerer Defizienzen in einer Region zu bestimmen, wird diese angegeben. Wo es nicht möglich ist, werden die Bruchpunkte der ursprünglich im Modifier-Screen gefundenen Defizienz angegeben. Die Stärke der Enhancer und Suppressoren wird nicht im Detail angegeben. Diese Daten lassen sich Tabelle 4.8 entnehmen.

Schematische Übersicht der gefundenen, modifizierenden Regionen des dritten Chromosoms

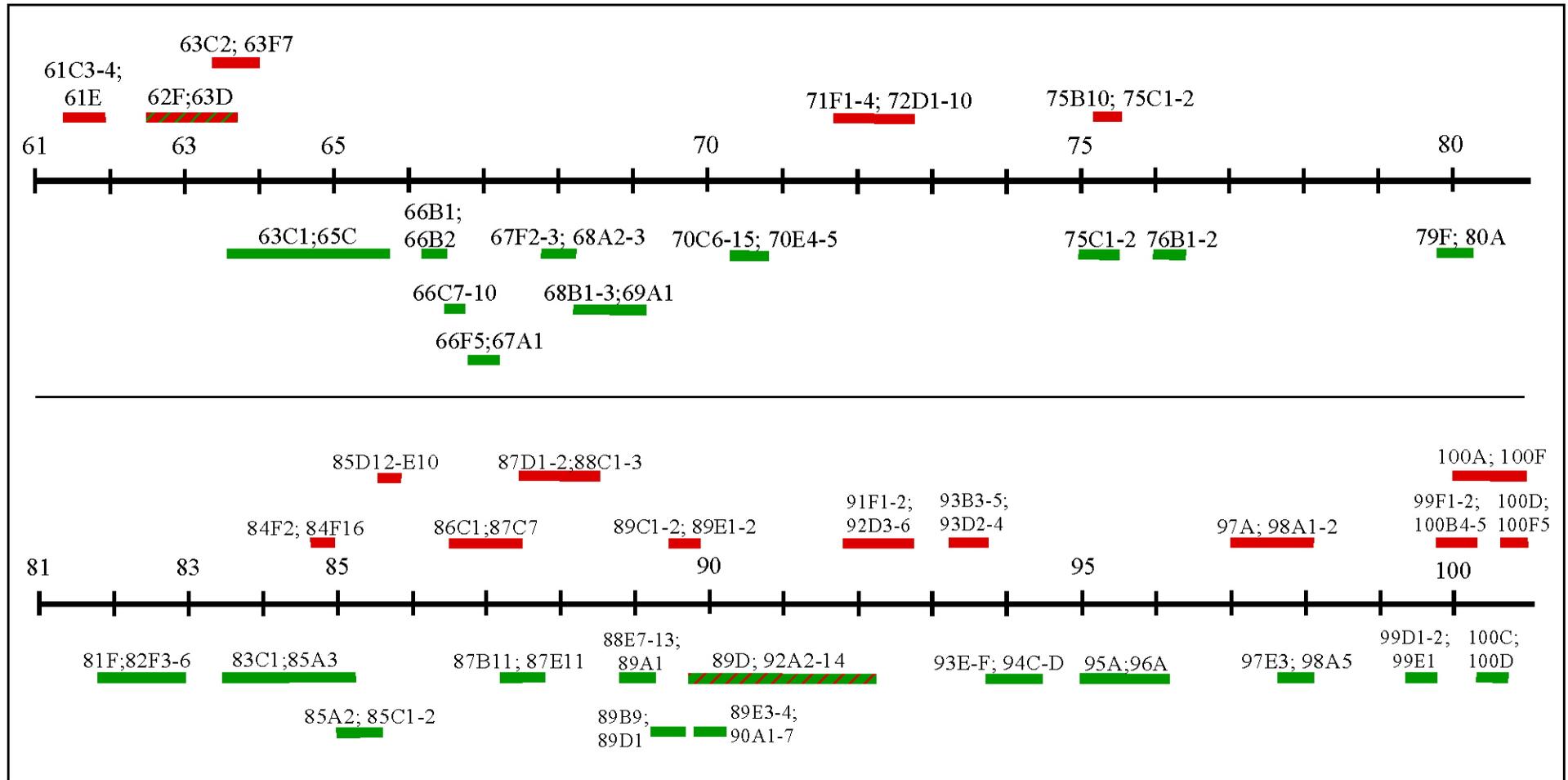


Abb. 4.30: Allgemeine schematische Übersicht der gefundenen Modifier-Regionen des dritten Chromosoms

Die Enhancer-Regionen sind rot markiert, die Suppressoren grün. Wo es möglich war, die kleinste überlappende Region mehrerer Defizienzen in einer Region zu bestimmen, wird diese angegeben. Wo es nicht möglich ist, werden die Bruchpunkte der ursprünglich im Modifier-Screen gefundenen Defizienz angegeben. Die Stärke der Enhancer und Suppressoren wird nicht im Detail angegeben. Diese Daten lassen sich Tabelle 4.8 entnehmen.

Aufschlüsselung der Gesamtzahl der im Screen gefundenen Enhancer und Suppressoren

	Enhancer-Regionen	Suppressor-Regionen	nicht eindeutig
Chromosom I	10, davon 5 E2 und stärker	7	0
Chromosom II	12, davon 6 E2 und stärker	10	2
Chromosom III	14, davon 7 E2 und stärker	23	3

Bei Betrachtung der Ergebnisse des Modifier-Screens sollten folgende Punkte als mögliche Fehlerquellen beachtet werden:

- Die, verwendete Defizienzenkollektion deckt nur etwa 70-80% des Genoms von *Drosophila* ab. Modifikatoren, die in den übrigen 20-30% lokalisiert sind und somit nicht durch die Defizienzen der Kollektion abgedeckt werden (dies gilt vor allem für das 1. und 2. Chromosom, das 3. war bereits mit mehr Defizienzen vertreten als in der Kollektion vorhanden sind) können mit dieser Methode nicht bzw. nur in einem zusätzlichen Screen identifiziert werden.
- Durch das starke Überlappen der Defizienzen in einigen Regionen, vor allem auf dem dritten Chromosom, lässt sich der modifizierende Effekt nicht auf kleinere Regionen eingrenzen. Weitere Untersuchungen bzw. Kartierungen mit kleineren Defizienzen wären in diesen Regionen notwendig, um festzustellen, welche Region verantwortlich ist bzw. ob sich mehr als eine modifizierende Region hinter den sich überlappenden Defizienzen verbirgt.
- Durch die Größe der Defizienzen sind zusätzliche Kartierungen notwendig, um das verantwortliche Gen zu lokalisieren/identifizieren. Da durch die Defizienzen mehr als ein Gen entfernt wird, ist es möglich, dass mehr als ein Gen für die beobachtete Modifikation verantwortlich ist.
- Beobachtungen haben gezeigt, dass sich zwei gegenläufige Modifikatoren (ein starker Enhancer und ein starker Suppressor) zusammen in einer Defizienz gegenseitig neutralisieren können, d. h. die Defizienz, die beide Modifikatoren zusammen betrifft, zeigt keine Modifikation des Augenphänotyps. Testet man jedoch zwei kleinere Defizienzen für den Suppressor und Enhancer einzeln, so ist ein Effekt zu beobachten. Auch hierdurch kann es zu Verlusten im Screen kommen; mögliche Kandidaten werden, da sie sich gegenseitig neutralisieren, nicht als Modifikatoren identifiziert. Genauso können sich hierdurch aber auch Gene bzw. deren Mutationen, die als funktionelle Interaktionspartner von Crumbs agieren, als stärkere Modifikatoren herausstellen als eine größere, im Modifier-Screen verwendete Defizienz, mit deren Hilfe das Gen ursprünglich gefunden wurde.

- Der genetische Hintergrund des Chromosoms, auf dem die Defizienz liegt, kann ebenfalls einen Einfluss haben und den Augenphänotyp modifizieren.
- Es könnten auch Modifikatoren existieren, die die Expressionsstärke der Gal4-Linie regulieren und hierüber den rauhen Augenphänotyp modifizieren.

4.2.1.3 Tests der gefundenen Enhancer in einer Kreuzung mit GMR-Gal4-UAS-*crb*^{intra}ΔERLI zeigen keine Modifikation des rauhen Augenphänotyps.

Um festzustellen, ob das C-terminale ERLI-Motiv, das maßgeblich verantwortlich für die Crumbs-Funktion ist (Klebes und Knust, 2000), auch Angriffspunkt für einen modifizierenden Effekt ist, wurde mit Hilfe von Rekombination die Linie GMR-Gal4-UAS-*crb*^{intra}ΔERLI hergestellt, in der UAS-*crb*^{intra}ΔERLI unter der Kontrolle von GMR-Gal4 spezifisch im Auge überexprimiert wird. Die etablierte Linie selbst zeigt nur einen schwach rauhen Augenphänotyp.

Kreuzt man diese Rekombinate mit den im Modifier-Screen gefundenen Enhancern (Tab. 4.8.), so findet man in allen Fällen keine Verstärkung. Die Suppressoren wurden nicht getestet, da GMR-Gal4-UAS-*crb*^{intra}ΔERLI allein schon einen so schwach rauhen Augenphänotyp aufweist, dass sich eine Abschwächung dieses Phänotyps mit einem Stereomikroskop nicht erkennen ließe.

Dies weist darauf hin, dass die Interaktion von Crumbs mit den gesuchten unbekanntem Interaktionspartnern auch über das ERLI-Motiv vermittelt zu werden scheint.

4.2.2 Nähere Kartierung der im Modifier-Screen gefundenen Defizienzen

Die im Modifier-Screen mit dem Auge von *Drosophila* als Testsystem gefundene große Anzahl von modifizierenden Defizienzen sollte zur näheren Untersuchung auf zwei oder maximal drei Kandidaten reduziert werden. Das Hauptinteresse lag dabei auf Genen, die nicht nur exklusiv während der Augenentwicklung funktionell mit Crumbs interagieren, sondern auch während der embryonalen Epithelentwicklung einen Einfluss auf diesen Faktor haben.

Um diese zu identifizieren, wurde ein Teil der bei der Augenentwicklung wirksamen Defizienzen in einem zweiten Schritt im Embryo daraufhin untersucht, ob sie anderenorts einen Einfluss auf den Phänotyp von *crumbs*-Mutanten haben. Als Testsystem wurde die Kutikula gewählt.

Die im Modifier-Screen gefundenen Defizienzen wurden mittels Kreuzung (siehe Methoden 3.2.5) in einen genetisch homozygot mutanten *crumbs*-Hintergrund gebracht.

Mit Hilfe von Kutikula-Präparationen wurden dann die in Ablagen liegende Embryonen darauf untersucht, ob alle Embryonen einen mutanten *crumbs*-Phänotyp zeigten, oder ob in einem Teil der Embryonen die Störung der Kutikula-Entwicklung zumindest teilweise unterdrückt werden konnte.

Die Auswahl der Gene, deren Defizienz Einfluss auf Crumbs hat, wurde wie folgt getroffen:

- 1.) Da nur Enhancer, nicht aber die Suppressoren weitergetestet wurden, reduzierte sich die Anzahl von 81 insgesamt gefundenen Modifikatoren auf 36 Enhancer.
- 2.) *Crumbs* selbst liegt auf dem dritten Chromosom. Somit können Experimente zur Korrektur der Mutationswirkung, in denen die Defizienzen in einen homozygoten *crumbs*-Hintergrund gebracht werden sollen, mit Modifikatoren auf dem dritten Chromosom nur durchgeführt werden, wenn man diese zuerst mit *crumbs* rekombiniert. Aus Zeitgründen wurde hierauf verzichtet, und nur die 22 Enhancer des ersten und zweiten Chromosoms wurden weiterhin betrachtet.
- 3.) Die stärkeren dieser Enhancer (E2 und stärker) wurden auf eine Abschwächung des mutanten Phänotyps bei Tieren mit den Allelen *crb*^{11A22} oder *crb*^{8F105} hin untersucht (siehe folgendes Kapitel 4.2.2.1). Zusätzliche Tests auf eine Abschwächung des mutanten Phänotyps wurden bei Tieren mit zwei *sdt*-Allelen sowie bei solchen mit einem mutierten *baz*-Allel durchgeführt, wobei das Ergebnis allerdings für die eigentliche Auswahl der Defizienzen nicht ausschlaggebend war, da nach funktionellen Interaktionspartnern von Crumbs gesucht wurde (siehe folgendes Kapitel 4.2.2.2).
- 4.) Wurde eine Abschwächung des mutanten *crumbs*-Phänotyps durch bestimmte Defizienzen festgestellt, so wurde im Anschluss versucht, diese mit Hilfe kleinerer Defizienzen, so vorhanden, näher zu kartieren. Diese Kartierung erfolgte erneut über die Analyse der Abschwächung des mutanten *crumbs*-Phänotyps im Embryo (siehe folgendes Kapitel 4.2.2.3).
- 5.) Das Vorhandensein interessanter Kandidatengene in einzelnen Kartenregionen gab letztendlich den Ausschlag für die Wahl bestimmter Defizienzen für die weitere Arbeit (siehe folgendes Kapitel 4.2.3).

4.2.2.1 Abschwächung des mutanten *crumbs*-Phänotyps der Linien *crb*^{11A22} und *crb*^{8F105} durch starke Enhancer des rauhen Augenphänotyps

Die im Rahmen des Modifier-Screens gefundenen Enhancer, die auf dem 1. oder 2. Chromosom kartieren, wurden in einem ersten Schritt in einen homozygot mutanten *crb*^{11A22}-Hintergrund eingekreuzt, um festzustellen, ob sie den Kutikula-Phänotyp in *crumbs*-Mutanten abschwächen können. Enhancer, die den Augenphänotyp deutlich beeinflussten wurden noch mit einem weiteren Allel, *crb*^{8F105} auf eine Abschwächung des mutanten *crumbs*-Phänotyps hin untersucht.

Die Kreuzungen lieferten zwei Klassen von mutanten Embryonen, die bei Eiablagen in der Kutikulapräparation liegenblieben. Zum einen Embryonen, die allein homozygot mutant für *crumbs* waren. Diese Embryonen zeigten den bekannten *crumbs*-Kutikula-Phänotyp (Abb. 4.31 B-C). Die zweite Klasse war ebenfalls homozygot mutant für *crumbs*, trug aber zusätzlich noch eine Kopie der untersuchten Defizienz auf dem ersten oder zweiten Chromosom. Beeinflusste der Verlust eines oder mehrerer Gene innerhalb dieser Defizienz den *crumbs*-Kutikulaphänotyp, so zeigte diese zweite Klasse von Embryonen Unterschiede zu den reinen *crumbs*-Embryonen zeigen (Abb. 4.32 und 4.33). Hatte der Verlust der Gene innerhalb der Defizienz jedoch keinen Einfluss auf Crumbs, so zeigten alle liegengebliebenen Embryonen den für *crb*-Mutanten charakteristischen Phänotyp .

Abbildung 4.31 gibt, im Vergleich zum Wildtyp, einen Überblick über die Phänotypen der *crumbs*- und *stardust*-Mutanten, die für die Suche nach abschwächend wirkenden Mutanten modifizierender Gene verwendet wurden.

Die wildtypische Kutikula (A) lässt eine Reihe spezifischer Merkmale erkennen:

Im anterioren Bereich erkennt man das dunkle Kopfskelett (Abb. 4.31A: schwarzer Pfeilkopf), am posterioren Ende befinden sich die Filzkörper, d.h. die Ausgänge des Tracheensystems (außerhalb des Bildes). Zudem kann man im ventralen Bereich des Embryos die 8 abdominalen (markiert durch *) und selten drei thorakale Zähnchenbänder identifizieren sowie im Inneren des Embryos Teile des Tracheensystems (markiert durch weissen Pfeil).

Der Phänotyp der *crumbs*-Mutanten *crb*^{11A22} und *crb*^{8F105} fällt nahezu identisch aus (B/C). Es sind keine von den im Wildtyp auftretenden Strukturen mehr erkennbar. Von der Kutikula sind nur noch Krümel (engl. *crumbs*) vorhanden. Bei beiden Allelen handelt es sich im Embryo um funktionelle Null-Allele. *crb*^{11A22} ist zudem ein vollständiges Protein-Null-Allel (Art der Mutation unbekannt), während in *crb*^{8F105} noch ein Restprotein gebildet wird, dem jedoch aufgrund einer Mutation die C-terminalen 23 Aminosäuren, inklusive ERLI-Motiv, fehlen.

stardust-Mutanten (D) sind kaum von *crumbs*-Mutanten zu unterscheiden. Auch hier bleiben nur noch Fetzen der Kutikula zurück. In diesem Projekt wurden zwei amorphe *stardust*-Allele, *sdt*^{XP96} und *sdt*^{XN05} eingesetzt. Aufgrund der identischen Phänotypen wird in Abb. 4.31 D nur ein Bild gezeigt.

Abbildung (E) zeigt ein hypomorphes *crumbs*-Allel, *crb*⁸⁷⁻², für das im Rahmen dieser Analysen ebenfalls getestet wurde, ob ob sich sein Phänotyp durch eine der ausgewählten Defizienzen beeinflussen lässt. Im Gegensatz zu den beiden amorphen Allelen *crb*^{11A22} und *crb*^{8F105} ist hier noch ein Rest zusammenhängender Kutikula vorhanden. Kopfskelett und der anteriore Bereich der Kutikula fehlen vollständig, die ventrale Kutikula ist jedoch teilweise vorhanden, ebenso wie die Filzkörper und eine geringe Segmentierung im ventralen Bereich.

Abbildung (F) zeigt einen ähnlichen Phänotyp wie E. Auch hier fehlen Kopfskelett und der anteriore Bereich der Kutikula, der posterior-ventrale Teil, schwach segmentiert, ist jedoch vorhanden.

Hier handelt es sich jedoch nicht um ein weiteres *crumbs*-Allel, sondern um eine Abschwächung des Phänotyps durch eine Kreuzung. In einem *crumbs*-mutanten Hintergrund wurde UAS-*crb*^{intra} exprimiert, was die Störung der Kutikulaentwicklung des Embryos teilweise wieder aufhebt (Wodarz et al., 1995). Mit (F) vergleichbare Phänotypen wurden auch als Ergebnis der Experimente im vorliegenden Projekt erwartet, nur dass es hier der Verlust eines oder mehrerer Gene und nicht ihre Überexpression war, der eine Korrektur ermöglichen sollte.

Ergebnisse der Experimente zur Abschwächung des mutanten Phänotyps

Der Schweregrad der Veränderungen der Kutikula bei den im Rahmen der Rettungs-Experimente generierten Tiere war wie schon zuvor bei der Augenanalyse bei Verwendung der verschiedenen Enhancer unterschiedlich. Daher wurden die beobachteten Phänotypen in vier verschiedene Klassen eingeteilt (Abb. 4.32). Abbildung 4.33 zeigt die gefundenen Phänotyp-Klassen im Vergleich zum Wildtyp (A) und zu einer der beiden amorphen *crumbs*-Mutanten (B).

In Klasse 1 (Abb. 4.32 A und 4.33 C-D) ist nur eine geringe Abschwächung zu beobachten. Zusätzlich zu Kutikula-Krümeln finden sich hier auch kleinere Schilde zusammenhängender Kutikula, die bei dorsaler Aufsicht auf den Embryo wie zwei Flügel auf der rechten und linken Seite des Embryos aussehen (markiert durch Pfeil).

Klasse 2 (4.32 B und 4.33 C-D) zeigt bereits einen stärker abgeschwächten Mutanten- Phänotyp. Auch hier finden sich die beiden Kutikula-Flügel, jedoch sind sie hier bereits unterschiedlich stark miteinander verwachsen. Da die Kutikulareste und -schilde nach einer Präparation nicht immer an der Stelle des Embryos liegen, wo sie von der Epidermis sezerniert werden, ist es schwierig zu beurteilen, in welchem Bereich des Embryos die Abschwächung des Phänotyps stattfindet. Ausführlichere Beobachtungen lassen allerdings vermuten, dass sich die beiden einzelnen Schilde in Klasse 1 im dorso-lateralen Bereich des Embryos bilden (je einer auf der rechten bzw. linken Seite), die dann in Klasse 2 dorsal oder ventral zusammenwachsen.

In Klasse 3 und 4 (Abb. 4.32 C und 4.33 G-H) sind die beiden Kutikula-Flügel weitgehend verwachsen. Während Klasse 3 noch immer zu einem gewissen Grad Löcher in der Kutikula aufweist (4.33 G), zeigt die am meisten abgeschwächte Mutante, Klasse 4, eine vollständig zusammenhängende Kutikula. Ab Klasse 2 zeigt die Kutikula der Embryonen eine Segmentierung (4.33, schwarze Pfeilköpfe), allerdings ist sie hier noch nicht so deutlich zu erkennen wie in Klasse 4, da es sich vor allem um dorsale Kutikula handelt. Die ventrale Segmentierung, die in Klasse 3-4 hinzukommt, ist durch die Zähnenreihen besser zu erkennen (4.33 H). Phänotypen der Klasse 4 sind vom Ausmaß der Korrektur her vergleichbar mit den Phänotypen, die man bei Überexpression von UAS-*crb*^{intra} in einem *crumbs*-mutanten Embryo erhält. In keiner der vier Klassen wurde eine Abschwächung der Fehlbildung der anterioren Kutikula bzw. des Kopf-Skeletts beobachtet.

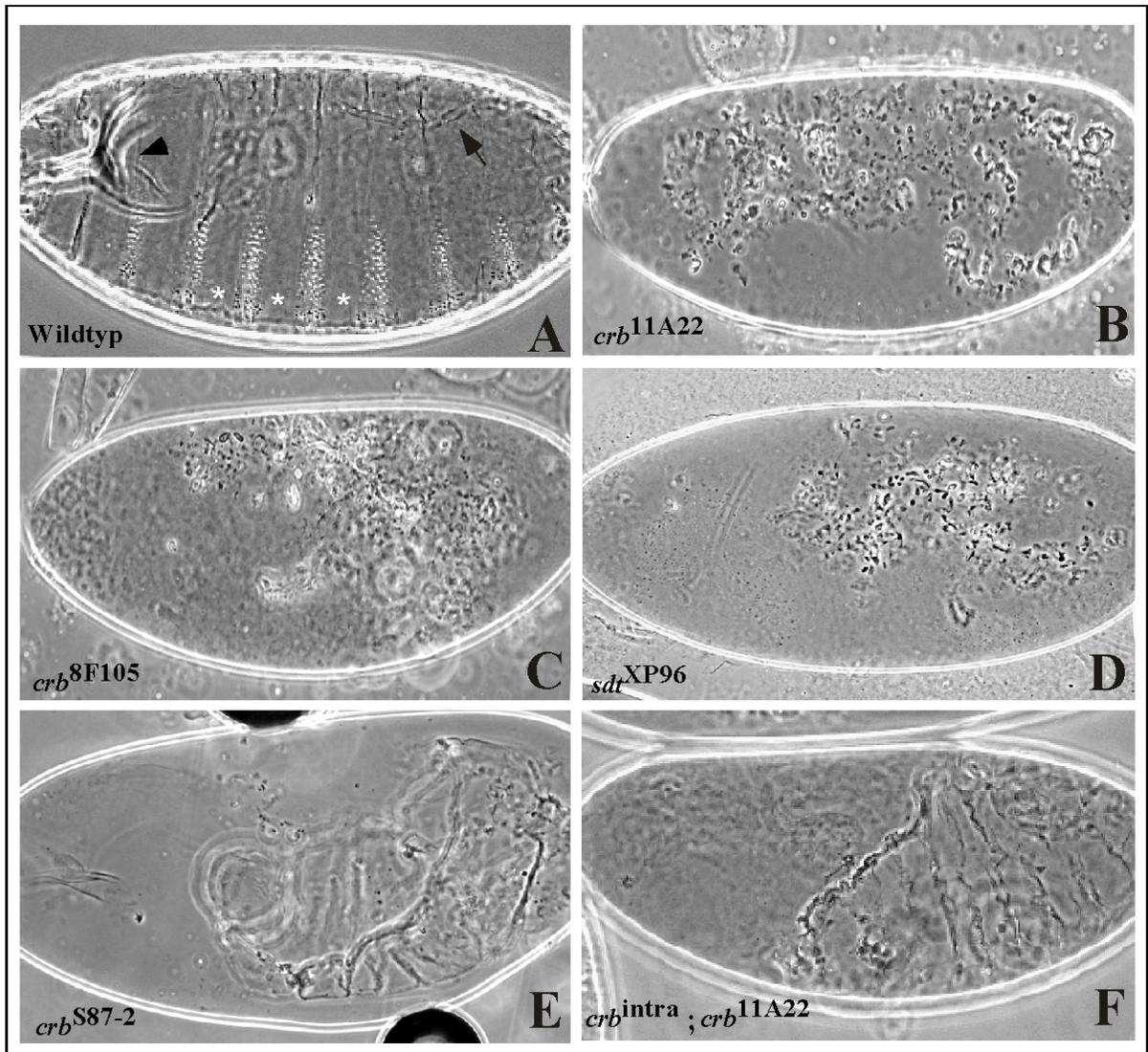


Abb. 4.31: Kutikulaphänotypen verwendeter *crumbs*- und *stardust*-Allele

(A) Wildtyp: Charakteristisch für eine wildtypische Kutikula sind das anterior gelegene Kopfskelett (schwarzer Pfeilkopf), die posterior gelegenen Filzkörper sowie 8 ventrale Zähnenbänder (Sterne). Teilweise sind innerhalb des Embryos ebenfalls Teile des Tracheensystems zu erkennen (weisser Pfeil).

(B/C) Die beiden mutanten *crumbs*-Allele *crb*^{11A22} (B) und *crb*^{8F105} (C) zeichnen sich durch einen völligen Verlust der im Wildtyp beobachteten Kutikulastrukturen aus. Von der Kutikula bleiben in homozygot mutanten Embryonen in beiden Fällen nur Krümel übrig.

(D) Die beiden amorphen *stardust*-Allele *sdr*^{XP96} und *sdr*^{XN05} (D) weisen beide einen *crumbs*-ähnlichen Phänotyp auf. In homozygot mutanten Embryonen sind von der Kutikula nur noch Krümel übrig.

(E) Das hypomorphe *crumbs* Allel *crb*^{S87-2} weist noch einen Rest Kutikula auf. Die Kopfstrukturen der Kutikula sind vollständig verloren gegangen, ebenso wie ein grosser Anteil der dorsalen Kutikula. Der posterior-ventrale Anteil der Kutikula ist jedoch weiterhin vorhanden, selbst wenn die ventral gelegenen Zähnenbänder stark reduziert vorliegen.

(F) Rettungskreuzung: Die zytoplasmatische Domäne von *crumbs* wurde in einem *crumbs*-mutanten Hintergrund exprimiert, und hierdurch konnte ein Teil der posterior-ventralen Kutikulastrukturen wiederhergestellt werden, nicht aber Kopf und dorsale Regionen.

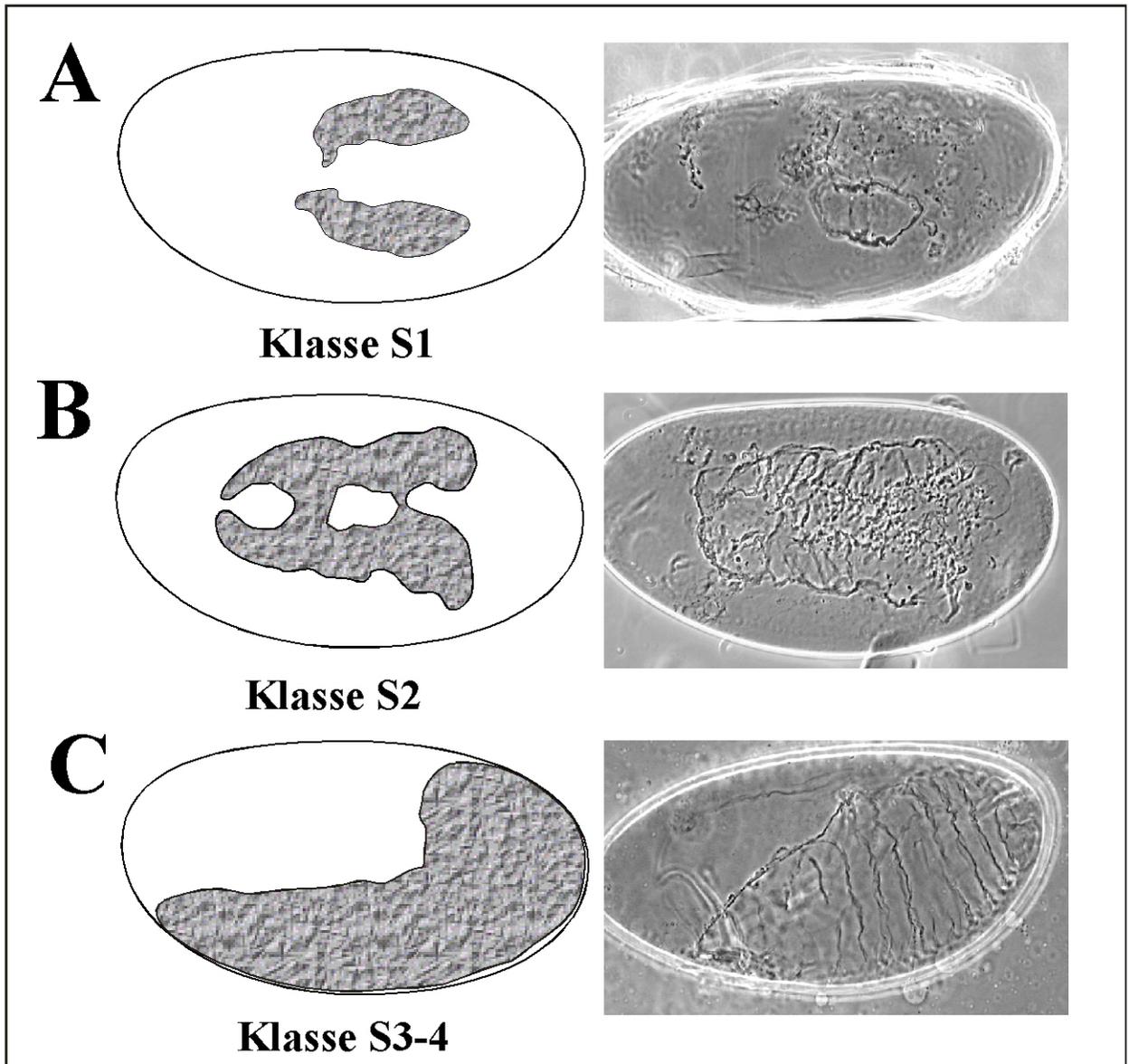


Abb. 4.32: Schematische Darstellung der im Rahmen der Rettungsexperimente gefundenen Phänotypen:

(A) Klasse S1 zeigt dorsolateral zwei Kutikulaflügel, je einen auf jeder Seite.

(B) In Klasse S2 sind die beiden Flügel vergrößert und unterschiedlich stark miteinander verwachsen.

(C) In Klasse S3 und S4 sind die beiden Flügel weitgehend zu einem Schild verwachsen. Während die Kutikula in Klasse S3 noch Löcher aufweist ist sie in S4 zusammenhängend.

Ab Klasse S2 zeigt die gerettete Kutikula der Embryonen eine Segmentierung, allerdings ist sie in S2 noch nicht so deutlich zu erkennen wie in S4, da es sich vor allem um dorsale Kutikula handelt. Die ventrale Segmentierung, welche in Klasse S3-4 hinzukommt, ist durch die Zähnenreihen besser zu erkennen.

Die Abschwächung des mutanten *crumbs*-Phänotyps der Klasse S4 ist etwa ebenso stark wie die in 4.31 gezeigte Rettung der Kutikula bei Expression der zytoplasmatischen Domäne von *crumbs* in einem *crumbs*-mutanten Hintergrund.

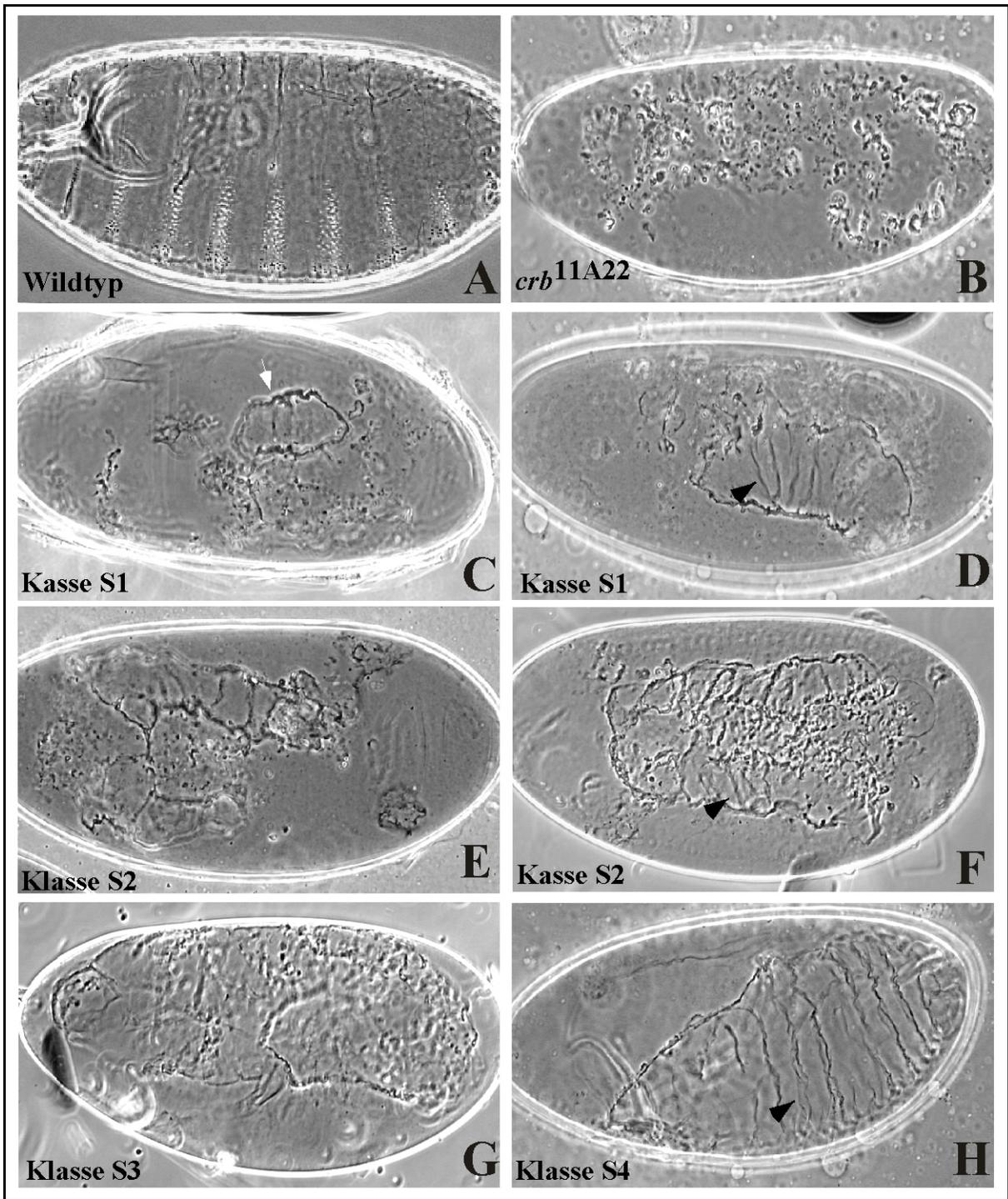


Abb. 4.33: Auflistung der gefundenen Phänotypen der Rettungsexperimente

(A) Die wildtypische Kutikula zeigt das anteriore Kopfskelett, posteriore Filzkörper sowie 8 abdominale Zähnchenbänder ventral und Tracheen im Inneren des Embryos (vgl. 4.31A).

(B) Der mutante *crumbs*-Phänotyp des Allels *crb*^{11A22} weist statt zusammenhängender Kutikula nur noch Krümel auf.

(C-H) Phänotypen der Rettungsexperimente: Phänotypen der Klasse S1 (C-D) weisen zwei dorsolaterale Flügel unterschiedlicher Größe auf (Pfeil, nur ein Flügel in dieser Fokusebene sichtbar). Diese wachsen in der Mitte dorsal oder ventral zusammen (Klasse S2, E-F). In Klasse S3 (G) sind die Flügel weitgehend verwachsen, wobei im zusammenhängenden Schild noch Löcher zu sehen sind. Der Schild in Klasse S4 (H) ist vollkommen zusammenhängend. Eine Segmentierung der geretteten Kutikula ist mit schwarzen Pfeilköpfen markiert.

Zusammenfassung: Abschwächung des mutanten *crumbs*-Phänotyps

Chr.	Name und Nr. der Defizienz	Bruchpunkte	x GMR-Gal4- crb ^{intra} 38.1.2b	x crb ^{11a22} (Kutikula)	x crb ^{8F105} (Kutikula)
I	Def # 733 Df(1)w258-42	03A4-6; 03C5-6	Enhancer E 5 E0 (Mix)	-----	-----
I	Def # 940 Df(1)A113	03D6-E1; 04F5	Enhancer E 3	Suppressor 2-3	Suppressor 3
I	Def # 2984 Df(1)C128	07D1; 07D5-6	Enhancer E 1	Suppressor 2-3	Suppressor 2-3
I	Def # 949 Df(1)C128	07D1; 07D5-6	Enhancer E 4	Suppressor 3	Suppressor 3
I	# 3560 Df(1)v-N48	09F; 10C3-5	Enhancer E 3-4	Suppressor 1	Suppressor 2-3
I	# 957 Df(1)KA7	10A9; 10F6-7	Enhancer E 1-2	Suppressor 1	-----
II	Def # 3638 Df(2L)net-PMF	21A1; 21B7-8	Enhancer E3	Suppressor 2-3	Suppressor 2-3
II	Def # 2892 Df(2L)N22-14	29C1-2; 30C8-9	Enhancer E 2	Suppressor 4	Suppressor 2-3
II	Def # 3079 Df(2L)Prl	32F1-3; 33F1-3	Enhancer E 1-2	Suppressor 3	-----
II	Def # 3344 Df(2L)prd1.7	33B2-3; 34A1-2 (33B2-3; 33F1-3)	Enhancer E 1-2	Suppressor 2	-----
II	Def # 3138 Df(2L)b87e25	34B12-C1; 35B10-C1	Enhancer E 3	Suppressor 1-3	Suppressor 3
II	Def # 3588 Df(2L)TE35BC-24	35B4-6; 35F1-7	Enhancer E 3	Suppressor 1-3	Suppressor 3
II	Def # 2583 Df(2L)cact- 255rv64	35F-36A; 36D	Enhancer E 4	Suppressor 1-2	Suppressor 2-3
II	Def # 420 Df(2L)TW137	36C2-4; 37B9-C1	Enhancer E 1	S 0 (-1)	-----
II	Def # 3189 Df(2L)TW50	36E4-F1; 38A6-7	Enhancer E 2-3	Suppressor 1-2	Suppressor 1- 3
II	Def # 749 In(2R)bw[VDe2L]	41A-B; 42A2-3	Enhancer E 1	S 0 (-1)	-----
II	Def # 739 Df(2R)M41A4	41A	Enhancer E 2	S 0 (-1)	-----
II	Def # 1006 Df(2R)nap9	42A1-2; 42E6-F1	Enhancer E 1	Suppressor 1	-----
II	Def # 1007 Df(2R)nap9	42A1-2; 42E6-F1	Enhancer E 1	Suppressor 1	-----
II	Def # 1888 Df(2R)ST1	42B3-5; 43E15-18	Enhancer E 3	Suppressor 1-3	Suppressor 1- 3
II	Def # 190 Df(2R)en-A	47D3; 48B2	Enhancer E 2	Suppressor 1-2	Suppressor 3

Tab. 4.9: Tabellarische Auflistung der Defizienz-Mutanten, die den Kutikula-Phänotyp von *crumbs*-Mutanten abschwächen können

Die in dieser Tabelle blau markierten Defizienzen wurden später zusätzlichen Kartierungen unterzogen.

Von den starken Enhancern auf dem ersten und zweiten Chromosom schwächen fast alle, wenngleich in unterschiedlichem Maß, den mutanten *crumbs*-Phänotyp und erlauben die Bildung eines Teils der embryonalen Kutikula. Häufig korreliert hierbei die Stärke der Modifikation im Auge mit dem Ausmaß der Abschwächung des mutanten *crumbs*-Phänotyps in der Kutikula des Embryos. Zudem ist die Unterdrückung des mutanten Phänotyps von *crb*^{8F105}-Embryonen, zumindest in den getesteten Linien, immer stärker als die in *crb*^{11A22} beobachtete.

4.2.2.2 Abschwächung der Kutikula-Fehlbildungen bei *sdt*^{XD96} -, *sdt*^{XN05} - und *baz*^{Xi106} - Mutanten durch starke Enhancer des „rauen“ Augenphänotyps

Zusätzlich zur Abschwächung des mutanten *crumbs*-Phänotyps durch die gefundenen Defizienzen wurde getestet, ob diese Linien ebenfalls auch den mutanten *stardust*- oder *bazooka*-Phänotyp abschwächen können. Diese Experimente waren allerdings nicht ausschlaggebend für die Auswahl von Defizienzen für die weitere Analysen. Da *stardust* und *bazooka* auf dem ersten Chromosom liegen können die Experimente zur Untersuchung von Defizienzen auf diesem Chromosom nicht ohne vorherige Rekombination durchgeführt werden. Auf diese Versuche wurde daher aus Zeitgründen verzichtet.

Chr.	Name und Nr. der Def.	Region / Bruchpunkte	x GMR-Gal4- <i>crb</i> ^{intra} 38.1.2b	x <i>sdt</i> ^{XP96} (Kutikula)	x <i>sdt</i> ^{XN05} (Kutikula)	x <i>baz</i> ^{Xi106} (Kutikula)
I	Def # 733 Df(1)w258-42	03A4-6; 03C5-6	enhancer E 5 E0 (Mix)	-----	-----	-----
I	Def # 940 Df(1)A113	03D6-E1; 04F5	enhancer E 3	-----	-----	-----
I	Def # 2984 Df(1)C128	07D1; 07D5-6	Enhancer E 1	-----	-----	-----
I	Def # 949 Df(1)C128	07D1; 07D5-6	Enhancer E 4	-----	-----	-----
I	# 3560 Df(1)v-N48	09F; 10C3-5	Enhancer E 3-4	-----	-----	-----
I	# 957 Df(1)KA7	10A9; 10F6-7	Enhancer E 1-2	-----	-----	-----
II	Def # 3638 Df(2L)net-PMF	21A1; 21B7-8	Enhancer E3	S 0	Suppressor 1-2	S 0
II	Def # 2892 Df(2L)N22-14	29C1-2; 30C8-9	Enhancer E 2	Suppressor 2	Suppressor 2	S 0-1

Chr.	Linie Nr.	Region / Bruchpunkte	x GMR-Gal4- crb ^{intra} 38.1.2b	x sdt ^{XP96} (Kutikula)	x sdt ^{XN05} (Kutikula)	x baz ^{Xi106} (Kutikula)
II	Def # 3079 Df(2L)Pr1	32F1-3; 33F1-3	Enhancer E 1-2	S 0	Suppressor 1-2	S 0
II	Def # 3344 Df(2L)prd1.7	33B2-3; 34A1-2	Enhancer E 1-2	S 0	S 0	S 0
II	Def # 3138 Df(2L)b87e25	34B12-C1; 35B10-C1	Enhancer E 3	S 0	Suppressor 1	S 0
II	Def # 3588 Df(2L)TE35 BC24	35B4-6; 35F1-7	Enhancer E 3	Suppressor 1	Suppressor 1-2	S 0
II	Def # 2583 Df(2L)cact- 255rv64	35F-36A; 36D	Enhancer E 4	S 0	S 0	S 0
II	Def # 420 Df(2L)TW137	36C2-4; 37B9- C1	Enhancer E 1	S 0	S 0-1	S 0
II	Def # 3189 Df(2L)TW50	36E4-F1; 38A6- 7	Enhancer E 2-3	S 0	Suppressor 1-2 (-3)	S 0
II	Def # 749 In(2R)bwV De2L	41A-B; 42A2-3	Enhancer E 1	S 0	S 0	S 0
II	Def # 739 Df(2R)M41A4	41A	Enhancer E 2	S 0	Suppressor 1	S 0
II	Def # 1006 Df(2R)nap9	42A1-2; 42E6- F1	Enhancer E 1	S 0	S 0 (-1)	S 0
II	Def # 1007 Df(2R)nap9	42A1-2; 42E6- F1	Enhancer E 1	S 0	S 0 (-1)	S 0
II	Def # 1888 Df(2R)ST1	42B3-5; 43 E15- 18	Enhancer E 3	S 0	Suppressor 1-2	S 0
II	Def # 190 Df(2R)en-A	47D3; 48B2	Enhancer E 2	S 0	Suppressor 1-2	S 0
III	# 3640 Df(3L)brm11	71F1-4; 72D1- 10	Enhancer E 1	S 0	S 0	S 0
III	# 3641 Df(3L)th102	71F3-5; 72D12	Enhancer E 2	S 0	S 0	S 0
III	# 2607 Df(3L)W4	75B10; 75C1-2	Enhancer E 2	S 0	S 0	Suppr 1 ???
III	# 1847 Df(3R)dsx2D	84D11; 84F16	Enhancer E 3	S 0	S 0	S 0
III	# 3053 Df(3R)CA1	84E12-13; 85A6-11	Enhancer E 3	S 0	S 0 (-1)	S 0
III	# 1943 Df(3R)p13	84F2; 85B1	Enhancer E 3	S 0	S 0	S 0
III	# 1931 Df(3R)by10	85D8-12; 8E7- F1	Enhancer E 1	S 0 (-1)	S 0	Suppr 1 ???
III	# 1893 Df(3R)by62	85D11-14; 85F16	Enhancer E 4	S 0	S 0	S 0
III	# 1937 Df(3R)GB104	85D12; 85E10	Enhancer E 2	S 0	Suppressor 1	S 0
III	# 771 Df(3R)cu	86C1-2; 86D8	Enhancer E 3	S 0	Suppressor 1-2	S 0
III	# 3128 Df(3R)M-Kx1	86C1; 87B1-5	Enhancer E 3	S 0	S 0	-----
III	# 3003 Df(3R)T-32	86E2-4; 87C6-7	Enhancer E 3	S 0	S 0	-----

Chr.	Linie Nr.	Region / Bruchpunkte	x GMR-Gal4- crb ^{intra} 38.1.2b	x sdt ^{XP96} (Kutikula)	x sdt ^{XN05} (Kutikula)	x baz ^{Xi106} (Kutikula)
III	# 4383 Df(3R)P10	89C1-2; 89E1-2	Enhancer E 2-3	Suppressor 1	S 0	-----
III	# 3012 Df(3R)D1-BX12	91F1-2; 92D3-6 (91F5; 92D3-6)	Enhancer E 3-4	S 0	S 0 (-1)	-----
III	# 1910 Df(3R)T1-P	97A; 98A1-2	Enhancer E 1-2	Suppressor 2-3	S0	-----
III	# 1011 Df(3R)faf-BP	100D; F5	Enhancer E 2	S 0	S0 (-1)	-----

Tab. 4.10: Tabellarische Auflistung der Defizienz-Linien, die in Kreuzungsexperimenten den Kutikulaphänotyp von *stardust*- und *bazooka*-Mutanten abmildern konnten

Die später näher analysierten Regionen sind hier, wie in der vorigen Tabelle, blau markiert.

Von den untersuchten Defizienzen des zweiten und dritten Chromosoms schwächen nur zwei, Df(2L)N22-14 (#2892) und Df(2L)TE35BC-24 (#3588), die Entwicklungsstörungen der Kutikula von Tieren der beiden amorphen *stardust*-Allele *sdt*^{XP96} und *sdt*^{XN05} ab. Diese beiden Defizienzen wurden bereits im vorherigen Test als starke Suppressoren des Phänotyps von *crumbs*-Mutanten identifiziert.

In den meisten anderen Fällen findet, wenn überhaupt, eine geringfügige Abschwächung der Fehlbildung der Kutikula bei Embryonen des *sdt*-Allels *sdt*^{XN05} statt, nicht aber bei denen des zweiten amorphen Allels *sdt*^{XP96}.

Die Abschwächung des mutanten *stardust*-Phänotyps durch die jeweiligen Defizienzen fällt jedoch in allen Fällen bedeutend geringer aus als die zuvor bei *crumbs*-Mutanten beobachtete. Nur selten finden sich Suppressoren der Klasse 3 und in keinem Falle Suppressoren der Klasse 4.

Die Untersuchung einer Abschwächung des mutanten *bazooka*-Phänotyps durch die Defizienzen ergab nur drei potentielle, aber nicht sehr wirksame Kandidaten. Die in diesem Falle verwendete *bazooka*-Mutante (*baz*^{Xi106}) weist von vorne herein einen stark variablen Phänotyp auf, so dass die Abschwächung ihrer Wirkung auf den Phänotyp nicht mit absoluter Sicherheit als echt identifiziert werden kann. Eine der drei gefundenen Defizienzen, Df(2L)N22-14 (#2892), die den mutanten *baz*-Phänotyp abschwächen kann, wurde bereits vorher als Enhancer des dominanten Augenphänotyps sowie als Suppressor des mutanten Kutikulaphänotyps bei Tieren mit den beiden mutanten *crumbs*- und *stardust*-Allele gefunden.

4.2.2.3 Auswahl von Kandidatenregionen für weitere Untersuchungen

Basierend auf der im ersten Screen beobachteten Modifikation des Augenphänotyps sowie auf der folgenden Abschwächung des mutanten *crumbs*-Phänotyps der Kutikula im Embryo wurden die folgenden Kandidatenregionen (in den vorherigen Tabellen blau markiert) in die engere Auswahl gezogen (Tab. 4.11):

Defizienz Df(1)w258-42 (#733) zeigte sowohl im Modifier-Screen als auch bei den Versuchen zur Abschwächung des mutanten *crumbs*-Phänotyps unterschiedliche Wirksamkeit. Da dies möglicherweise ein Zeichen dafür ist, dass der Stamm genetisch uneinheitlich ist, wurde er nicht in die nähere Auswahl mit einbezogen und aus der Kandidatenliste gestrichen.

Zwei weitere Defizienzen, Df(1)v-N48 (#3560) und Df(2L)net-PMF (#3638) beinhalten Gene, *discs large1* (*dlg*, Koh et al., 1999) und *lethal(2)giant larvae* (*l(2)gl*, Mechler et al., 1985), die bereits in einem ähnlichen Modifier-Screen als funktionelle Interaktionspartner von Crumbs identifiziert worden waren (Tanentzapf und Tepass, 2003). Daher wurden diese Defizienzen ebenfalls aus der Kandidatenliste gestrichen. Mutanten von *dlg* und *l(2)gl* wurden bislang nicht getestet.

Von vier weiteren Defizienzen betreffen jeweils zwei die gleiche Region und (möglicherweise) das gleiche Gen in der defizienten Region. Die defizienten Linien #2984 und #949 tragen hierbei die gleiche Defizienz, Df(1)C128, in der chromosomalen Region 07D, allerdings vor einem unterschiedlichen mutanten Hintergrund (vgl. Liste der Defizienzen im Anhang). Linien #3138 und #3588 beinhalten die Defizienzen Df(2L)b87e25 und Df(2L)TE35BC-24 und überlappen in der chromosomalen Region 35B4-C1.

Defizienz	Name	Bruchpunkte	möglicher Kandidat
Def #733	Df(1)w258-42	03A4-6; 03C5-6	???
Def # 940	Df(1)A113	03D6-E1; 04F5 (03D6-E1; 0415-16)	???
Def # 2984	Df(1)C128	07D1; 07D5-6	???
Def # 949	Df(1)C128	07D1;07D5-6	???
Def # 3560	Df(1)v-N48	09F; 10C3-5	<i>discs large</i>
Def # 3638	Df(2L)net-PMF	21A1; 21B7-8	<i>lethal (2) giant larvae</i>
Def # 2892	Df(2L)N22-14	29C1-2; 30C8-9	???
Def # 3138	Df(2L)b87e25	34B12-C1; 35B10-C1	???
Def # 3588	Df(2L)TE35BC-24	35B4-6; 35F1-7	???
Def # 2583	Df(2L)cact-255rv64	35F-36A; 36D	???
Def # 190	Df(2R)en-A	47D3; 48B2	???

Tab 4.11: Liste der für weitere Kartierungen ausgewählten Defizienzen

Von den ursprünglich im Rahmen des Modifier-Screens gefundenen 88 Modifikatoren blieben somit 8 starke Enhancer übrig (fett gedruckt), die in 6 verschiedene genomische Regionen des ersten und zweiten Chromosoms fallen.

Diese Regionen wurden, um eine weitere Auswahl zu treffen, mit Hilfe kleinerer Defizienzen näher kartiert, d.h. wiederum auf Modifikation des Augenphänotyps und Abschwächung der phänotypischen Wirkung der *crumbs*-Mutationen im Embryo hin untersucht. Letztendlich wurden zwei Defizienzen für weiterführende Analysen ausgewählt.

4.2.3 Abschließende Kartierung der gefundenen Kandidatenregionen

Alle sechs in die nähere Auswahl genommenen Kandidatenregionen wurden mit Hilfe kleinerer Defizienzen auf Modifikation des Augenphänotyps bzw. Abschwächung des mutanten *crumbs*-Phänotyps in der Kutikula hin getestet. Aufgrund ihrer Eigenschaften erschienen zwei Regionen, 07D1-6 (Df(1)C128, Linien #2894 und #949) und 29C-30C (Df(2L)N22-14, Linie #2892) für eine abschliessende Kartierung als besonders geeignet. 07D1-6 ist eine relativ kleine Region, und Tests mit P-Element-induzierten Mutationen, die auf Modifikation des Augenphänotyps und Abschwächung des mutanten *crumbs*-Phänotyps hin getestet wurden, erbrachten positive Ergebnisse. Daher wurde die Defizienz mit der Aussicht gewählt, dass es mit Hilfe der P-Elemente schnell und einfach möglich sein würde, das für Modifikation und Abschwächung verantwortliche Gen zu identifizieren. In der anderen Defizienz, Df(2L)N22-14, wurde im Rahmen weiterer Kartierungen schnell ein Kandidat ermittelt, der als möglicher funktioneller Interaktionspartner von Crumbs in Frage kommen könnte. Dies und die Tatsache, dass Df(2L)N22-14 in der Lage ist, die mutanten Phänotypen aller getesteten *crb*-, *std*- und *baz*-Allele abzuschwächen, machten die Region zu einem interessanten Kandidaten.

Die detaillierten Ergebnisse der abschließenden Kartierungen dieser beiden Regionen werden im weiteren vorgestellt.

Die modifizierenden bzw. für eine Abschwächung verantwortlichen Regionen der vier anderen Defizienzen konnten trotz Kartierung mit Hilfe kleinerer Defizienzen nicht genauer eingegrenzt werden. Die entsprechenden Regionen wurden in dieser Arbeit daher nicht näher untersucht. Die Daten finden sich jedoch der Vollständigkeit halber im Anhang bzw. sind in der zusammenfassenden Tabelle am Ende dieses Kapitels mit aufgeführt.

4.2.3.1 Region 07D1-6 (Df(1)C128, Linien # 2894 und # 949)

Region 07D1-6 auf dem ersten Chromosom ist eine der beiden Regionen, die im Rahmen dieses Screens einer abschliessenden Kartierung unterzogen wurden (siehe Karte, Abb. 4.34).

Im Modifier-Screen wurden zwei Linien gefunden, #2894 und #949, die laut zytologischer Kartierung beide für die Region 07D1-6 defizient sind und die gleiche Defizienz, Df(1)C128, allerdings vor einem unterschiedlichen genetischen Hintergrund tragen (vgl. Tabelle im Anhang).

Im Vergleich zu den anderen fünf Defizienzen handelt es sich hier um eine kleine Deletion, die allerdings noch immer ca. 20 mögliche Kandidatengene umfasst (Angaben basierend auf den Angaben der GAD-Fly Internet-Seite).

Zwei an diese Region angrenzende Defizienzen, Df(1)RA2 (#950) und Df(1)GE202 (#1879), grau gekennzeichnet, agieren als sehr schwacher Suppressor des Augenphänotyps bzw. zeigen keine Modifikation. Es kann jedoch keine genaue Aussage über den nicht-überlappenden Bereich, 07D6-10, zwischen Df(1)RA2 (#950) und Df(1)C128 gemacht werden, für den keine Defizienzen zur Verfügung standen und der daher nicht auf Modifikation getestet werden konnte.

Möglicherweise bedingt durch den unterschiedlichen genetischen Hintergrund agiert Defizienz Df(1)C128 in den beiden gefundenen Linien als unterschiedlich starker Enhancer im Auge (Klasse E2 und E4), zeigt jedoch eine nahezu gleich starke Abschwächung der Wirkung der beiden getesteten *crb*-Allele (Klasse S2-3, Abb. 4.35). Kutikula-Präparationen von Embryonen, die homo- oder hemizygot für die Defizienz sind, zeigen einen mutanten Phänotyp, der Defekte des dorsalen Schlusses aufweist (Abb. 4.35 A, Pfeil) und für beide Linien ebenfalls identisch ist. Kopfskelett, ventrale Zähnchenbänder und Filzkörper der Kutikula sind hierbei intakt, jedoch befindet sich ein Loch im dorsalen Bereich des Embryos (in Abb. 4.35 A Zähnchenreihen etwas ausserhalb der Fokusebene, markiert durch schwarzen Pfeilkopf).

Da keine weiteren Defizienzen in der entsprechenden Region zur Verfügung standen, mit deren Hilfe Defizienz Df(1)C128 näher hätte eingegrenzt werden können, wurde stattdessen versucht, die Region mit Hilfe von zumeist homozygot letalen P-Element-Insertionen zu kartieren. In der folgenden Tabelle (Tab. 4.12) und Karte (Abb. 4.34) sind die verwendeten, P-Element-induzierte Mutationen sowie ihre Modifizierung des Augenphänotyps und ihre Wirksamkeit bei der Abschwächung des Phänotyps der *crumbs*-Kutikula-Mutanten angegeben.

Für die verwendeten P-Elemente, markiert mit einem Dreieck, wird in der Karte, wie bei den Defizienzen, eine Region angegeben, obwohl P-Elemente nur an einer Stelle ins Genom inserieren. Dieser Insertionsort war jedoch in den meisten Fällen unbekannt, da die meisten der verwendeten P-Elemente zuvor nur grob kartiert worden waren. So wird in der Karte, basierend auf den Daten der Flybase-Datenbank, ein Bereich angegeben, in dem die P-Elemente ins Genom integriert worden sind.

Linie Nr.	Region /Bruchpkt.	Kutikula-Phänotyp	X GMR-Gal4-38.1.2b	X <i>crb</i> ^{11a22} Kutikula	X <i>crb</i> ^{8F105} Kutikula
Def # 2984 Df(1)C128	07D1; 07D5-6	dorsal offen	Enhancer E 2	Suppressor 2-3	Suppressor 2-3
Def # 949 Df(1)C128	07D1; 07D5-6	dorsal offen	Enhancer E 4	Suppressor 3	Suppressor 3
P – 12260 P{lacW}I(1)G04 59 ^{G0459}	07D	18°C/RT/29°C: Mix + dorsal offen	Enhancer E 2-3	S 0-1	Suppressor 2
P – 12246 P{lacW} I(1)G0348 ^{G0348}	07D	-----	E 0	S0	-----
P – 10547 P{sev2}ch41	07D1-2	vital	Enhancer E 1	S 0-1	Suppressor 2
P – 11861 P{lacW}I(1)G ⁰¹⁹³	07D1-3	-----	E 0	S0	-----
P – 11289 P{lacW}I(1)G02 36 ^{G0236}	07D1-9	vital	Enhancer E 1	Suppressor 1	Suppressor 2-3
P – 10097 P{EP}fs(1)h [EP439]	07D3-4	-----	E 0	S0	-----
P – 10098 P{EP}fs(1)h [EP1033]	07D5-7	-----	E 0	S0	-----
P – 11862 P{lacW}I(1)G02 33 ^{G0233}	07D5-9	-----	E 0	S0	-----
P – 11863 P{lacW}G0199a	07D10-14	-----	E 0	S0	-----
P – 12125 P{lacW}I(1)G00 93 ^{G0093}	07D3-4	18°C/RT/29°C: Mix + dorsal offen	Enhancer E 2-3	Suppressor 1	Suppressor 2
P – 11964 P{lacW}I(1)G02 81 ^{G0281}	07D3-4	wildtypisch, selten Zähndef.	Enhancer E 1	Suppressor 1-2	Suppressor 2-3
P – 845 P{lacW} sn ^{AL2}	07D1-2	-----	E 0	S0	-----
P – 783 P{A92}sn ^{P1}	07D1-2	-----	E 0	Suppressor 1	-----
P – 839 P{A92}sn ^{P2}	07D1-2	vital	E 0 (-1)	Suppressor 1	Suppressor 1
P – 11264 P{lacW}I(1)G02 81 ^{G0281}	07D1-2	-----	E 0	S0	-----
P – 11822 P{lacW}G0113b	07D1-2	-----	E 0	S0	-----
PL 4	07D1	wildtypisch, sehr selten	E 0	Suppressor 2-3	Suppressor 2 -3
PL 53	07D1	Kopf- und	E 0	Suppressor 1	Suppressor 2 -3
PL 85	07D1	dorsale Schlussdefekte	E 0	Suppressor 1-2	Suppressor 2 -3
sn ³	07D2	vital	E 0	S 0	S 0

Linie Nr.	Region /Bruchpkt.	Kutikula-Phänotyp	X GMR-Gal4-38.1.2b	X <i>crb</i> ^{11a22} Kutikula	X <i>crb</i> ^{8F105} Kutikula
<i>mys</i> ^{ts2}	07D5-7	wildtypisch (larval letal)	E 0	S 0	Suppressor 1-2
<i>mys</i> ^{olFC-x3}	07D5-7	wildtypisch	E 0	S 0	Suppressor 1
<i>mys</i> ^{ts2}	07D5-7	undifferenziert	E 0	S 0	Suppressor 1
5284 <i>fs(1)h</i> ¹	07D3-4	Kopf defekt, post. offen	E 0	S 0	Suppressor 1-2
5285 <i>fs(1)h</i> ¹⁸	07D3-4	Kopf defekt, post. offen	E 0	S 0	Mix: Suppressor 2-3 + <i>fs(1)h</i> - Kutikula
5286 <i>fs(1)h</i>	07D3-4	Kopf defekt, post. offen	E 0	S 0	Suppressor 1-2
5278 <i>fs(1)h</i>	07D3-4	wildtypisch	E 0	S 0	Suppressor 1

Tab. 4.12: Für die Kartierung der Region 7D1-6 verwendete Defizienzen und P-Element-Insertionslinien, ihr Kutikulaphänotyp, Modifikation des rauhen Augenphänotyps sowie Abschwächung der Auswirkungen der beiden *crumbs*-Allele auf die Kutikulaentwicklung

Wie aus Abbildung 4.34 bzw. der Tabelle 4.12 zu entnehmen, wurden mehrere P-Element-induzierte Mutationen gefunden, die den Augenphänotyp in unterschiedlichem Maße modifizieren und die beiden mutanten *crumbs*-Phänotypen abschwächen können: P-12260, P-11289, P-10547, P-839, P-12125 und P-11964.

In Abb. 4.35 E-H wird als Beispiel die Abschwächung der beiden mutanten *crumbs*-Phänotypen *crb*^{11A22} und *crb*^{8F105} durch Kreuzung mit zwei dieser P-Element-Insertionslinien (P-11964 und P-12125) gezeigt. Im Vergleich dazu ist die Abschwächung der beiden mutierten Phänotypen durch die im Screen gefundene Defizienz Df(1)C128 (#949) dargestellt (4.35C-D).

Zusätzlich wurden drei weitere Linien mit in der Region 07D1 inserierten P-Elementen getestet (die Linien wurden mir von H-M. Bourbon zur Verfügung gestellt, Bourbon et al., 2002), die zwar im ersten Test keine Modifikation des rauhen Augenphänotyps zeigten, die jedoch die Störung der Kutikulaentwicklung beider *crumbs*-Allele in unterschiedlichem Maße aufheben konnten: PL4, PL53 und PL85.

Abb. 4.36 (E-H) zeigt die Wirkung der Einkreuzung dieser drei P-Element-Insertionslinien auf den Phänotyp von Tieren des *crumbs*-Allels *crb*^{8F105}.

Obwohl alle diese aufgelisteten Linien den mutanten *crumbs*-Phänotyp der beiden *crumbs*-Allele in unterschiedlichem Maße abschwächen können, weist keine von ihnen einen der Defizienz Df(1)C128 vergleichbaren Kutikula-Phänotyp auf. Die Tiere mit einer der drei in 07D1 lokalisierten P-Element-Insertionen haben entweder eine wildtypische Kutikula auf oder, selten, Embryonen mit Kopf- und Differenzierungsdefekten, verbunden mit leichten Defekten des dorsalen Schlusses (4.36 B).

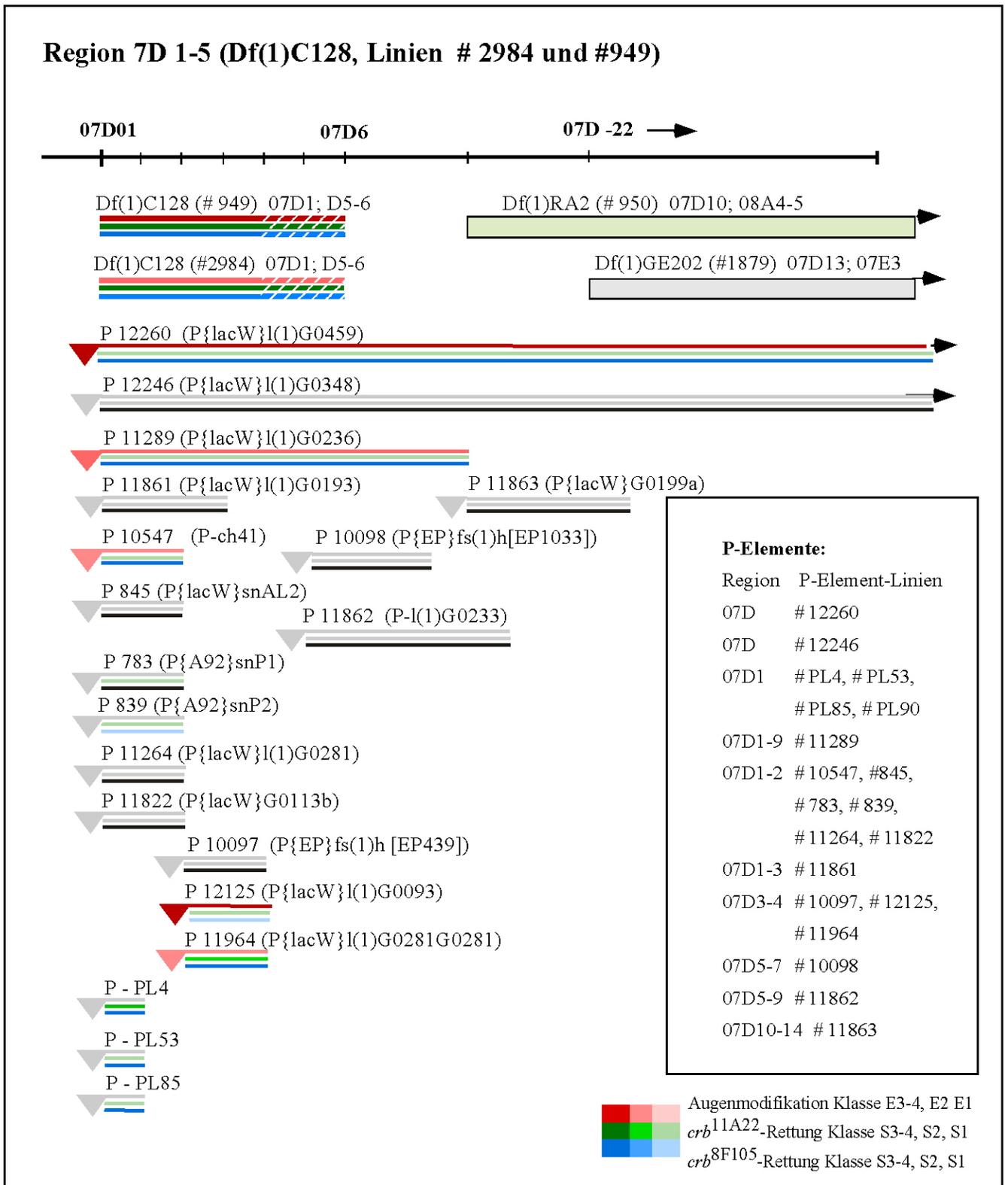


Abb. 4.34: Nähere Kartierung von Defizienz Df(1)C128 (Linien #2984 und #949), Region (07D1;07D5-6)

Defizienzen Df(1)C128, Df(1)RA2 und Df(1)GE202 wurden im ursprünglichen Screen gefunden. Df(1)RA2 agiert als schwacher Suppressor des Augenphänotyps, Df(1)GE202 zeigt keine Modifikation. In den anderen untersuchten Defizienzen und P-Element-induzierten Mutationen wird eine Modifizierung des rauhen Augenphänotyps unterschiedlicher Stärke durch einen rot/rosafarbenen Balken gekennzeichnet, grün und blau kennzeichnet eine Rettung des mutanten Phänotyps der beiden *crumbs*-Allele *crb*^{11A22} und *crb*^{8F105}. In grau gekennzeichnete Balken stehen für fehlende Modifikation oder Rettung, schwarze Balken dafür, dass der entsprechende Versuch nicht durchgeführt wurde. Details zur Kartierung siehe Text und Tabelle 4.12.

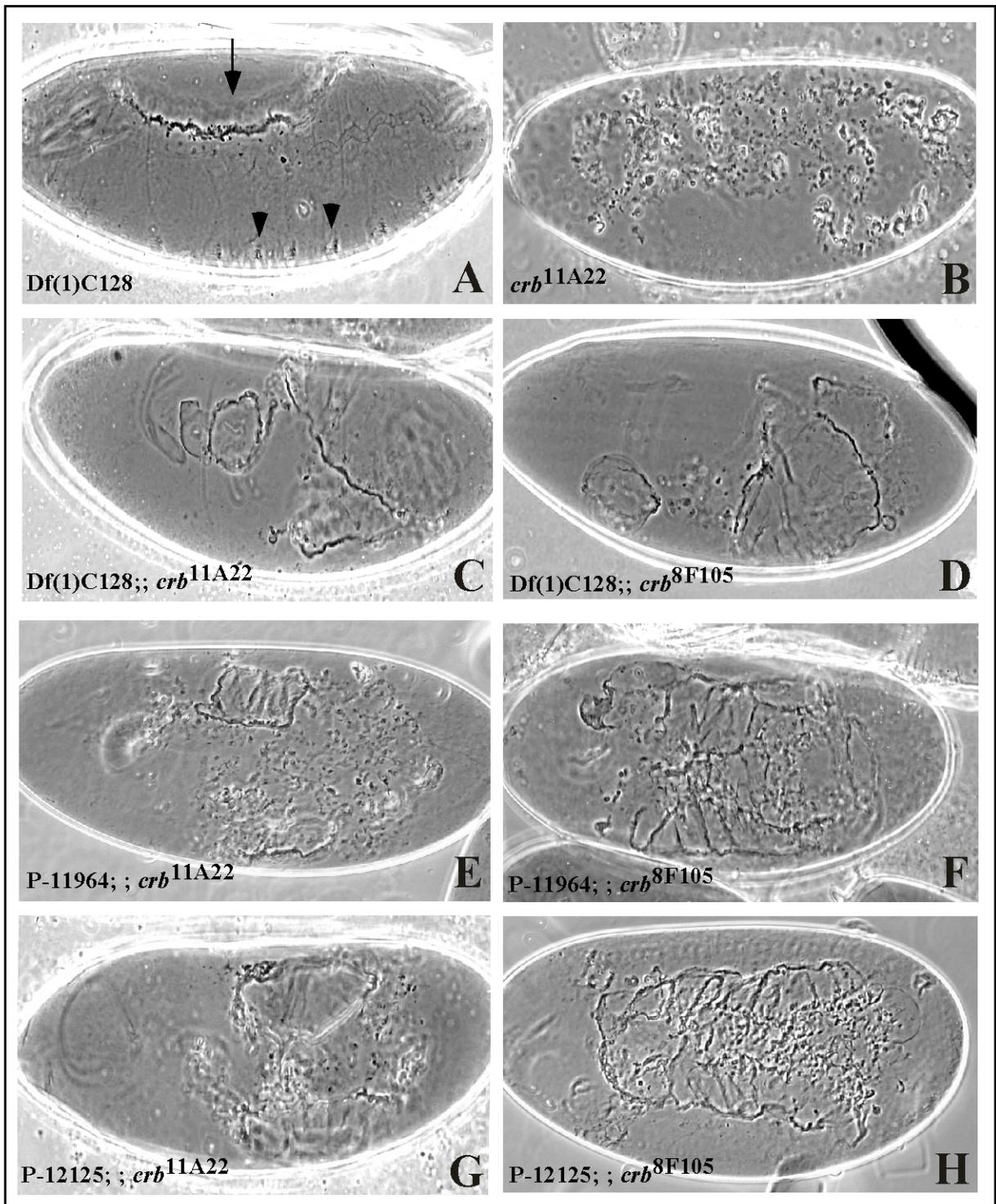


Abb. 4.35: Rettung des mutanten *crumbs*-Phänotyps durch Defizienz Df(1)C128 und P-Element-Mutationen P-1194 und P-12125

(A) Defizienz Df(1)C128 weist einen Kutikulaphänotyp mit Defekten des dorsalen Schlusses auf (Pfeil).

(B) mutanter *crumbs*-Phänotyp der Allele *crb*^{11A22} und *crb*^{8F105}.

(C-H) Abschwächung des mutanten *crumbs* Phänotyps der Allele *crb*^{11A22} (C, E und F) und *crb*^{8F105} (D, F und H) durch Kreuzung mit der Defizienz Df(1)C128 bzw. mit den P-Element-Insertionslinien P-11964 und P-12125.

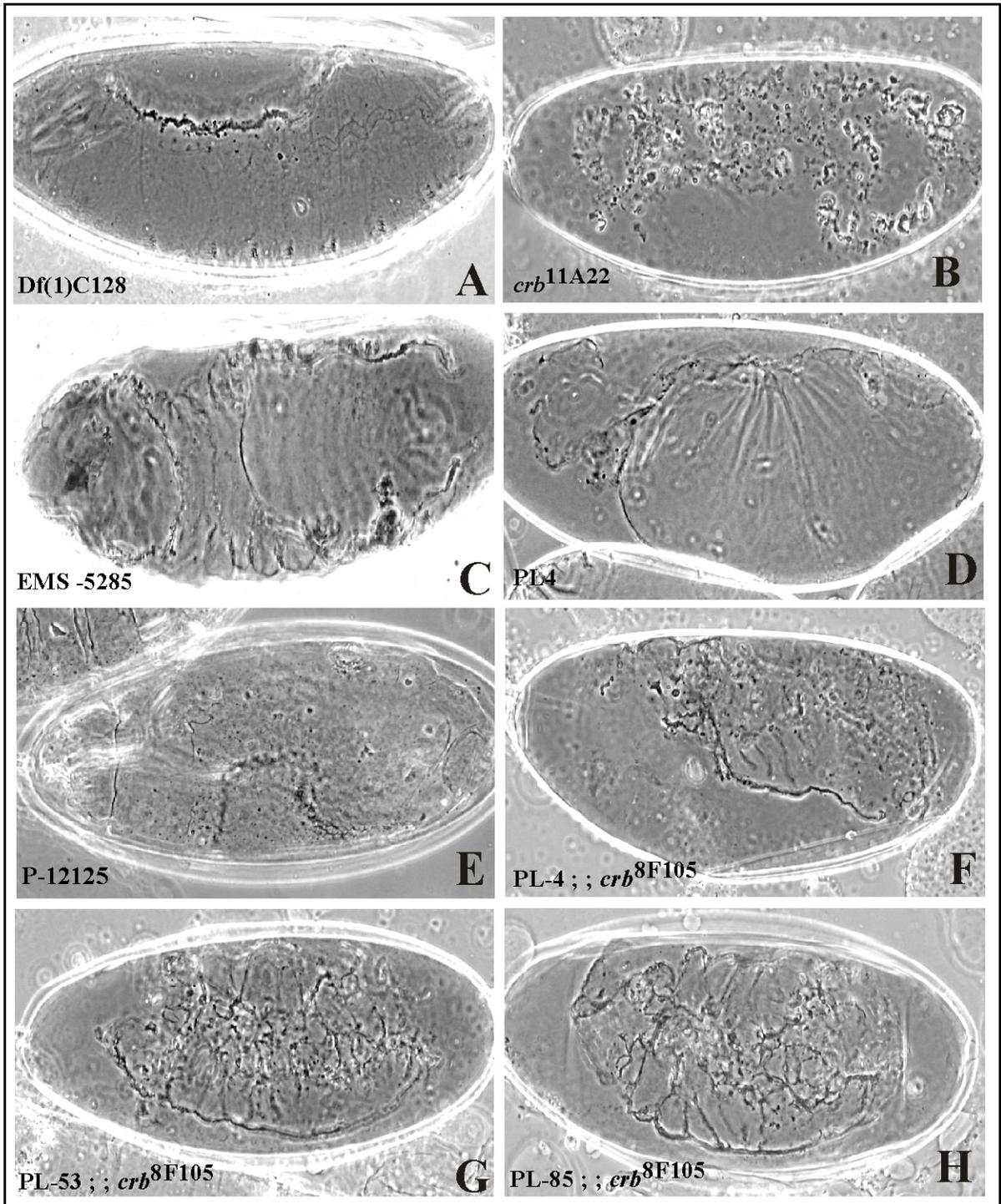


Abb. 4.36: Kutikulaphänotypen verschiedener Mutanten der Region 07D1-6 und Abschwächung des mutanten *crumbs*-Phänotyps des Allels *crb*^{8F105} durch Kreuzung mit drei P-Element-Linien

(A) Die Kutikula der Defizienz Df(1)C128 weist Defekte des dorsalen Schlusses auf. (B) mutanter *crumbs*-Phänotyp von Allel *crb*^{11a22}, welcher nur noch Kutikulakrümel erkennen lässt. (C) Die Kutikula des EMS-Allels der Linie #5285 (betrifft Gen *fs(1)h*) zeigt in ventraler Sicht Defekte des Kopfes sowie der ventralen Kutikula. (D) Linie PL4 weist Defekte des Kopfes sowie des dorsalen Schlusses auf. Zudem ist die Kutikula wenig differenziert und die Zähnenbänder entweder stark reduziert oder nicht vorhanden. (E) P-Element-Insertion P-12125 (betrifft Gen *fs(1)h*) zeigt einen zumeist verkürzten Embryo mit wenig differenzierter Kutikula, dessen Segmentierung ebenfalls stark reduziert ist. (F-H) Rettung des mutanten *crumbs*-Phänotyps des Allels *crb*^{8F105} durch Kreuzung mit drei P-Element-Insertionslinien, lokalisiert in 07D1. Details siehe Text und Tabelle 4.12.

Die Linien P-12260 und P-12125 zeigen variable Phänotypen, die von einer Verkürzung des Embryos, verbunden mit Segmentierungsdefekten (Abb. 4.36D) bis hin zu stark undifferenzierten Embryonen reichen. Tests (Haltung bei RT, 25°C und 29°C) haben gezeigt, dass diese Defekte temperaturunabhängig sind. Die Kutikula der Linie P-11964 ist wenig differenziert, verbunden mit einer Reduktion der Zähnchenbänder. P-11289, P-10547 und P-839 schliesslich sind vital, und bei einer Eiablage bleiben keine Embryonen mit auffälligen Kutikuladefekten liegen.

Um festzustellen, welches Gen bzw. welche Gene in dieser Region für die Modifikation und Abschwächung des *crumbs*-Phänotyps verantwortlich ist/sind, wurde versucht, die P-Elemente, die durch ihre Insertion ins Genom und Mutation eines bestimmten Gens den Augenphänotyp modifizieren und den mutanten *crumbs*-Kutikula-Phänotyp abschwächen können, näher zu kartieren. Für einen Teil der Linien war der Insertionsort bereits bekannt. Für die restlichen Linien wurde die Methode der Inversen PCR verwendet, in der die an ein P-Element angrenzenden Sequenzen genomischer DNA identifiziert werden. Mittels eines Sequenzvergleichs per Computer kann dann der genaue Insertionsort der P-Elemente ermittelt werden.

Während die Versuche von mir durchgeführt wurden, wurde jedoch eine Arbeit veröffentlicht (Peter et al., 2002), im Rahmen derer die entsprechenden P-Elemente kartiert worden waren. Daher wurden die von mir begonnenen Kartierungsversuche abgebrochen. Alle Angaben über die Insertionsorte der P-Elemente stammen entweder aus Flybase, aus Peter et al., (2002), bzw. für die vier P-Element-Insertionen der Region 07D, aus der Arbeit von H-M. Bourbon (Bourbon et al., 2002).

Durch P-Element-Insertion betroffene Gene:

P-Element	Gen / Insertionsort	Region	Funktion
PL-4, PL-53, PL-85	unbekannt	X; 7D1-7D1	E3 Ubiquitin-Protein-Ligase
P-839	<i>singed (sn)</i> nicht bestimmte	X; 7D2-7D2	Aktin Bündelung
P-12260	<i>fs(1)h</i> (Insertion im zweiten Intron von <i>fs(1)h</i>)	X; 7D5-7D6	Transkriptionsfaktor
P-12125	<i>fs(1)h</i> (Insertion im vierten Exon von <i>fs(1)h</i>)		Transkriptionsfaktor
P-12289	<i>myspheroid</i> nicht bestimmt	X; 7D6-7D6	Kodiert für die PS β -Untereinheit des Integrins, beteiligt an Muskel- und ZNS-Entwicklung
P-10547	<i>myspheroid</i> nicht bestimmt	X; 7D6-7D6	
P-11964	<i>myspheroid</i> Insertion im ersten Intron von <i>mys</i>	X; 7D6-7D6	

Tab. 4.13: Auflistung der für die Modifikation bzw. Abschwächung verantwortlichen P-Elemente und der von ihnen betroffenen Gene

Die Kartenposition der drei letalen P-Elemente sowie ihr genauer Insertionsort sind der FlyBase-Datenbank zu entnehmen.

Aufgrund der genauen Kartierung der P-Element-Insertionen ergaben sich vier mögliche Kandidaten, die als potentielle funktionelle Interaktionspartner von Crumbs in Frage kamen. Um festzustellen, welches Gen letztendlich das gesuchte ist, wurden verschiedene Ansätze gewählt:

Zum einen wurden weitere mutante Allele der Gene *singed (sn)*, *female sterile(1)homeotic (fs(1)h)* und *mysospheroid (mys)* getestet (siehe Tabelle 4.2.4), um festzustellen, ob die Modifikation des Auges bzw. Abschwächung der mutanten *crumbs*-Phänotypen in diesen zusätzlichen mutanten Allelen reproduzierbar sind.

Zum anderen wurde versucht, die P-Elemente, die die Mutation der jeweiligen Gene auslösen, in den letalen P-Element-induzierten Linien (PL4, PL53, PL85, P-12260, P-12125 und P-11964) mittels Transposase zu mobilisieren und hierdurch die von ihnen ausgelöste Mutation zu revertieren. Normalerweise sind in diesen Linien nur die Weibchen, die die P-Element-Mutation heterozygot über einem Balancerchromosom tragen, lebensfähig. Die Männchen der jeweiligen Linien tragen alle hemizygot das Y-Chromosom über dem Balancerchromosom. Die Klasse, die die Mutation über dem Y-Chromosom trägt, ist nicht lebensfähig. Durch eine präzise Exzision des P-Elements, d.h. ein Heraustrennen des P-Elements aus dem Genom, ohne dass genomische DNA dabei mit entfernt wird, sollten Männchen entstehen, in denen die zuvor letale Mutation/Y-Klasse lebensfähig ist. Diese Revertanten wurden im Bezug auf Modifikation des Augenphänotyps bzw. Abschwächung des mutanten *crumbs*-Phänotyps getestet, um festzustellen, ob sie noch immer die gleichen Ergebnisse aufweisen wie die ursprünglichen P-Element-Insertionen, d.h. ob sie noch immer den Augenphänotyp modifizieren bzw. den mutanten *crumbs*-Phänotyp abschwächen können, oder ob sich andere Veränderungen ergeben haben.

Zusammenfassung der Zusatzuntersuchungen:

Linie		Enhancer-Klassen	Abschwächung von <i>crb</i> ^{11A22}	Abschwächung von <i>crb</i> ^{8F105}
Df(1)C128 (#949)	letal	Enhancer E4	Suppressor 3	Suppressor 3
PL4	letal	E 0	Suppressor 2-3	Suppressor 2-3
PL53	letal	E 0	Suppressor 1	Suppressor 2-3
PL85	letal	E 0	Suppressor 1-2	Suppressor 2-3
P-Elemente dieser drei Linien ließen sich nicht aktivieren				
P-839 (<i>sn</i>)	vital	E 0 (-1)	Suppressor 1	Suppressor 1
Da P839 vital ist wurde nicht versucht, das P-Element zu aktivieren.				
<i>sn</i> ³	vital	E 0	S 0	S 0
P-12260 (<i>fs(1)h</i>)	letal	Enhancer 2-3	S 0 (-1)	Suppressor 2
P-12260-rev ¹	vital	E 0	S 0	Suppressor 1
P-12260-rev ²	vital	E 0	S 0	Suppressor 1
EMS-5278	letal	E 0	S 0	Suppressor 1
EMS-5284	letal	E 0	S 0	Suppressor 1-2
EMS-5285	letal	E 0	S 0	Suppressor 2-3

Linie		Enhancer-Klassen	Abschwächung von <i>crb</i> ^{11A22}	Abschwächung von <i>crb</i> ^{8F105}
EMS-5286	letal	E 0	S 0	Suppressor 1-2
P-12125 (<i>fs(1)h</i>)	vital	Enhancer 2-3	Suppressor 1	Suppressor 2
P-12125-rev ¹	vital	E 0	S 0	Suppressor 1
P-12125-rev ²	vital	E 0	S 0	Suppressor 1
P-12289 (<i>mys</i>)	letal	Enhancer 1	Suppressor 1	Suppressor 2-3
P-10547 (<i>mys</i>)	vital	Enhancer 1	S 0 (-1)	Suppressor 2
P-11964 (<i>mys</i>)	letal	Enhancer 1	Suppressor 1-2	Suppressor 2-3
P-11964-rev ¹	vital	E 0	S 0	Suppressor 1
P-11964-rev ²	vital	E 0	S 0	Suppressor 1
<i>mys</i> ^{ts2}	larval letal	E 0	S 0	Suppressor 1
<i>mys</i> ^{offC-x3}	vital	E 0	S 0	Suppressor 1

Tab. 4.14: Zusammenfassung der Zusatzuntersuchungen

Im Rahmen dieser zwei Versuchsansätze ergab sich, dass *singed* mit größter Wahrscheinlichkeit als möglicher Kandidat ausgeschlossen werden kann. Das ursprünglich getestete P-Element (P-839) reagierte bereits in Bezug auf Modifikation und Abschwächung des mutanten *crb*-Phänotyps sehr schwach und ein weiteres Allel (*sn*³) weist im Auge keine Modifikation und bei einer Kreuzung mit beiden mutanten *crumbs*-Allelen ebenfalls keine Abschwächung des mutanten Kutikulaphänotyps auf. Es ist also eher unwahrscheinlich, dass *singed* als funktioneller Interaktionspartner von *Crumbs* in Frage kommt.

Für die drei anderen Gene ist es nach diesen Zusatzuntersuchungen nicht möglich, eine eindeutige Entscheidung zu treffen, welches der drei Gene für die beobachtete Modifikation und Abschwächung des mutanten *crumbs*-Phänotyps verantwortlich ist.

Die drei in 07D1 inserierten P-Elemente, die eine bislang unbekannte E3-Ubiquitin-Protein-Ligase betreffen, modifizieren den rauhen Augenphänotyp nicht, sind aber in der Lage in unterschiedlichem Maße den mutanten Kutikula-Phänotyp der beiden Allele *crb*^{11A22} und *crb*^{8F105} zu abschwächen.

Versuche, die P-Elemente mittels Transposase zu aktivieren und dadurch die induzierte Mutation zu revertieren, scheiterten. Aus den Kreuzungen gingen keine Revertanten (erkennbar an ihrer Augenfarbe) hervor, so dass die anschließenden Versuche nicht durchgeführt werden konnten. Möglicherweise befindet sich auf dem 1. Chromosom dieser Linien noch eine weitere Letalmutation, was dazu führt, dass die Revertanten trotz Mobilisierung des letalen P-Elementes nicht überleben. Bislang wurde dies jedoch noch nicht getestet. Die Frage, ob durch Exzision der letalen P-Elemente das ursprüngliche Gen wiederhergestellt werden, und dadurch die Abschwächung des Phänotyps der beiden *crumbs*-Allele unterbunden werden kann, ist somit nicht zu beantworten.

Für *fs(1)h* und *myospheroid* sind die Ergebnisse der getesteten Zusatzmutanten bzw. der P-Element-Mobilisierung ebenfalls nicht eindeutig. Die ursprünglich getesteten P-Element-Insertionen zeigen sowohl eine Modifikation des Augenphänotyps als auch eine Abschwächung der beiden mutanten *crumbs*-Phänotypen.

Zusätzlich getestete *fs(1)h* und *mys*-Allele (vier EMS-induzierte Mutationen von *fs(1)h* und zwei EMS-induzierte *mys*-Allele, vgl. Tab. 4.2.4 und 4.2.6) zeigen in allen Fällen keine Modifikation des Augenphänotyps. Ebenfalls schwächer fällt in diesen Linien die Abschwächung der beiden mutanten Kutikula-Phänotypen aus. Der mutante Phänotyp von *crb*^{11a22} wird überhaupt nicht abgeschwächt und der von *crb*^{8F105} nur schwach. Diese Ergebnisse sprechen eher gegen eines der beiden Gene, *mys* oder *fs(1)h*, als mögliche Interaktionspartner von *crumbs*.

Bei einer Mobilisierung der drei letalen, in *fs(1)h* und *mys* inserierten, P-Elemente konnte bei einer Kreuzung der daraus resultierenden revertierten Männchen mit GMR-Gal4-*crb*^{intra38.1.2b} keine Modifikation des rauhen Augenphänotyps mehr beobachtet werden, d.h. offensichtlich kann der Augenphänotyp nach einer Wiederherstellung der jeweiligen Gene nicht mehr modifiziert werden.

Dies wiederum würde für eine mögliche Rolle der Gene *mys* und *fs(1)h* als funktionelle Interaktionspartner von *crumbs* sprechen.

Die Abschwächung des mutanten *crumbs*-Kutikula-Phänotyps durch diese Revertanten ist nur sehr schwach, in einer Kreuzung mit *crb*^{8F105} jedoch noch vorhanden. Dies würde dafür sprechen, dass ein Teil der beobachteten abschwächenden Wirkung der ursprünglichen P-Elemente auf der Mutation der Gene *fs(1)h* oder *mys* zurückzuführen ist. Diese Wirkung in Teilbereichen lässt sich durch die Exzision der P-Elemente unterbinden. Ein anderer Teil der Abschwächung des *crumbs*-Phänotyps scheint aber unabhängig von den Genen *fs(1)h* oder *mys* stattzufinden. Er kann trotz Exzision der P-Elemente nicht rückgängig gemacht werden. Dies bedeutet, dass durch die Exzision der P-Elemente aus den Genen *fs(1)h* und *mys* zwar die Modifikation des Augenphänotyps, nicht aber die Rettung des mutanten Kutikula-Phänotyps von *crumbs*-Allelen vollständig aufgehoben werden kann.

Basierend auf diesen Ergebnissen kommen die von diesen drei Genen, dem Gen für eine potentielle E3-Ubiquitin-Ligase sowie den Genen *fs(1)h* oder *mys*, kodierten Proteine weiterhin als funktionelle Interaktionspartner von Crumbs in Frage. Möglicherweise ist auch eine Kombination von zwei oder aller drei Faktoren verantwortlich für die beobachtete Modifikation des Augenphänotyps und Abschwächung des mutanten Phänotyps bei Tieren mit einem der untersuchten beiden *crumbs*-Allele.

4.2.3.2 Region 29C-30C (Df(2L)N22-14, Linie # 2892)

Region 29C-30C, lokalisiert auf dem zweiten Chromosom von *Drosophila*, ist die zweite Region, die im Rahmen des Screens genauer kartiert wurde. Wie Tabelle 4.15 und der dazu gehörigen Karte (Abb. 4.37) zu entnehmen ist, wurde Defizienz Df(2L)N22-14 als Modifikator der Klasse E2 des rauen Augenphänotyps gefunden. Mit Hilfe von zwei weiteren Defizienzen, Df(2L)TE29Aa-11 (#179) und Df(2L)s1402 (#556), welche den Augenphänotyp nicht modifizieren oder nur leicht abschwächen, konnte die Region von Interesse auf 29C1-2; 30C1-2 eingegrenzt werden.

Homozygot mutante Embryonen von Defizienz Df(2L)N22-14 zeigen eine weitgehend undifferenzierte Kutikula, in welcher die wildtypischen Strukturen (Kopfskelett, Filzkörper, Zähnchenbänder und Tracheen) fehlen. Teilweise sind, ähnlich wie bei *crumbs*- oder *stardust*-Mutanten, Kutikulakrümel zu sehen (Abb. 4.38C, weisser Pfeil).

Ebenso wie die meisten der anderen getesteten Enhancer ist Defizienz Df(2L)N22-14 in der Lage den mutanten *crumbs*-Phänotyp der beiden Allele *crb*^{11A22} und *crb*^{8F105} abzuschwächen (4.38D-E). Zusätzlich getestet wurden das hypomorphe *crumbs*-Allel *crb*^{S87-2} (4.38F), die beiden amorphen *stardust*-Allele *sdt*^{XP96} und *sdt*^{XN05} (4.38G-H) sowie das hypomorphe *bazooka*-Allel *baz*^{Xi106} (ohne Abbildung). Für alle konnte eine partielle Abschwächung der Kutikula-Fehlbildungen beobachtet werden. Ungewöhnlich hierbei ist die Stärke, mit welcher Df(2L)N22-14 den mutanten *crumbs*-Phänotyp von *crb*^{11A22} abschwächt (4.38D). Diese Abschwächung ist mindestens ebenso stark wie die in Abb. 4.31F gezeigte, die durch Überexpression der zytoplasmatischen Domäne von *crumbs* erreicht wurde. Ausserdem fällt auf, dass die Abschwächung des Phänotyps von *crb*^{8F105} durch Defizienz Df(2L)N22-14 geringfügiger ist als die von *crb*^{11A22}. In allen anderen Experimenten zur Abschwächung der Auswirkung einer *crumbs*-Mutation, ist der Phänotyp von *crb*^{8F105} immer derjenige, der stärker abgeschwächt wird.

Die genomische Region, welche in der Defizienz Df(2L)N22-14 deletiert ist, ist im Vergleich zu Region 07D sehr gross (GAD-Fly sagt ca. 130 potentielle Gene voraus). Daher wurde versucht, sie mit Hilfe weiterer Defizienzen und P-Element-Insertionen weiter einzugrenzen.

Wie in Abb. 4.37 dargestellt, standen zur Kartierung eines in dieser Defizienz gelegenen Gens von Interesse drei weitere Defizienzen zur Verfügung sowie einige P-Element Insertionen und zwei EMS-Mutationen bekannter Gene.

Die P-Elemente im Bereich 29C liessen weder in einem Test auf Modifikation des rauen Augenphänotyps noch bei dem Versuch, den mutanten *crumbs*-Phänotyp des Allels *crb*^{11A22} abzuschwächen, einen Effekt erkennen. Sie wurden daher nicht weiter untersucht.

Die grösseren Defizienzen, Df(2L)N22-5 (#384), Df(2L)N22-3 (#368) und Df(2L)30A-C (#3702) zeigen von Df(2L)N22-14 abweichende Ergebnisse.

Obgleich alle vier Defizienzen homozygot oder heterozygot übereinander einen Phänotyp mit stark undifferenzierter Kutikula aufweisen, welcher mit dem von Df(2L)N22-14 übereinstimmt, ist keine der drei Defizienzen in der Lage den rauhen Augenphänotyp in dem Maße zu modifizieren wie es Defizienz Df(2L)N22-14 vermag. Ebenso ist keine von ihnen in der Lage den mutanten Phänotyp des Allels *crb*^{11A22} zu abschwächen. Für *crb*^{8F105} lässt sich allerdings eine Verringerung der Schädigung der Kutikula erkennen, welche jedoch schwächer als bei zu Defizienz Df(2L)N22-14 ausfällt.

Anhand dieser Ergebnisse kann man die modifizierende und für die Abschwächung der des mutanten *crumbs*-Phänotyps verantwortliche Region mit Hilfe dieser Defizienzen nicht weiter eingrenzen. Die einzige Aussage, welche sich treffen lässt, ist, dass der in homozygoten Df(2L)N22-14-Embryonen beobachtete Kutikulaphänotyp auf ein Gen zurückzuführen ist, welches im Bereich zwischen 30A-C zu suchen ist.

Von den übrigen P-Element-Insertionen bzw. EMS-induzierten Mutationen konnten zwei Mutationen des Gens *raw* die beiden mutanten *crumbs*-Phänotypen abschwächen. Die Kutikula homozygoter *raw*-Embryonen weist Defekte des dorsalen Rückenschlusses auf (Abb. 4.39 C). Kreuzungen des EMS-induzierten *raw*-Allels *raw*¹ (= #2749) mit Defizienz Df(2L)N22-14 zeigen den gleichen Phänotyp (ohne Abbildung). *raw*¹ agiert als Enhancer (Klasse E3) des rauhen Augenphänotyp und ist somit ein stärkerer Modifikator als die ursprüngliche Defizienz Df(2L)N22-14.

Das zweite, P-Element-induzierte Allel *raw*^{P10363} ist nur geringfügig in der Lage den Augenphänotyp zu modifizieren. *raw*¹, sowie weitere getestete *raw*-Allele (*raw*^{P10363} und *raw*^{Z284}), schwächen den mutanten *crumbs*-Phänotyp des Allels *crb*^{11A22} in geringerem Maß ab als es Df(2L)N22-14 tut (Abb. 4.39E). Der Effekt der *raw*-Mutationen auf den mutanten Phänotyp von *crb*^{8F105} ist mit dem der Defizienz jedoch nahezu identisch. Basierend auf diesen Ergebnissen kommt *raw* als Kandidat für eine mögliche Interaktion mit *crumbs* in Frage.

Chr.	Linie Nr.	Region / Gen	Kutikula-Phänotyp	X GMR-Gal4-38.1.2b	X GMR-Gal4-ΔERLI	X <i>crb</i> ^{11a22} (Kutikula)	X <i>crb</i> ^{8F105} (Kutikula)	X <i>sdt</i> ^{XP96} (Kutikula)	X <i>sdt</i> ^{XN05} (Kutikula)	X <i>baz</i> ^{Xi106} (Kutikula)
II	Def # 2892	29C1-2; 30C8-9	Kutikula undiff.	Enhancer E 2	E 0	Suppressor 4	Suppressor 2-3	Suppressor 2	Suppressor 2	S 0-1
II	Def # 384	29C3-5; 30C8-9 (29D1-2; 30C4-D1)	Kutikula undiff.	Enhancer E 1	E 0	S 0	Suppressor 1	-----	-----	-----
II	Def # 368	30A1-2; 30D1-2	Kutikula undiff.	Enhancer E 1	E 0	S 0	Suppressor 1	-----	-----	-----
II	Def # 3702	30A3-5; 30C2-5	Kopf ok, post. Hälfte fehlt, post. offen	Enhancer E 1	E 0	S 0	Suppressor 1-2	-----	-----	-----
II	P – 11097	29E1-2	-----	E 0	E 0	S 0	S 0	-----	-----	-----
II	EMS - 2749	<i>raw</i> (29E4-6)	dorsal offen	Enhancer E3	E 0	Suppressor 1	Suppressor 2-3	S 0	S 0 (-1)	S 0
II	P – Z284	<i>raw</i>	dorsal offen	Enhancer E 1-2	E 0	Suppressor 1	Suppressor 1	-----	-----	-----
II	P – 10363	<i>raw</i>	dorsal offen	E 0 (-1)	E 0	Suppressor 1	Suppressor 1	S 0	S 0	S 0
II	EMS - 5104 (RA24)	<i>rem</i> ¹ (30A3 -C5)	Kutikula undiff.	E 0	E 0	S 0	Suppressor 2-4	S 0	S 0	S 0 (variabel)
II	EMS - RA74	<i>rem</i> ²	Kutikula undiff.	E 0	E 0	S 0	Suppressor 1-2	-----	-----	-----
II	P – 5431	P – 29C	-----	E 0	E 0	S 0	-----	-----	-----	-----
II	P – 11070	P – 29C01-02	-----	E 0	E 0	S 0	-----	-----	-----	-----
II	P – 10656	P – 29C01-03	-----	E 0	E 0	S 0	-----	-----	-----	-----
II	P – 10492	P – 29C01-03	-----	E 0	E 0	S 0	-----	-----	-----	-----
II	P – 11195	P – 29C03-04	-----	E 0	E 0	S 0	-----	-----	-----	-----
II	P – 11062	P – 29C03-05	-----	E 0	E 0	S 0	-----	-----	-----	-----
II	P – 271	P – 29C	-----	E 0	E 0	S 0	-----	-----	-----	-----

Tab 4.15: Übersichtstabelle über die für die Kartierung der Region 29C-30C verwendete Defizienzen und P-Element-Insertionslinien und den in den Kartierungen erzielten Ergebnissen.

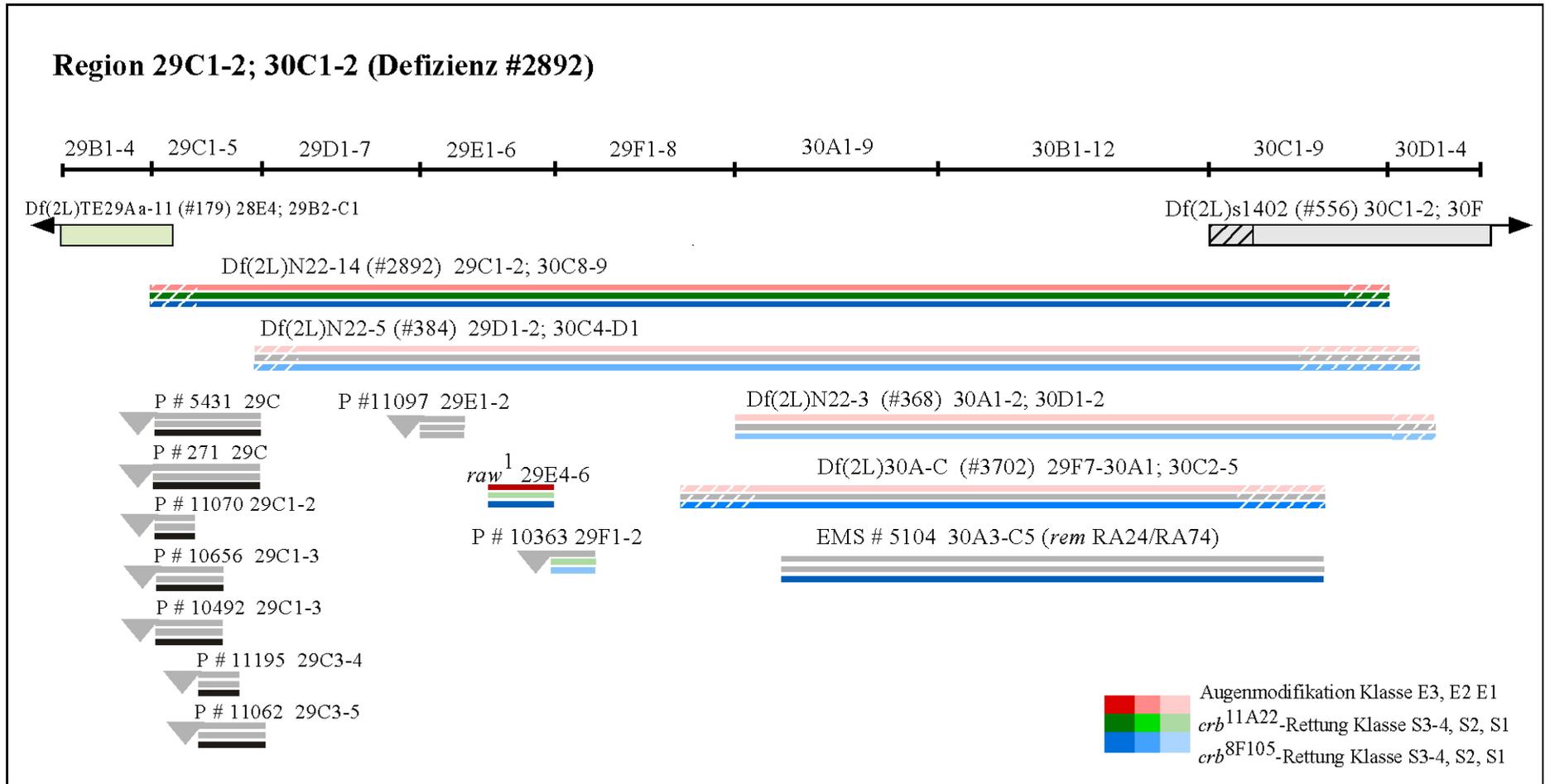


Abb. 4.37: Nähere Kartierung von Defizienz Df(2L)N22-14 (Linie #2892), Region 29C1-2; 30C1-2

Defizienzen Df(2L)TE29Aa-11 und Df(2L)s1402 agierten im Rahmen des Modifier-Screens nicht als Enhancer, und wurden daher nicht weiter untersucht. Für die anderen untersuchten Defizienzen oder Mutationen wird eine Modifizierung des rauhen Augenphänotyps unterschiedlicher Stärke durch einen rot/rosafarbenen Balken gekennzeichnet, grün und blau kennzeichnet eine Rettung des mutanten Phänotyps der beiden *crb*-Allele *crb*^{11A22} und *crb*^{8F105}. In grau gekennzeichnete Balken stehen für fehlende Modifikation oder Rettung, schwarze Balken dafür, dass der entsprechende Versuch nicht durchgeführt wurde und eine Schraffierung der Balkenenden kennzeichnet die Region, in der der Bruchpunkt nicht genau kartiert worden ist. Für P-Elemente, deren Insertionsort nicht genau bekannt ist, wird ebenfalls eine mögliche Insertionsregion angegeben, in welcher das P-Element an einer spezifischen Stelle inseriert ist. Für Details zur Kartierung siehe Text und Tabelle 4.15.

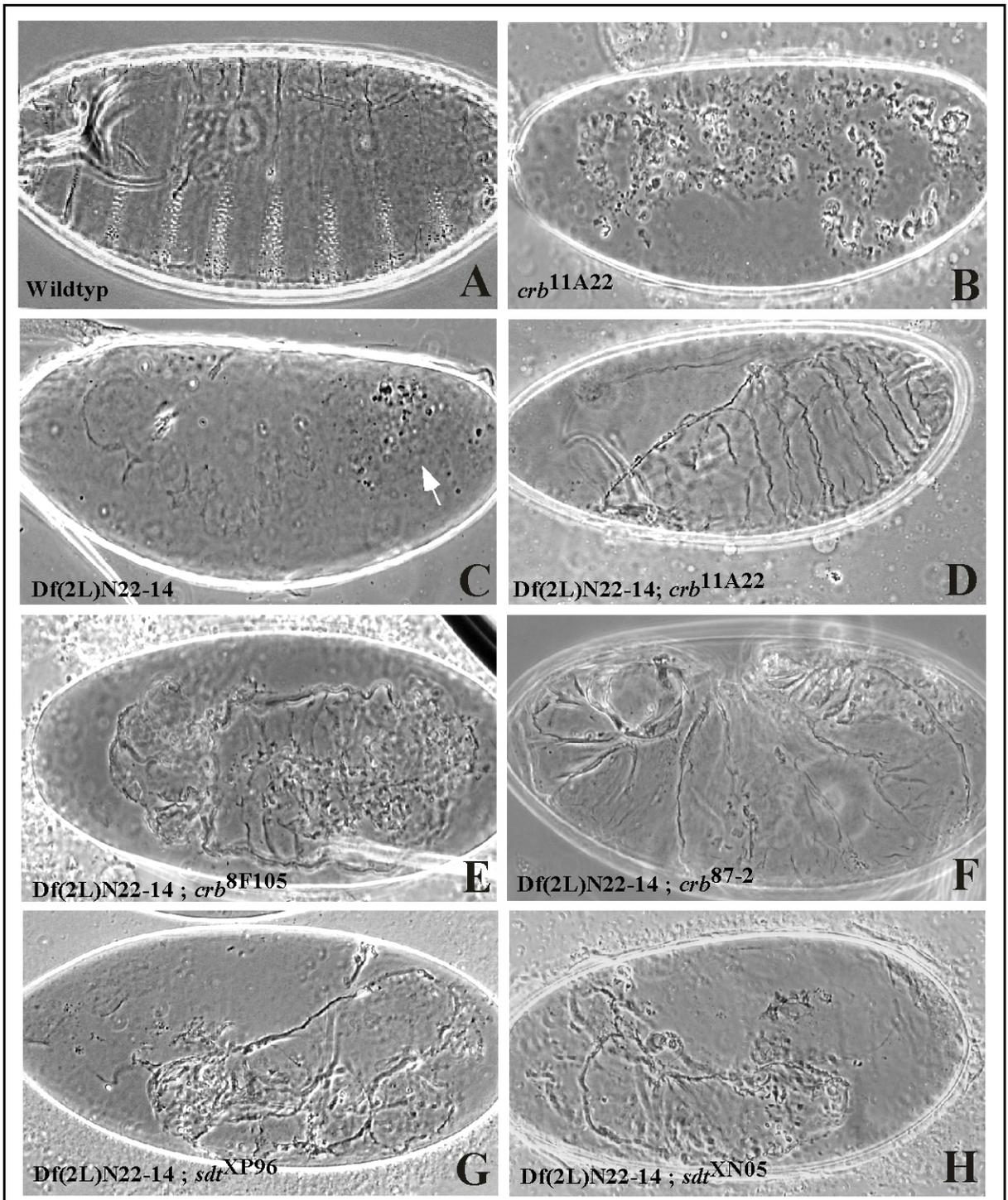


Abb. 4.38: Abschwächung mutanter Phänotypen durch Kreuzung mit Defizienz Df(2L)N22-14

(A) Wildtyp (B) Kutikula des mutanten *crumbs* Allels *crb*^{11a22}

(C) Homozygote Embryonen der Defizienz Df(2L)N22-14 zeigen eine vollkommen undifferenzierte Kutikula, welche im posterioren Bereich teilweise fragmentiert vorliegt (Pfeil).

(D-H) Abschwächung des mutanten Phänotyps der Allele *crb*^{11A22}, *crb*^{8F105} und *crb*⁸⁷⁻², *sdt*^{XP96} und *sdt*^{XN05} durch Kreuzung mit Defizienz Df(2L)N22-14. Details siehe Text und Tabelle 4.15.

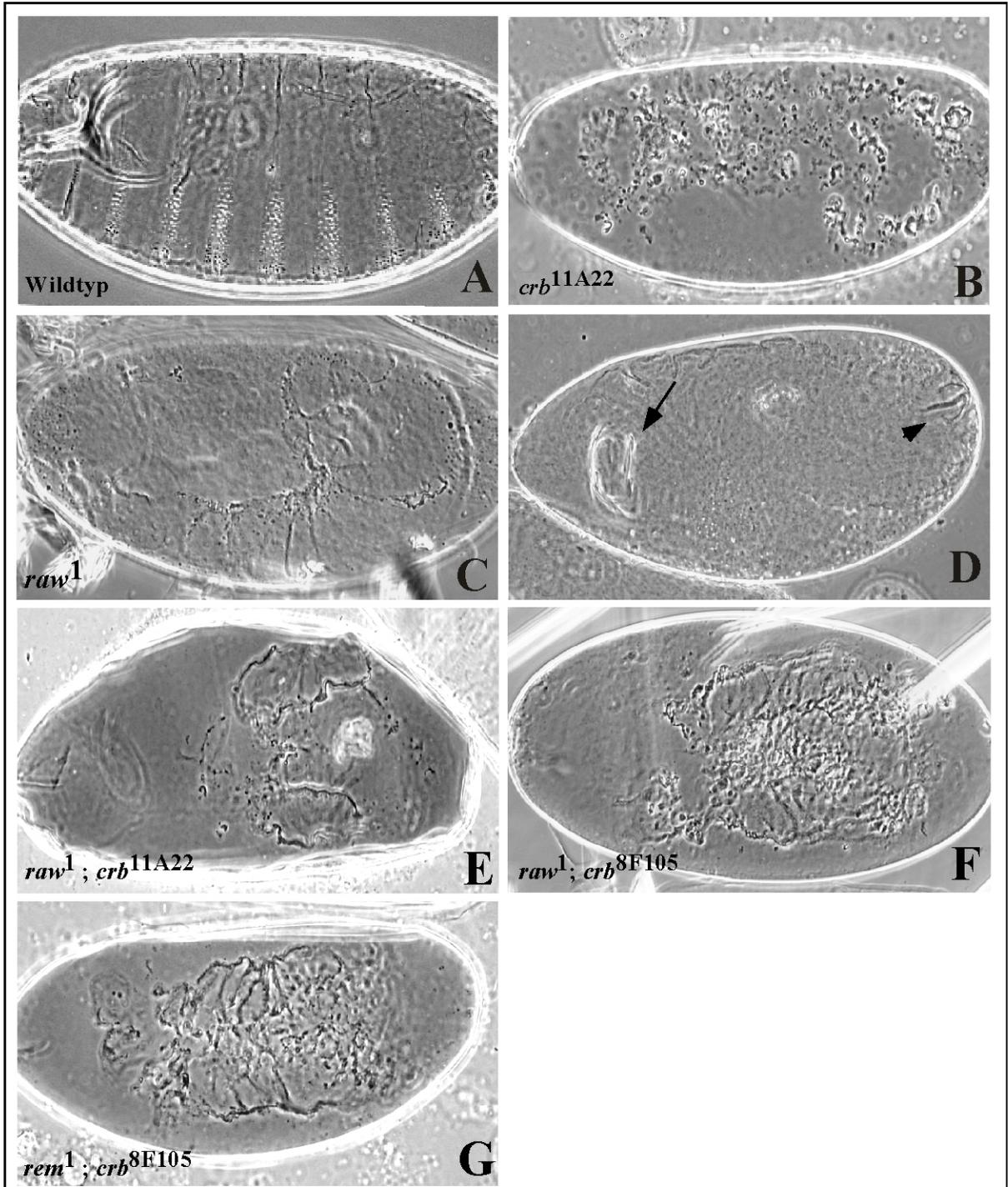


Abb. 4.39: Abschwächung der mutanten Phänotypen der *crumbs*-Allele *crb*^{11A22} und *crb*^{8F105} durch Kreuzung mit Mutationen von *raw* und *rem*:

(A) Wildtyp (B) Kutikula des mutanten *crumbs* Allels *crb*^{11a22} (C) Kutikula von homozygote Embryonen des EMS-induzierten Allels *raw*¹. Die Kutikula weist Kopfdefekte und einen unvollständigen dorsalen Rückenschluss auf. Ventrale Kutikula sowie die Filzkörper sind vorhanden. (D) Kutikula von homozygote Embryonen des EMS-induzierten Allels *rem*¹. Die Kutikula ist fast vollständig undifferenziert, selten findet man Reste des Kopfskeletts (Pfeil) oder der Filzkörper (Pfeilkopf). (E-G) Abschwächung des mutanten *crumbs*-Phänotyps der Allele *crb*^{11A22}, *crb*^{8F105} durch Kreuzung mit den Mutationen *raw*¹ und *rem*¹.

Obleich mit *raw* in der Region 29C-30C bereits ein möglicher Interaktionspartner von *crumbs* gefunden worden ist, besteht aufgrund der gefundenen Ergebnisse die Möglichkeit, dass mehr als nur das Gen *raw* für die gefundene Modifikation und Abschwächung des mutanten *crumbs*-Phänotyps in Frage kommt. Vergleicht man nämlich die für Defizienz Df(2L)N22-14 gefundenen Ergebnisse mit denen des stärksten *raw*-Allels, *raw*¹, so finden sich wenig Übereinstimmungen. Beide Mutationen in der Lage, den rauhen Augenphänotyp zu modifizieren, aber in den Rettungsexperimenten zeigt *raw*¹ sehr viel schwächere Effekte als Defizienz Df(2L)N22-14, welche eine starke Abschwächung des Phänotyps aller getesteten *crumbs*- und *stardust*-Allele zeigt. Zudem zeigt die Defizienz einen auffälligen Kutikulaphänotyp, welcher nicht mit dem von *raw* übereinstimmt, auf aufgrund von Testkreuzungen der vier verwendeten Defizienzen aber der Region 30A-C zugeordnet werden kann.

♂ \ ♀	Df(2L) N22-14 (#2892) ♂	Df(2L) N22-5 (#384) ♂	Df(2L) N22-3 (#368) ♂	Df(2L) 30A-C (#3702) ♂	<i>raw</i> ¹ ♂	<i>rem</i> ¹ ♂	<i>rem</i> ² ♂
Df(2L) N22-14 (#2892) ♀	Kopf defekt undifferen- ziert	Kopf defekt undifferen- ziert	Kopf defekt undifferen- ziert	Kopf defekt undifferen- ziert	dorsal offen	undifferen- ziert	undifferen- ziert
Df(2L) N22-5 (#384) ♀	-----	Kopf defekt undifferen- ziert	Kopf defekt undifferen- ziert	Kopf defekt undifferen- ziert	dorsal offen	-----	-----
Df(2L) N22-3 (#368) ♀	-----	Kopf defekt undifferen- ziert	Kopf defekt undifferen- ziert	-----	vital	undifferen- ziert	undifferen- ziert
Df(2L) 30A-C (#3702) ♀	-----	Kopf defekt undifferen- ziert	Kopf defekt undifferen- ziert	Reste vom Kopf vorhanden, post. Kutikula fehlt	vital	undifferen- ziert	undifferen- ziert
<i>raw</i> ¹ ♀	dorsal offen	dorsal offen	vital	vital	dorsal offen	vital	vital
<i>rem</i> ¹ ♀	undifferen- ziert	-----	undifferen- ziert	undifferen- ziert	vital	undifferen- ziert	undifferen- ziert
<i>rem</i> ² ♀	undifferen- ziert	-----	undifferen- ziert	undifferen- ziert	vital	undifferen- ziert	undifferen- ziert

Tab 4.16: Testkreuzung der Defizienzen und Mutationen der genomischen Region 29C-30C:

Ein mögliches Gen in dieser Region, welches im Rahmen dieser Versuche untersucht wurde, ist das Gen *remnants*. Beide getesteten Allele (von T. Schupbach zur Verfügung gestellt) zeigen in Homozygose einen Kutikula-Phänotyp, der dem von Df(2L)N22-14 entspricht. Die Kutikula ist weitgehend undifferenziert und teilweise an einigen Stellen auch fragmentiert (4.39D).

In in Testkreuzungen sind die beiden Allele jedoch nicht in der Lage den rauhen Augenphänotyp zu modifizieren. Ebenso können sie den mutanten Phänotyp des *crumbs* Allels *crb*^{11A22} nicht retten, wohl aber in unterschiedlichem Ausmass den von *crumbs*-Allel *crb*^{8F105} (Abb. 4.38 H).

Weitere Studien dieses Gens sind jedoch notwendig, um eine eindeutige Aussage treffen zu können.

4.2.4 Testen von Genen, welche am Prozess des „dorsalen Rückenschlusses“ beteiligt sind

Während der genaueren Untersuchung der im Modifier-Screen gefundenen Defizienzen, welche als Enhancer wirken, fiel auf, dass viele von ihnen, wenn sie homozygot im Embryo vorliegen, Defekte des dorsalen Rückenschlusses hervorrufen.

Im Laufe der späten Embryonalentwicklung von *Drosophila* entsteht durch den Rückzug des Keimstreifs eine dorsale Region im Embryo, welche noch keine Epidermis aufweist. Sattdessen wird diese Region von der Amnioserosa bedeckt, einem Epithel aus grossen, flachen Zellen.

Diese dorsale Region wird über den Prozess des dorsalen (Rücken-)Schlusses (engl. ‚*dorsal closure*‘) geschlossen, in welchem lateral gelegene epidermale Zellen sich entsprechend der dorso-ventralen Achse strecken und von einer einzelnen Zellreihe geführt (engl. ‚*leading edge cells*‘) von beiden Seiten des Embryos nach dorsal wandert. Dort schieben sie sich über die Amnioserosa und wachsen schliesslich an der dorsalen Mittellinie (‚*dorsal midline*‘) zusammen, so dass das dorsale epidermale „Loch“ geschlossen wird (Young et al., 1993). Dieser Wanderungs- und Fusionsprozess wird sowohl von den aktiv wandernden Epithelzellen getrieben als auch von der Amnioserosa, welche nicht nur von den Epithelzellen überwandert wird, sondern durch eine aktive Kontraktion zum dorsalen Schluss beiträgt (Kiehart et al., 2000).

Mutationen von Genen, welche an diesem Prozess beteiligt sind, führen zu embryonaler Letalität. Der mutante Phänotyp zeichnet sich durch ein unterschiedlich großes dorsales Loch in der Kutikula aus, womit, je nach Ausdehnung des Loches, auch häufig Defekte des Kopfskelettes oder sogar ein völliger Verlust anteriorer Strukturen einhergehen.

Basierend auf diesem markanten Kutikulaphänotyp konnten zahlreiche Loci und Gene identifiziert werden, welche am Prozess des dorsalen Schlusses beteiligt sind. Diese lassen sich durch die Ähnlichkeiten ihrer Funktion in drei Klassen einteilen: Genprodukte der Klasse I spielen strukturelle Rollen während des dorsalen Schlusses, während die Produkte der Klassen II und III an der Signalübertragung beteiligt sind.

Klasse I Gene kodieren für membranassoziierte Moleküle, spezifisch Zelladhäsions- und Cytoskelett-Komponenten und beeinflussen so strukturelle Veränderungen in den epithelialen Zellen ihre Beweglichkeit. Zu dieser Klasse gehören Gene wie *zipper* (*zip*), *coracle* (*cora*), *canoe* (*cno*) und *mysospheroid* (*mys*) (Leptin et al., 1989; Young et al., 1993; Fehon et al., 1994; Miyamoto et al., 1995). Klasse II Gene sind Moleküle, welche eine Rolle in der DJNK (D-Jun-Kinase)-Signalkaskade spielen und zu dieser Gruppe gehören Gene wie *misshapen* (*msn*), *hemipterous* (*hep*), *basket* (*bsk*), *Jun-related antigen* (*Jra*), *kayak* (*kay*), *anterior open* (*aop*) und *puckered* (*puc*) (Glise et al., 1995; Rogge et al., 1995; Riesgo-Escovar et al., 1996; Sluss et al., 1996; Hou et al., 1997; Kockel et al., 1997;

Riesgo-Escovar und Haven, 1997a,b; Martin-Blanco et al., 1998; Su et al., 1998). Während des dorsalen Schlusses reguliert die DJNK-Kaskade die Organisation von Zytoskettkomponenten in den ‚*leading edge*‘-Zellen der Epidermis.

Zudem wird über die DJNK-Kaskade durch transkriptionelle Aktivierung *decapentaplegic (dpp)*, ein Cytokin der TGF- β („*transforming growth factor*- β “) Superfamilie (Glise und Noselli, 1997; Hou et al., 1997; Riesgo-Escovar und Hafen, 1997a/b) in den ‚*leading edge*‘ Zellen aktiviert.

Die Expression von *dpp* löst eine zweite epidermale Signalkaskade von Faktoren aus, welche von Genen der Klasse III kodiert werden. Komponenten dieses Dpp-induzierten Signaltransduktionswegs sind *thick veins (tkv)*, *punt (put)*, *Mothers against dpp (Mad)* und *schnurri (shn)*. Bei Tkv und Punt handelt es sich um transmembrane Rezeptortyrosinkinasen, Mad und shn hingegen kodieren für Transkriptionsfaktoren. Für einige dieser Genprodukte konnte bereits gezeigt werden, dass sie wiederum direkt oder indirekt auf die Faktoren der Klasse I einwirken. Dpp und sein Rezeptor Tkv sind beispielsweise für die transkriptionelle Aktivierung von *zipper* verantwortlich.

Crumbs wird, wie bereits in der Einleitung näher beschrieben, in allen Epithelien ektodermaler Herkunft exprimiert, zu denen auch die Amnioserosa gehört. Überexpression von *crumbs* in der Amnioserosa führt zu morphologischen Veränderungen der ‚*leading edge*‘-Zellen. Die der Amnioserosa zugewandte Seite der Zellen zieht sich zusammen, ihr Zytoskelett kontrahiert sich, und hierdurch wird sowohl ein potentielles Signal über die DJNK-Kaskade an Dpp und folgende Faktoren unterbunden, als auch durch strukturelle Veränderungen die Wanderung der LE-Zellen und somit der Epidermis nach dorsal verhindert. Das Resultat dieser Überexpression ist ein dorsales Loch (Harden et al., 2002). Gleichzeitig ist *Crumbs* selbst verantwortlich für die Morphogenese der Amnioserosa. Schwache *crumbs*-Allele können Defekte des dorsalen Schlusses aufweisen (Wodarz et al., 1995), während der Rest der Epidermis intakt ist und normal Kutikula sezerniert. In diesen Mutanten ist die Morphogenese der Amnioserosa defekt, während die Morphologie des Zytoskeletts der ‚*leading edge*‘-Zellen selbst intakt ist.

Basierend auf der Tatsache, dass viele gefundene modifizierende Defizienzen dorsale Schlussdefekte zeigten und dass *Crumbs* eine Rolle im Prozess des dorsalen Schlusses spielt und in der Amnioserosa exprimiert wird, stellte sich die Frage, ob auch umgekehrt Faktoren, deren Mutanten nachgewiesenermaßen dorsale Schlussdefekte zeigen, als Modifikatoren im Auge agieren können bzw. den mutanten *crumbs*-Phänotyp im Embryo abmildern können.

Um diese Frage zu beantworten wurde ein zusätzlicher Screen durchgeführt.

Von der Flybase-Datenbank angegebene Mutanten mit Defekten des dorsalen Schlusses wurden auf Modifikation des Überexpressionsphänotyps im Auge und auf *crumbs*-Rettung im Embryo hin getestet. Die Ergebnisse dieses Kurz-Screens sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Chr./ Stamm Nr.	Gen/ genom. Lokalisation	Anmerkung zum getesteten Stamm	X GMR-Gal4- crb ^{intra} 38.1.2b	X <i>crb</i> ^{11A22} (Kutikula)	X <i>crb</i> ^{8F105} (Kutikula)
I					
# 5739	<i>l(1)19Ec</i> 19E14	EMS-Allel	E0	S0	S0
# 4708	<i>l(1) PB18</i> <i>08A5-09A2</i>	letal	Enhancer 4	Suppressor 2	Suppressor 3
-	<i>mys</i> ^{ts2}	EMS-Allel	E0	S0	Suppressor 1
-	<i>mys</i> ^{olFC-x3}	EMS-Allel	E0	S0	Suppressor 1
II					
#3088	<i>basket</i> 31A3	<i>bsk</i> ¹ , EMS-Allel	E0	S0	S0
#10801	<i>coracle</i> 56C4	letale P-Insertion	E0	S0	S0
# 2785	<i>faint sausage</i> <i>50B6-C3</i>	<i>fas</i> ¹ , EMS-Allel	Enhancer 4-5	Suppressor 3	Suppressor 3
#260	<i>faint sausage</i>	<i>fas</i> -Allel	nicht getestet	Suppressor 1	Suppressor 2
#263	<i>faint sausage</i>	<i>fas</i> ^{IIA92}	Enhancer 2	Suppressor 1	Suppressor 2
#264	<i>faint sausage</i>	<i>fas</i> ^{TK}	E0	S0	S0 (-1)
#265	<i>faint sausage</i>	<i>fas</i> ^{IIA92}		S0	Suppressor 1
#266	<i>faint sausage</i>	<i>fas</i> ^{IIA92}	Enhancer 1	Suppressor 1	Suppressor 2
#267	<i>faint sausage</i>	<i>fas</i> ^{IA92}	Enhancer 2	Suppressor 1 (-2)	Suppressor 1-2
#268	<i>faint sausage</i>	<i>fas</i> ^{IIA92}	nicht getestet	nicht getestet	Suppressor 1-2
#270	<i>faint sausage</i>	<i>fas</i> ^{P1411}	Enhancer 2-3	Suppressor 2	Suppressor 2-3
#503	<i>faint sausage</i>	<i>fas</i> ^{K67}	nicht getestet	S0 (-1)	Suppressor 1
# 3270	<i>grainy head</i> 54E10-F1	<i>grh</i> ^{IM} , EMS-Allel	E0	S0	S0
# 5523	<i>Protein kinase related to protein kinase N, 45C1</i>	<i>Pkn</i> ³ , letal	E0	S0	S0
# 3176	<i>Rho1</i> <i>52E3-4</i>	<i>RhoA</i> ^{E3.10}	Enhancer 1	Suppressor 3	Suppressor 4
# 3240	<i>ribbon</i> 56C6	<i>rib</i> ^l = <i>rib</i> ^{IK} , EMS-Allel	E0 (-1)	S0 (-1)	Suppressor 1-2
# 3242	<i>thick veins</i> 25C8-9	<i>tkv</i> ⁷ , EMS-Allel	E0	S0(1-)	Suppressor 1
# 11191	<i>thick veins</i> 25C8-9	<i>tkv</i> ^{k16713} , hypomorph	Enhancer 1	S0	S0(-1)
# 4199	<i>zipper</i> 60E11-12	<i>zip</i> ¹ , EMS-Allel	E0	S0(1-)	Suppressor 1-2
III					
# 2776	<i>disembodied</i> 64A5	<i>dib</i> ² , EMS-Allel	E0	-----	-----
#5407	<i>nemo</i> 66A21-B2	<i>nmo</i> ^{j147-1} Δ2-3, P-Element- Excision	E0	-----	-----
-----	<i>Canoe</i> 82F1-6	<i>cno</i> ³ , EMS-Allel	S1	-----	-----
# 11538	<i>serpent</i> 89A8	amorph	E0	-----	-----

Tabelle 4.17: Modifier-Screen mit Mutationen von Genen, welche Defekte des dorsalen Rückenschlusses aufweisen

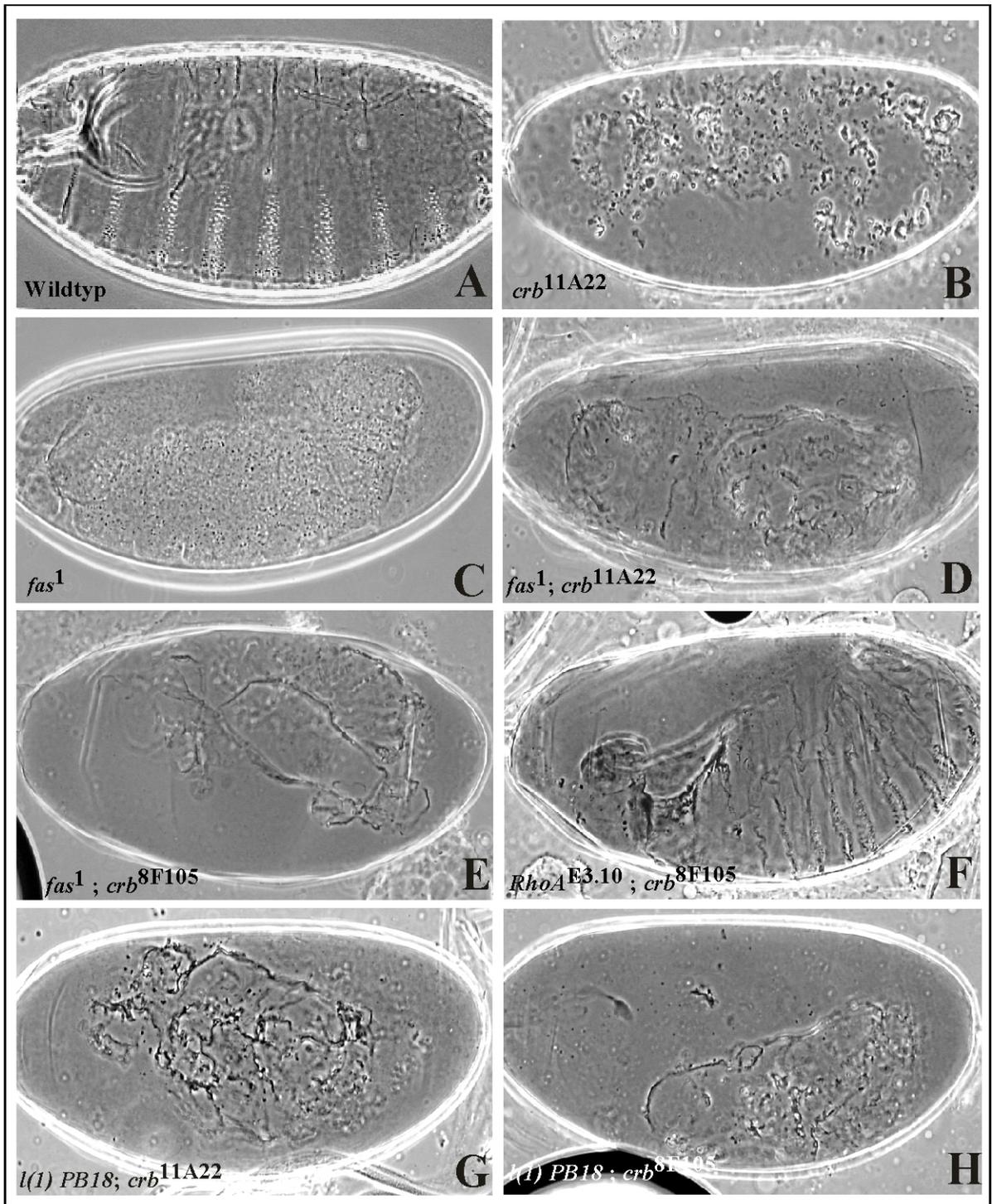


Abb. 4.40: Abschwächung der mutanten Phänotypen der *crumbs*-Allele *crb*^{11A22} und *crb*^{8F105} durch Kreuzung mit Mutationen von *raw* und *rem*

(A) Wildtyp (B) Kutikula des mutanten *crumbs* Allels *crb*^{11A22} (C) Homozygote Embryonen des Allels *fas*¹ weisen eine vollkommen undifferenzierte Kutikula, mit nekrotische Flecken und einem abnormem Kopfskelett.

(D-H) Abschwächung des mutanten *crumbs*-Phänotyps der Allele *crb*^{11A22} und *crb*^{8F105} durch Kreuzung mit *fas*¹, *RhoA*^{E3.10} und *l(1)PB18*.

Von den getesteten Mutanten, die nach Angaben der Flybase-Datenbank Defekte im dorsalen Schluss aufweisen, zeigen nur drei (blau gekennzeichnet) einen starken Phänotyp bei der Modifikation des Augenphänotyps. Alle drei schwächen zudem dem mutanten Kutikula-Phänotyp der beiden *crumbs*-Allele *crb*^{11A22} und *crb*^{8F105} in erhöhtem Masse ab.

Mutationen der Gene *myspheroid* (schon bei der Kartierung von Region 07D getestet), *ribbon* und *zipper* sind zumindest in einer Kreuzung mit *crb*^{8F105} in der Lage, den mutanten *crumbs*-Phänotyp leicht abzuschwächen, zeigen jedoch in Hinsicht auf eine Rettung des Phänotyps des Allels *crb*^{11A22} bzw. einer Modifikation des rauhen Augenphänotyps nur schwache Effekte.

Das Gen *raw*, welches auch zu den Genen gehört, welche Defekte des dorsalem Schlusses aufweisen, wurde bereits in Kapitel 4.2.3.2 als potentieller Interaktionspartner von *crumbs* identifiziert und daher in diesem Versuch nicht mehr getestet bzw. in Tabelle 4.17 nicht mehr aufgelistet.

Vor Interesse für weitere Versuche sind vor allem die drei Linien bzw. Gene, die sowohl den rauhen Augenphänotyp sehr stark modifizieren als auch gleichzeitig in der Lage sind den mutanten *crumbs*-Phänotyp zu abschwächen, *l(1)PB18*, *faint sausage* und *Rho1*.

4.2.5. Zusammenfassung der Ergebnisse des Modifier-Screens und anschliessender Kartierungen

Im Rahmen des Modifier-Screens und anschliessender Kartierungen ergaben sich folgende Ergebnisse:

1.) Region 07D1-6

Zum derzeitigen Stand der Dinge kann darüber, welches der drei Kandidatengene in dieser Region für die Modifikation des Augenphänotyps sowie für die Abschwächung der mutanten *crumbs*-Phänotypen verantwortlich ist, keine eindeutige Aussage getroffen werden.

Als Kandidaten kommen *myspheroid*, *fs(1)h* und eine bislang unbekannte Ubiquitin-E3-Protein-Ligase, in Frage, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass die beobachtete Modifikation bzw. Abschwächung der beiden im Screen gefundenen Defizienzen auf der Deletion mehrerer dieser Kandidaten beruht und nicht nur auf einem einzigen.

2.) Region 29C-30C

In dieser Region konnte *raw* als potentieller funktioneller Interaktionspartner von *crumbs* ermittelt werden. Von drei getesteten *raw*-Mutationen modifiziert zwar nur eine Linie den rauhen Augenphänotyp, aber alle drei Linien sind in der Lage den mutanten embryonalen Phänotyp der zwei getesteten *crumbs*-Allele in unterschiedlichem Ausmass abzuschwächen.

Auffällig an dieser Region ist jedoch, dass die im Screen gefundene Defizienz Df(2L)N22-14 die Phänotypen der getesteten *crumbs*- und *stardust*-Allele in einem sehr viel stärkeren Ausmass zu retten vermag als die drei *raw*-Allele. Insofern ist es möglich, dass mehr als ein Gen an dieser starken Modifizierung beteiligt ist. Für den Phänotyp der im Screen gefundenen Defizienz Df(2L)N22-14 verantwortlich zu sein scheint das bislang wenig untersuchte Gen *remnants*, welches zumindest den mutanten Phänotyp von *crb*^{8F105} ebenfalls abschwächen kann. Weitere Kandidaten in dieser Region wurden bislang nicht analysiert.

3.) Gene, deren Mutanten in Homozygose einen unvollständigen dorsalen Rückenschluss aufweisen

Im Rahmen eines zusätzlichen Screens, in welchem Mutationen mit Defekten des dorsalen Schlusses auf Modifikation des rauhen Augenphänotyps bzw. Abschwächung des mutanten *crumbs*-Phänotyps getestet wurden, fanden sich drei weitere Gene, welche sowohl als starke Enhancer des rauhen Augenphänotyps agieren als auch den embryonalen Kutikulaphänotyp abschwächen können.

Über das Gen *l(1)PB18* ist bislang wenig bekannt und es müsste in weiteren Versuchen näher kartiert und charakterisiert werden. *faint sausage* und *Rho1* sind bereits in verschiedenen Publikationen beschrieben und sowohl mit Epithelbildung als auch mit dem Prozess des dorsalen Schlusses assoziiert worden. Weitere Studien (z.B. Antikörperfärbungen) müssten Aufschluss über ihre mögliche Interaktion mit *crumbs* geben.

In der folgenden Tabelle sind noch einmal die Ergebnisse aller Kartierungen zusammengefasst. Ebenfalls aufgelistet sind hierbei die Ergebnisse der vier Regionen 03D-E (Df(1)A113 (#940)), 35C (Df(2L)b87e25 und Df(2L)TE35BC-24 (#3138 und #3588)), 35F-36D (Df(2L)cact-255rv64 (#2583)) und 47D-48B (Df(2R)en-A (#190)). Diese vier Regionen wurden nur grob kartiert, danach in dieser Arbeit allerdings nicht weiter untersucht.

Chr.	Linie Nr.	Region	Kutikula-Phänotyp	X GMR-Gal4- crb ^{intra} 38.1.2b	X GMR- Gal4- ΔERLI	X <i>crb</i> ^{11a22} (Kutikula)	X <i>crb</i> ^{8F105} (Kutikula)	X <i>sdt</i> ^{XD96} (Kutikula)	X <i>sdt</i> ^{XN05} (Kutikula)	X <i>baz</i> ^{Xi106} (Kutikula)
I	Def # 733	03A4-6; 03C5-6	gemischt	Enhancer E 5 E0 (Mix)	E 0	-----	-----	-----	-----	-----
I	Def # 940	03D6-E1; 04F5 (03D6-E1; 0415-16)	dorsal offen	Enhancer E 3	E 0	Suppressor 2-3	Suppressor 3	-----	-----	-----
I	Def # 6009	03C; 03D	-----	E 0	E 0	S 0	-----	-----	-----	-----
I	Def # 939	03C11; 03E4	-----	E 0	E 0	S 0	-----	-----	-----	-----
I	Def # 5980	03D; 04A	-----	E 0	E 0	Suppressor 1	-----	-----	-----	-----
I	Def # 1877	03D4-5; 03F7-8	-----	E 0	E 0	Suppressor 1	Suppressor 1-2	-----	-----	-----
I	Def # 1494	03E; 04A	-----	E 0 (-1)	E 0	S 0	S 0	-----	-----	-----
I	Def # 941	03E8; 04F11	-----	Enhancer E 1	E 0	Suppressor 1	Suppressor 1-2	-----	-----	-----
I	Def # 909	03F3; 05E8	-----	E 0 (-1)	E 0	S 0	S 0	-----	-----	-----
I	Def # 3372	03F4-04B6; 04C6-7 – 05A4	-----	Enhancer E 1-2	E 0	S 0	S 0	-----	-----	-----
I	Def # 5981	03F4; 03F1-4	-----	E 0 (-1)	E 0	S 0 (-1)	S 1(-2)	-----	-----	-----
I	Def # 5982	03F4; 04A1-4 – 04C6	-----	E 0	E 0	S 0	Suppressor 1-2	-----	-----	-----
I	Def # 5983	03F4; 04A1-4 – 04C6	-----	E 0 (-1)	E 0	Suppressor 1	Suppressor 1-2	-----	-----	-----
I	Def # 3200	04A3-5; 04C15-16	-----	E 0	E 0	S0	-----	-----	-----	-----
I	Def # 6005	04A4-5; 04F11-12	undiff, Kopf defekt	E 0	E 0	Suppressor 1-2	Suppressor 2	-----	-----	-----
I	# 3560	09F; 10C3-5	-	Enhancer E 3-4	E 0	Suppressor 1	-----	-----	-----	-----
I	# 957	10A9; 10F6-7	undiff. Cuticula	Enhancer E 1-2	E 0	Suppressor 1	-----	-----	-----	-----

Chr.	Linie Nr.	Region	Kutikula- Phänotyp	X GMR-Gal4- crb ^{intra} 38.1.2b	X GMR- Gal4- ΔERLI	X <i>crb</i> ^{11a22} (Kutikula)	X <i>crb</i> ^{8F105} (Kutikula)	X <i>sdt</i> ^{XD96} (Kutikula)	X <i>sdt</i> ^{XN05} (Kutikula)	X <i>baz</i> ^{Xi106} (Kutikula)
I	Def # 2984	07D1; 07D5-6	dorsal offen	Enhancer E 2	E 0	Suppressor 2-3	Suppressor 2-3	-----	-----	-----
I	Def # 949	07D1; 07D5-6	dorsal offen	Enhancer E 4	E 0	Suppressor 3	Suppressor 3	-----	-----	-----
I	P - 12260	07D	18°C/RT/ 29°C: Mix + dorsal offen	Enhancer E 2-3	E 0	S 0-1	Suppressor 2	-----	-----	-----
I	P - 12246	07D	-----	E 0	E 0	S 0	-----	-----	-----	-----
I	P - 10547	07D1-2	vital	Enhancer E 1	E 0	S 0-1	Suppressor 2	-----	-----	-----
I	P - 11861	07D1-3	-----	E 0	E 0	S 0	-----	-----	-----	-----
I	P - 11289	07D1-9	vital	Enhancer E 1	E 0	Suppressor 1	Suppressor 2 -3	-----	-----	-----
I	P - 10097	07D3-4	-----	E 0	E 0	S 0	-----	-----	-----	-----
I	P - 10098	07D5-7	-----	E 0	E 0	S 0	-----	-----	-----	-----
I	P - 11862	07D5-9	-----	E 0	E 0	S 0	-----	-----	-----	-----
I	P - 11863	07D10-14	-----	E 0	E 0	S 0	-----	-----	-----	-----
I	P - 12125	07D3-4	Mix + dorsal offen	Enhancer E 2-3	E 0	Suppressor 1	Suppressor 2	-----	-----	-----
I	P - 11964	07D3-4	wildtypisch, seltem Zähnen- defekte	Enhancer E 1	E 0	Suppressor 1-2	Suppressor 2 -3	-----	-----	-----
I	P - 845	07D1-2	-----	E 0	E 0	S 0	-----	-----	-----	-----
I	P - 783	07D1-2	-----	E 0	E 0	Suppressor 1	-----	-----	-----	-----
I	P - 839	07D1-2	vital	E 0 (-1)	E 0	Suppressor 1	Suppressor 1	-----	-----	-----
I	P - 11264	07D1-2	-----	E 0	E 0	S 0	-----	-----	-----	-----
I	P - 11822	07D1-2	-----	E 0	E 0	S 0	-----	-----	-----	-----
I	PL 4	07D1	wildtypisch, selten Kopf- und dorsale Schluss- defekte	E 0	E 0	Suppressor 2-3	Suppressor 2 -3	-----	-----	-----

Chr.	Linie Nr.	Region	Kutikula-Phänotyp	X GMR-Gal4- crb ^{intra} 38.1.2b	X GMR- Gal4- ΔERLI	X <i>crb</i> ^{11a22} (Kutikula)	X <i>crb</i> ^{8F105} (Kutikula)	X <i>sdt</i> ^{XD96} (Kutikula)	X <i>sdt</i> ^{XN05} (Kutikula)	X <i>baz</i> ^{Xi106} (Kutikula)
I (region #949)	PL 53	07D1	wildtypisch, selten Kopf- und dorsale Schlussdefekte	E 0	E 0	Suppressor 1	Suppressor 2-3	-----	-----	-----
I	PL 85	07D1	wildtypisch, selten Kopf- und dorsale Schlussdefekte	E 0	E 0	Suppressor 1 (-2)	Suppressor 2-3	-----	-----	-----
I	sn ³	07D2	-----	E 0	E 0	S 0	S 0	-----	-----	-----
I	<i>mys</i> ^{ts1}	07D5-7	undiff. Kutikula	E 0	E 0	S 0	Suppressor 1	-----	-----	-----
I	<i>mys</i> ^{olfC-x3}	07D5-7	wildtypisch	E 0	E 0	S 0	Suppressor 1	-----	-----	-----
I	<i>mys</i> ^{ts2}	07D5-7	larval letal	E 0	E 0	S 0	Suppressor 1-2	-----	-----	-----
I	5284 <i>fs(1)h</i> ¹	07D3-4	Kopf fehlt, posterior offen	E 0	E 0	S 0	Suppressor 1	-----	-----	-----
I	5285 <i>fs(1)h</i> ¹⁸	07D3-4	Kopf fehlt, posterior offen	E 0	E 0	S 0	Mix: S2-3 <i>fs(h)I</i> -ähnliche Kutikula	-----	-----	-----
I	5286 <i>fs(1)h</i> ⁴	07D3-4	Kopf fehlt, posterior offen	E 0	E 0	S 0	Suppressor 1-2	-----	-----	-----
I	5278 <i>fs(1)h</i> ^{TA54}	07D3-4	wildtypisch	E 0	E 0	S 0	Suppressor 1	-----	-----	-----
II	Def # 3638	21A1; 21B7-8	undiff, ohne Kopf	Enhancer E3	E 0	Suppressor 2-3	Suppressor 2-3	S 0	Suppressor 1-2	S 0
II	Def # 2892	29C1-2; 30C8-9	Kutikula undiff.	Enhancer E 2	E 0	Suppressor 4	Suppressor 2-3	Suppressor 2	Suppressor 2	S 0-1

Chr.	Linie Nr.	Region	Kutikula-Phänotyp	X GMR-Gal4-crb ^{intra} 38.1.2b	X GMR-Gal4-ΔERLI	X crb ^{11a22} (Kutikula)	X crb ^{8F105} (Kutikula)	X sdt ^{XD96} (Kutikula)	X sdt ^{XN05} (Kutikula)	X baz ^{Xi106} (Kutikula)
II	Def # 384	29C3-5; 30C8-9 (29D1-2; 30C4-D1)	undiff. Kutikula	Enhancer E 1	E 0	S 0	Suppressor 1	-----	-----	-----
II	Def # 368	30A1-2; 30D1-2	undiff. Kutikula	Enhancer E 1	E 0	S 0	Suppressor 1	-----	-----	-----
II	Def # 3702	30A3-5; 30C2-5	Kopf ok, post. offen	Enhancer E 1	E 0	S 0	Suppressor 1-2	-----	-----	-----
II	P - 11097	29E1-2	-----	E 0	E 0	S 0	S 0	-----	-----	-----
II	EMS - 2749	raw (29E4-6)	dorsal offen	Enhancer E 3	E 0	Suppressor 1	Suppressor 2-3	S 0	S 0 (-1)	S 0
II	P - Z284	raw	dorsal offen	Enhancer E 1	E 0	Suppressor 1	Suppressor 1	-----	-----	-----
II	P - 10363	raw	dorsal offen	E 0 (-1)	E 0	Suppressor 1	Suppressor 1	S 0	S 0	S 0
II	# 5104 = rem ¹ = RA24	rem (30A3 -C5)	undiff. Kutikula	E 0	E 0	S 0	Suppressor 2-4	S 0	S 0	S 0
II	RA74 = rem ²	rem	undiff. Kutikula	E 0	E 0	S 0	Suppressor 1-2	-----	-----	-----
II	P 271	d[1] <i>dachs</i> , 29C	-----	E 0	E 0	S 0	-----	-----	-----	-----
II	P 11062	29C03-05	-----	E 0	E 0	S 0	-----	-----	-----	-----
II	P 10656	29C01-03	-----	E 0	E 0	S 0	-----	-----	-----	-----
II	P 11195	29C03-04	-----	E 0	E 0	S 0	-----	-----	-----	-----
II	P 11070	29C01-02	-----	E 0	E 0	S 0	-----	-----	-----	-----
II	P 10492	29C01-03	-----	E 0	E 0	S 0	-----	-----	-----	-----
II	P 5431	29C	-----	E 0	E 0	S 0	-----	-----	-----	-----
II	Def # 3079	32F1-3; 33F1-3	undiff. Kutikula	Enhancer E 1-2	E 0	Suppressor 3	-----	S 0	Suppressor 1-2	S 0
II	Def # 3344	33B2-3; 34A1-2 (33B2-3; 33F1-3)	undiff. Kutikula	Enhancer E 1-2	E 0	Suppressor 2	-----	S 0	S 0	S 0-1
II	Def # 3138	34B12-C1; 35B10-C1	dorsal offen	Enhancer E 3	E 0	Suppressor 1-3	Suppressor 3	S 0	S 0	S 0
II	Def # 3588	35B4-6; 35F1-7	dorsal offen	Enhancer E 3	E 0	Suppressor 1-3	Suppressor 3	Suppressor 1	Suppressor 1-2	S 0

Chr.	Linie Nr.	Region	Kutikula-Phänotyp	X GMR-Gal4- crb ^{intra} 38.1.2b	X GMR- Gal4- ΔERLI	X <i>crb</i> ^{11a22} (Kutikula)	X <i>crb</i> ^{8F105} (Kutikula)	X <i>sdt</i> ^{XD96} (Kutikula)	X <i>sdt</i> ^{XN05} (Kutikula)	X <i>baz</i> ^{Xi106} (Kutikula)
	Def # 6078	35B01;35B03-04	-----	E 0 (-1)	E 0	S 0	Suppressor 2-3	-----	-----	-----
	Def # 6070	35B01; 35E01	-----	E 0 (-1)	E 0	S 0	Suppressor 1	-----	-----	-----
	Def # 6241	35B03; 35B09-10	-----	E 0	E 0	S 0	Suppressor 1 (-2)	-----	-----	-----
	Def # 6057	35B02; 35B02-04	-----	Enhancer E 1	E 0	S 0	Suppressor 2	-----	-----	-----
	Def # 6110	35B01-02; 35B01-02	-----	Enhancer E 1	E 0	S 0	Suppressor 2 (-3)	-----	-----	-----
	Def # 6223	35B02-03;35B02-03	-----	Enhancer E 1	E 0	S 0	Suppressor 1	-----	-----	-----
	Def # 6063	35B02-03;35B10- C01	-----	E 0 (-1)	E 0	Suppressor 1	Suppressor 1	-----	-----	-----
	Def # 6059	35B02; 35C01-03	-----	E 0 (-1)	E 0	S 0	Suppressor 1	-----	-----	-----
	Def # 6058	35B02-03;35B07-08	-----	E 0 (-1)	E 0	Suppressor 1 (-2)	Suppressor 2-3	-----	-----	-----
	Def # 6113	35B03;35B10	-----	E 0 (-1)	E 0	Suppressor 1	Suppressor 1	-----	-----	-----
	Def # 3898	35B02;35C04-05	-----	E 0	E 0	S 0	S 0 (-1)	-----	-----	-----
	Def # 3213	35B02-03;35D05- 07	-----	E 0 (-1)	E 0	Suppressor 1	Suppressor 2-3	-----	-----	-----
	Def # 6242	35B02;35B07	-----	E 0	E 0	S 0	-----	-----	-----	-----
	Def # 6240	35B02;35D04	-----	E 0	E 0	S 0 (-1)	S 0 (-1)	-----	-----	-----
	Def # 3078	35B03; 35E06	-----	E 0 (-1)	E 0	Suppressor 1	Suppressor 1 (-2)	-----	-----	-----
	Def # 6088	35B04;35C03	-----	E 0	E 0	Suppressor 1-2	Suppressor 1 (-2)	-----	-----	-----
	Def # 6244	35B04;35D04	-----	E 0 (-1)	E 0	S 0	S 0	-----	-----	-----
	P - 12046	35B01-35B04	-----	E 0	-----	S 0	-----	-----	-----	-----
	P - 10810	35B06-35B10	-----	E 0	-----	S 0	Suppressor 2	-----	-----	-----
	P - 12173	35B06-35B07	-----	E 0	-----	S 0	Suppressor 1-2	-----	-----	-----

Chr.	Linie Nr.	Region	Kutikula-Phänotyp	X GMR-Gal4-crb ^{intra} 38.1.2b	X GMR-Gal4-ΔERLI	X crb ^{11a22} (Kutikula)	X crb ^{8F105} (Kutikula)	X sdt ^{XD96} (Kutikula)	X sdt ^{XN05} (Kutikula)	X baz ^{Xi106} (Kutikula)
II	Def # 2583	35F-36A; 36D	normal, leichte Zähnchen-Defekte	Enhancer E 4	E 0	Suppressor 1-2	Suppressor 2-3	-----	-----	-----
	P - 3656	35F11 – 36A2	-----	E 0 (-1)	E 0	S 0	-----	-----	-----	-----
	P - 10831	36A12-14	-----	E 0 (-1)	E 0	S 0	-----	-----	-----	-----
	P - 12047	36A1-2	-----	E 0 (-1)	E 0	S 0 (-1)	-----	-----	-----	-----
	P - 11174	36A4-5	-----	E 0 (-1)	E 0	S 0	-----	-----	-----	-----
	P - 12219	36A6-7	-----	E 0	E 0	S 0	-----	-----	-----	-----
	P - 11763	36A8-B6	-----	E 0	E 0	S 0	-----	-----	-----	-----
	P - 11139	36A10-11	-----	E 0	E 0	S 0	-----	-----	-----	-----
	P - 11115	36A10-11	-----	E 0	E 0	S 0	-----	-----	-----	-----
II	# 420	36C2-4; 37B9-C1	normal, teilweise undiff.	Enhancer E 1	E 0	S 0 (-1)	-----	S 0	S 0-1	S 0
II	# 3189	36E4-F1; 38A6-7	undiff., Kopf fehlt	Enhancer E 2-3	E 0	Suppressor 1-2	Suppressor 1-3	S 0	Suppressor 1-2 (-3)	S 0 ??
II	# 749	41A-B; 42A02-03	dorsal offen	Enhancer E 1	E 0	S 0 (-1)	-----	S 0	S 0	S 0
II	# 739	41A	dorsal offen	Enhancer E 2	E 0	S 0 (-1)	-----	S 0	Suppressor 1	S 0
II	# 1006	42A01-02; 42E06-F01	dorsal offen	Enhancer E 1	E 0	Suppressor 1	-----	S 0	S 0 (-1)	S 0
II	# 1007	42A01-02; 42E06-F01	dorsal offen	Enhancer E 1	E 0	Suppressor 1	-----	S 0	S 0 (-1)	S 0
II	# 1888	42B03-05; 43E15-18	undiff. Kutikula	Enhancer E 3	E 0	Suppressor 1-3	-----	S 0	Suppressor 1-2	S 0
II	# 190	47D3; 48B2	ventraler Zähnchenrasen	Enhancer E 2	E 0	Suppressor 1	Suppressor 2-3	S 0	S 0-1	S 0

Chr.	Linie Nr.	Region	Kutikula-Phänotyp	X GMR-Gal4-crb ^{intra} 38.1.2b	X GMR-Gal4-ΔERLI	X crb ^{11a22} (Kutikula)	X crb ^{8F105} (Kutikula)	X sdt ^{XD96} (Kutikula)	X sdt ^{XN05} (Kutikula)	X baz ^{Xi106} (Kutikula)
II	Def # 1142	47E3; 48A4	= # 190	Enhancer E 1-2	E 0	Suppressor 1	Suppressor 2	-----	-----	-----
II	Def # 1143	48A1-2; 48B-C1	Zähnen rasen (en)	Enhancer E 2-3	E 0	Suppressor 1	Suppressor 2-3	-----	-----	-----
II	Def # 1145	48A3-4; 48C6-8	-----	E 0	E 0	S 0	S 0	-----	-----	-----
II	Def # 2216	47F15; 48A1	Zähnen rasen (en)	Enhancer E 4-5	E 0	Suppressor 2-3	Suppressor 3	-----	-----	-----
II	Def # 3373	48A1; 48B5	Mix	Enhancer E 2-3	E 0	Mix, S0 + Suppr. 2-3	Mix, S0 + Suppr. 2-3	-----	-----	-----
II	P - 10604	47E5 - F1-2	-----	E 0	E 0	-----	-----	-----	-----	-----
II	P - 10532	47F1-2	-----	E 0	E 0	-----	-----	-----	-----	-----
II	P - 11222	47F4-9	-----	E 0	E 0	-----	-----	-----	-----	-----
II	P - 10631	48B1-2	-----	E 0	E 0	-----	-----	-----	-----	-----
II	P - 4400	48A	-----	E 0	E 0	-----	-----	-----	-----	-----
II	P - 5801	48A1-2	-----	E 0	E 0	-----	-----	-----	-----	-----
II	P - 11133	48A3-5	-----	E 0	E 0	S 0	S 0	-----	-----	-----
III	# 3640	71F1-4; 72D1-10	-----	Enhancer E 1	E 0	-----	-----	S 0	S 0	S 0
III	# 3641	71F3-5; 72D12	dorsal offen	Enhancer E 2	E 0	-----	-----	S 0	S 0	S 0
III	# 2607	75B10; 75C1-2	normal, leichte Kopfdefekte	Enhancer E 2	E 0	-----	-----	S 0	S 0	Suppr 1
III	# 1847	84D11; 84F16	dorsal offen	Enhancer E 3	E 0	-----	-----	S 0	S 0	S 0
III	# 3053	84E12-13; 85A6-11	-----	Enhancer E 3	E 0	-----	-----	S 0	Suppressor 0-1	S 0
III	# 1943	84F2; 85B1	-----	Enhancer E 3	E 0	-----	-----	S 0	S 0	S 0
III	# 1931	85D8-12; 8E7-F1	dorsal offen	Enhancer E 1	E 0	-----	-----	S 0 (-1)	S 0	Suppr 1 ???
III	# 1893	85D11-14; 85F16	-----	Enhancer E 4	E 0	-----	-----	S 0	S 0	S 0
III	# 1937	85D12; 85E10	dorsal offen	Enhancer E 2	E 0	-----	-----	S 0	Suppressor 1	S 0
III	# 771	86C1-2; 86D8	dorsal offen	Enhancer E 3	E 0	-----	-----	S 0	Suppressor 1-2	S0

Chr.	Linie Nr.	Bruchpunkte	Kutikula-Phänotyp	X GMR-Gal4- <i>crb</i> ^{intra} 38.1.2b	X GMR-Gal4- Δ ERLI	X <i>crb</i> ^{11a22} (Kutikula)	X <i>crb</i> ^{8F105} (Kutikula)	X <i>sdt</i> ^{XD96} (Kutikula)	X <i>sdt</i> ^{XN05} (Kutikula)	X <i>baz</i> ^{Xi106} (Kutikula)
III	# 3128	86C1; 87B1-5	undiff. Cuticula	Enhancer E 3	E 0	-----	-----	S 0	S 0	-----
III	# 3003	86E2-4; 87C6-7	-----	Enhancer E 3	E 0	-----	-----	S 0	S 0	-----
III	# 4383	89C1-2; 89E1-2	-----	Enhancer E 2-3	E 0	-----	-----	Suppressor 1	S 0	-----
III	# 3012	91F1-2; 92D3-6 (91F5; 92D3-6)	-----	Enhancer E 3-4	E 0	-----	-----	S 0	S 0 (-1)	-----
III	# 1910	97A; 98A1-2	-----	Enhancer E 1-2	E 0	-----	-----	Suppressor 2-3	S 0	-----
III	# 1011	100D; F5	Embr verkürzt, keine Zähnen	Enhancer E 2	E 0	-----	-----	S 0	S 0 (-1)	-----

Tab. 4.18: Zusammenfassung des Modifier-Screens sowie weiterführender Kartierungen ausgewählter Regionen von Interesse

Die Tabelle gibt das Chromosom an, auf welchem diese Regionen liegen, die Nummer der Linie aus der Bloomington-Stockliste sowie der Name der Defizienz, ihre Bruchpunkte, so bestimmt ihr Kutikulaphänotyp, sowie ihre Auswirkungen auf den dominanten Augenphänotyp im Rahmen des Modifier-Screens und den mutanten embryonalen Phänotyp von amorphen *crumbs*-, *stardust*- und *bazooka*-Allelen. (----) bedeutet, dass der Versuch bislang nicht durchgeführt wurde. In Region 35C wurde die Kartierung der P-Elemente von N. Menne vorgenommen und mir für diese Liste zur Verfügung gestellt. Die Ergebnisse sind kursiv markiert

5. Diskussion

Das Transmembranprotein Crumbs ist als apikale Determinante an der Bildung und Aufrechterhaltung der *zonula adherens* (ZA) von Epithelzellen beteiligt. Maßgeblich verantwortlich für seine Funktion ist die C-terminal gelegene zytoplasmatische Domäne. Vermittelt über das ERLI-Motiv in diesem Bereich bildet Crumbs zusammen mit Stardust und Discs Lost den Subapikalen Komplex (SAC) (Bachmann et al., 2001; Bhat et al., 1999). Ausserdem interagiert es über die N-terminal gelegene Y₁₀E₁₆-Region (FERM-Domäne) mit einem zweiten Komplex, bestehend aus D-Moesin und β _H-Spektrin. Dieser verbindet Crumbs mit dem apikalen Spektrinzytoskelett und dem Aktinzytoskelett und stellt somit eine Verbindung zwischen Crumbs und den Komponenten der ZA dar (Medina et al., 2002b).

Diese grundlegenden Eigenschaften von Crumbs werden bei unterschiedlichen Schritten der Entwicklung von *Drosophila melanogaster* zur Strukturbildung genutzt. Die Bedeutung einzelner Domänen und in der Evolution konservierter Motive im Crumbs-Protein während einzelner Entwicklungsphasen und die dabei jeweils interagierenden Faktoren sind bisher nur teilweise erforscht. In der vorliegenden Arbeit wurden daher, die Rolle von Crumbs bei der Augenentwicklung, und morphologische Folgen ektopischer Überexpression des gesamten Proteins oder einzelner Domänen auf definierte Zelltypen und Bereiche des Facettenauges von *Drosophila* analysiert und dokumentiert. Individuelle morphologische Veränderungen, die als Konsequenz dieser Überexpression auftreten, sind Folge der Interaktion von Crumbs mit anderen Faktoren der Musterbildung. Um diese, über die bisher bekannten Interaktionspartner hinaus, aufzufinden, wurden in der vorliegenden Arbeit im *Drosophila*-Genom chromosomale Regionen ermittelt, in denen Gene liegen sollten, die die morphologischen Konsequenzen der *crumbs*-Überexpression modifizieren können.

Da unser Interesse vor allem der Funktion von Crumbs in embryonalen Epithelien und weniger seiner Funktion im Auge galt, wurde bei der Kartierung von potentiellen Modifikatoren die Kutikulaentwicklung der Embryonen als Phänotyp mit in die Untersuchung einbezogen.

5.1 Analyse des „rauh“ Augenphänotyps

Überexpression der zytoplasmatischen Domäne mit Hilfe des UAS/Gal4-Systems im Auge von *Drosophila* führt ebenso wie eine Überexpression des gesamten *crb*-Minigens zu einem dominanten rauhen Augenphänotyp (Klebes, Doktorarbeit, 1999; Pellikka et al., 2002; Izaddoost et al., 2002; diese Arbeit). Um festzustellen, welche morphologischen Veränderungen, die den „rauh“ Augenphänotyp bewirken, im Einzelnen auf Überexpression von Crumbs zurückzuführen sind, wurde die Morphologie der Augen wildtypischer Fliegen verschiedener Entwicklungsstadien mit der von Fliegen verglichen,

in welchen unterschiedliche transgene UAS-*crb*-Konstrukte in definierten Zelltypen der Augen ektopisch exprimiert worden waren. Die Entwicklung der Augenmorphologie wird in hohem Maße durch Phasen natürlichen Zelltods in bestimmten Zeiten und in festgelegten Bereichen mitbestimmt (Wolff und Ready, 1991a; Hay et al., 1994; Reiter et al., 1996; Brachmann und Cagan, 2003). Daher wurde auch verfolgt, in wieweit ektopische Expression von *crb*-Konstrukten diese Vorgänge beeinflusst.

Die beobachteten Unterschiede zum Wildtyp können der Störung der regulären Entwicklung einzelner Zelltypen zugeordnet werden, die im Umfang variieren können und einzeln oder in Kombination unterschiedlich starke Veränderungen der regulären Augenmorphologie bewirken können, die insgesamt unter dem Begriff „rauh“ zusammengefasst werden.

Im Einzelnen wurden folgende unterschiedliche Entwicklungsstörungen beobachtet:

- Ektopische *crumbs*-Expression unterdrückt den Zelltod in larvalen Imaginalscheiben.
- In pupalen Imaginalscheiben findet Zelltod statt, wenngleich er je nach ektopisch exprimiertem Transgen unterschiedlich stark gestört ist.
- Linsen-sezernierende Zellen und primäre Pigmentzellen sind in einigen Ommatidien verdoppelt.
- Interommatidiale (= sekundäre und tertiäre) Pigmentzellen und Borsten sind vervielfacht. Eine veränderte Anzahl und Organisation der Zellen verändert das wildtypische hexagonale Muster
- Neuorganisation und Auseinanderweichen der Linsen-sezernierenden Zellen führen zu einem Austritt von Zellen (möglicherweise Photorezeptorzellen) aus den Ommatidien und zu späteren Defekten während der Sekretion der Linse. In den meisten Fällen werden diese Ommatidien mit defekten Linsen im adulten Auge schwarz und vermutlich nekrotisch.
- Die Morphologie der Photorezeptorzellen ist gestört, ihre Rhabdomere sind fehlerhaft lokalisiert.

Je nach verwendetem Treiber- und Effektorstamm treten diese Veränderungen in unterschiedlicher Stärke und in unterschiedlicher Kombination auf. Augen mit einem „schwächer rauhen“ Augenphänotyp weisen nur einen Teil der beschriebenen Veränderungen auf, während man in „stärker rauhen“ Augen oft alle Defekte identifizieren kann.

Die Befunde werden unter drei Gesichtspunkten betrachtet:

- In welchen Zellen des Auges müssen die transgenen Konstrukte ektopisch exprimiert werden, um die beobachteten Phänotypen zu induzieren?
- Welche von den bislang bekannten Subdomänen von *Crumbs* sind an der Ausbildung einzelner phänotypischer Merkmale beteiligt sind?
- Können aus der Antwort auf die vorhergehenden Fragen Rückschlüsse darauf gezogen werden können, welche Prozesse ektopisch exprimiertes *Crumbs* im Auge beeinflusst?

Bevor weitergehende Ableitungen über die Funktion dieses Proteins bei der natürlichen Augenentwicklung bei *Drosophila* unternommen werden, muß beachtet werden, dass die beobachteten Effekte auf einer Überexpression von *crumbs* im Auge beruhen. Möglicherweise deckt sich die Funktion von ektopisch exprimiertem Crumbs im Auge nicht (ganz) mit der Funktion des endogen im Auge vorhandenen Proteins.

5.1.1 Abhängigkeit der Crumbs-induzierten Defekte vom Ort der Überexpression

In den drei augenspezifischen Treiberlinien, *elav*-Gal4, Gal4^{sev} und GMR-Gal4 wird Gal4 von der späten Larvalentwicklung (L3) an bis in das spät-pupale Auge hinein Zelltypspezifisch exprimiert. Abb. 5.1 zeigt schematisch in welchen Zellen der Augen die Treiberlinien Gal4 exprimieren sowie die durch lokalisierte Überexpression von UAS-*crb* im Auge induzierten Phänotypen.

elav-Gal4:

Augen, in denen das UAS-*crb*^{intra}-Konstrukt unter der Kontrolle von *elav*-Gal4 in den Photorezeptoren ektopisch exprimiert wurde, zeigen weder bei der äusseren Betrachtung einen rauhen Augenphänotyp, noch in Semidünnschnitten Defekte der Morphologie der Photorezeptorzellen (Abb. 5.1A/A'). Das gleiche gilt für eine ektopische Expression des *crumbs* Minigens (UAS-*crb*^{MINI}30.1.4b). Semidünnschnitte dieser Kreuzung weisen allerdings in einigen Photorezeptorzellen die Bildung eines vergrößerten „Lumens“ auf, was als ein Zeichen für eine Ausdehnung des Rhabdomerstiels beschrieben wurde (Pellicka et al., 2002). Die beobachteten Effekte sind jedoch im Gegensatz zum von diesen Autoren beschriebenen Phänotyp sehr schwach und treten äusserst selten auf, was möglicherweise in der Verwendung eines anderen Treiberstammes sowie einer niedrigeren Aufzuchttemperatur der Fliegen begründet liegt (Pellicka et al., 2002: Rho-Gal4 und 29°C). Mit Ausnahme dieser schwachen Defekte zeigen die Augen unter der Kontrolle von *elav*-Gal4 jedoch eine vollkommen wildtypische Organisation.

Gal4^{sev} :

Überexpression von *crumbs*^{intra} unter der Kontrolle von Gal4^{sev} in Photorezeptoren und Linsensezernierenden Zellen (Tomlinson et al., 1987) resultiert in allen oben aufgezählten Defekten mit Ausnahme derer von Photorezeptorzellen (Abb. 5.1.B/B'). Die Photorezeptorzellen sind in den meisten Kreuzungen nicht direkt von Veränderungen betroffen. Bei dem in Kreuzung Gal4^{sev} x UAS-*crb*^{intra}38.1.4a gelegentlich beobachteten Verlust von Photorezeptoren handelt es sich möglicherweise um sekundäre Defekte aufgrund einer veränderten Morphologie des Auges, da Photorezeptoren, wenn sie vorhanden sind, auch normal organisiert sind.

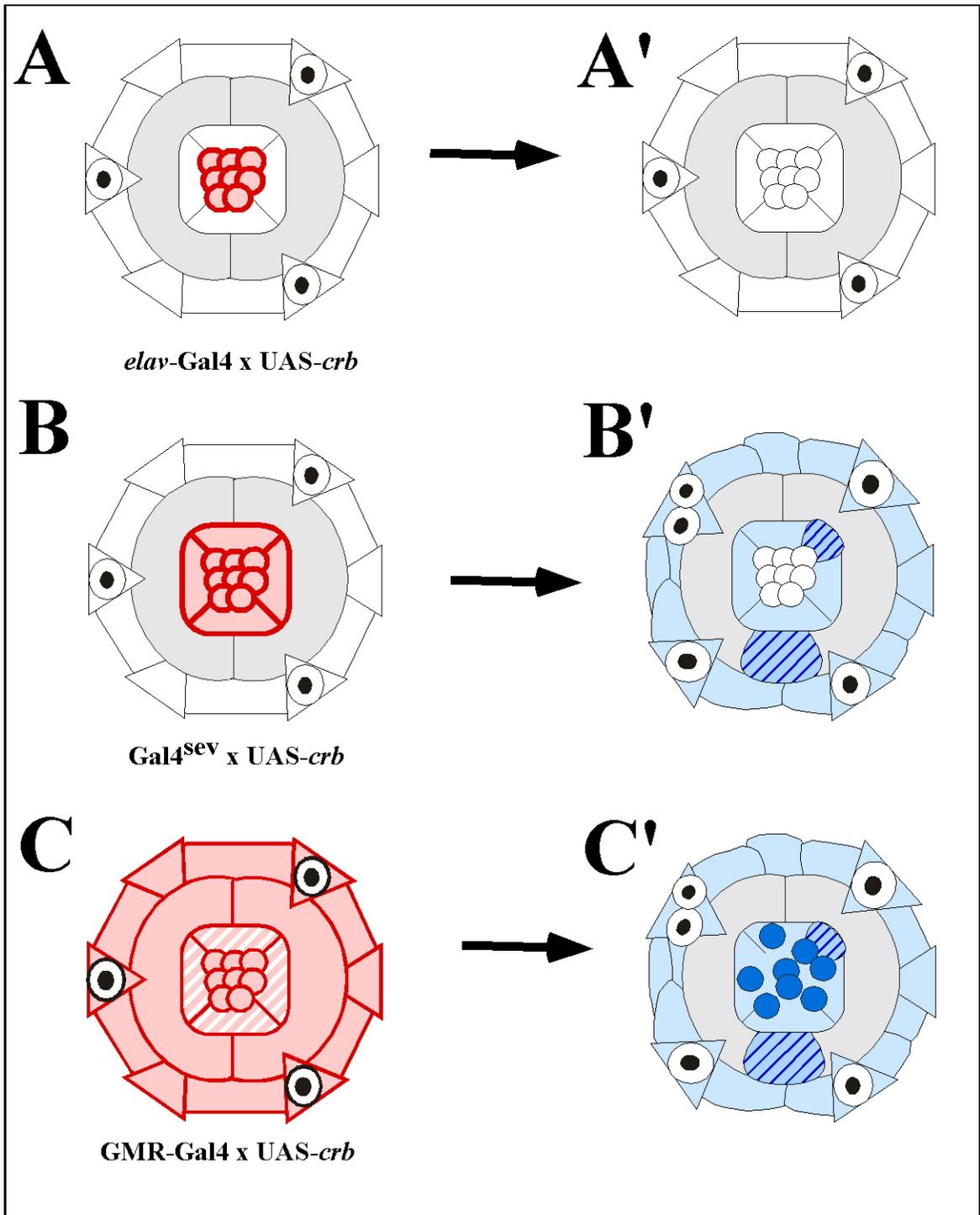


Abb. 5.1: Schematische Darstellung des Expressionsmusters der verwendeten Treiberlinien und der daraus resultierenden Veränderungen der Ommatidien

(A/A') Ektopische Expression von UAS-*crb* unter der Kontrolle von *elav*-Gal4 in den Photorezeptorzellen (rot) lassen im Vergleich mit dem Wildtyp keine Veränderungen erkennen. (B/B') Ektopische Expression unter der Kontrolle von Gal4^{sev} in Photorezeptorzellen und linsen-sezernierenden Zellen (rot) resultiert in einer erhöhten Anzahl von interommatidialen Pigmentzellen (hellblau), Linsen-sezernierenden Zellen, Pigmentzellen (schraffierte Zellen) und Borsten. Die Photorezeptorzellen sind jedoch nicht betroffen. (C/C') Ektopische Expression unter der Kontrolle von GMR-Gal4 in allen Zellen des sich entwickelnden Auges (rot), pupal mit Ausnahme der linsen-sezernierenden Zellen (in C schraffiert), resultiert in Veränderungen aller Zellen des Auges, eingeschlossen die Photorezeptorzellen, welche eine veränderte Anordnung und Morphologie aufweisen (dunkelblau).

GMR-Gal4:

In Augen, in welchen UAS-*crb* unter der Kontrolle von GMR-Gal4 in allen Zellen des sich entwickelnden Auges, pupal mit Ausnahme der Linsen-sezernierenden Zellen, exprimiert wurde (Ellis et al., 1993, Hay et al., 1994), findet man alle der beschriebenen mutanten Phänotypen, eine stark veränderte Morphologie der Photorezeptorzellen eingeschlossen (Abb. 5.1 C/C'). Letzteres deckt sich mit Ergebnissen von Izaddoost et al. (2002), die zeigen konnte, dass bei Überexpression von UAS-*crb*^{intra} unter der Kontrolle von GMR-Gal4 die *adherens junctions* der Photorezeptorzellen, fehlokalisiert werden, was zu einer Bildung ektopischer Zell-Zell-Kontakte und einem Verlust von Zellpolarität in den Photorezeptorzellen führt. Dieser Verlust von Zellpolarität bei Überexpression von UAS-*crb*^{intra} könnte die folgende Entwicklung der Photorezeptoren und Rhabdomere sowie ihre Anordnung nachhaltig stören und wäre eine mögliche Erklärung dafür, dass es in der vorliegenden Arbeit in den meisten Fällen nicht gelungen ist, die Morphologie der adulten Augen von Fliegen aus GMR-Gal4-Kreuzungen anhand von Semidünnschnitten zu analysieren bzw. die Schnitte zu deuten.

Ordnet man die gefundenen Phänotypen dem Expressionsmuster der Treiberlinien zu, so ergibt sich folgendes Modell:

elav-Gal4 und Gal4^{sev}:

Kreuzungen unter der Kontrolle von *elav*-Gal4 zeigen, dass obgleich Crumbs endogen in Photorezeptoren lokalisiert ist, eine Expression von ektopischem *crb*^{intra} weder die Photorezeptoren selbst schädigt, noch in den anderen Zellen des Auges Defekte hervorruft. Die Augendefekte sind zudem Unabhängig von einer Ausdehnung des Rhabdomerstiels, welche bei Überexpression von des *crb*-Minigens oder der extrazellulären Domäne beobachtet werden kann. Die in Gal4^{sev}-Kreuzungen gefundenen Defekte müssen daher spezifisch auf eine Überexpression von *crumbs* in den Linsen-sezernierenden Zellen zurückzuführen sein.

GMR-Gal4 :

Ektopische Expression von UAS-*crb* unter der Kontrolle von GMR-Gal4 bewirkt die gleichen mutanten Phänotypen erkennen, welche bereits in Augen von Tieren aus Kreuzungen mit Gal4^{sev} gefunden wurden. Zusätzlich findet man Defekte der Photorezeptorzellen.

Da sich die Expression der beiden Treiberlinien Gal4^{sev} und GMR-Gal4 dadurch unterscheidet, dass GMR-Gal4 (larval) neben den Photorezeptorzellen und Linsen-sezernierenden Zellen zusätzlich in den Pigmentzellen exprimiert wird, könnte man postulieren, dass die in diesen Kreuzungen gefundenen zusätzlichen Defekte der Photorezeptoren auf dieser Expression von UAS-*crb* in Pigmentzellen beruhen. Da bislang allerdings keine Treiberlinie getestet wurde, welche UAS-Konstrukte spezifisch in den Pigmentzellen exprimiert, kann zu diesem Zeitpunkt nicht entschieden werden, ob eine Expression in Pigmentzellen alleine ausreichend ist um die beobachteten Defekte der Photorezeptoren zu induzieren.

Bei der ektopischen Expression von UAS-*crb*^{intra} unter der Kontrolle von GMR-Gal4 wurde von Izaddoost et al. (2002) in pupalen Imaginalscheiben einen Verlust von Zellpolarität in den Photorezeptorzellen, basierend auf der Bildung ektopischer Zell-Zell-Kontakte nachgewiesen. Zudem ist eine Expression von Crumbs in benachbarten Zellen erforderlich, um eine Akkumulation dieses Proteins an Zell-Zell-Kontaktstellen zu gewährleisten. So können Crumbs-Moleküle gegenüberliegender Membranen direkt oder indirekt interagieren (Pellikka et al., 2002).

Zum Zeitpunkt der Streckung der Rhabdomere und Photorezeptorzellen stehen diese in direktem Kontakt mit den sie umgebenden sekundären und tertiären Pigmentzellen. Daher besteht bei einer Kreuzungen mit GMR-Gal4 ebenfalls die Möglichkeit, dass Überexpression von Crumbs in beiden Geweben, Photorezeptorzellen und interommatidialen Pigmentzellen, gleichzeitig zur Bildung ektopischer *adherens junctions* und damit zum Verlust von Zellpolarität führt. Eine Überexpression in Photorezeptorzellen alleine bewirkte dies nicht oder nur in geringem Maße, und damit bliebe dort die Zellpolarität weitgehend erhalten.

Obwohl das Expressionsmuster der beiden Treiberlinien Gal4^{sev} und GMR-Gal4 larval weitgehend identisch ist, bleibt zu beachten, dass während der Pupalentwicklung die Expression von GMR-Gal4 in den Linsen-sezernierenden Zellen nachläßt. Obwohl also die Expressionsmuster pupal voneinander abweichen, werden in pupalen Imaginalscheiben beider Arten von Kreuzungen dieselben Defekte gefunden. Dies könnte folgende Gründe haben:

Da nicht bekannt ist, wie lange ektopisch exprimiertes und im Folgenden fehllokalisiertes Crumbs-Protein erhalten bleibt, könnte möglicherweise eine Expression während der Larvalentwicklung in den Linsen-sezernierenden Zellen ausreichen, um sowohl den larvalen als auch den späteren pupalen Zelltod zu unterdrücken. Ebenso wäre es möglich, dass Crumbs pupal überhaupt nicht mehr benötigt wird. Die in der pupalen Scheibe beobachteten Defekte könnten allein als Auswirkungen früher, larvaler Veränderungen entstehen, d.h. durch Unterdrückung des larvalen Zelltods könnten zusätzliche interommatidiale Zellen allein durch ihre Anwesenheit den Zelltod in pupalen Imaginalscheiben stören, so dass eine Expression von Crumbs nicht mehr notwendig wäre, um in diesem Entwicklungsschritt den Zelltod zu beeinflussen.

In beiden Fällen wäre allein die ektopische Expression von Crumbs in larvalen Imaginalscheiben von Bedeutung, in der das Expressionsmuster der beiden Treiberlinien weitgehend übereinstimmt, um die später beobachteten Phänotypen entstehen zu lassen.

Eine weitere Möglichkeit der Erklärung der Crumbs-Wirkung bei der Musterbildung ergibt sich aus dem Expressionsmuster von Gal4^{sev}, das sich (neben einem Teil der Photorezeptoren) auf die Linsen-sezernierenden Zellen beschränkt. Ektopische Expression von UAS-*crb* in diesen Zellen führt dazu, dass eine erhöhte Anzahl interommatidialer Zellen, welche normalerweise durch Zelltod eliminiert würde, überlebt. Ein Signal das aufgrund von Überexpression von UAS-*crb* in den Linsen-

sezernierenden Zellen den Zelltod blockiert, müsste somit über die primären Pigmentzellen hinweg an die interommatidialen Vorläuferzellen vermittelt werden, wenn diese nicht vor oder während der Bildung primärer Pigmentzellen für einen kurzen Zeitraum mit den interommatidialen Vorläuferzellen in direkten Kontakt kommen. Möglicherweise erzielt eine Überexpression von GMR-Gal4 in primären Pigmentzellen und interommatidialen Vorläuferzellen einen vergleichbaren Effekt und unterbindet das Absterben der Pigmentzellen. Im Gegensatz zu Gal4^{sev} müsste dieser Effekt hier nicht über eine Zellreihe hinweg vermittelt werden. Daher könnten die Defekte sogar stärker ausfallen als in Gal4^{sev}-Kreuzungen.

Insgesamt reicht also eine ektopische Expression von UAS-*crb* in Photorezeptorzellen allein nicht ausreicht, um die für den rauhen Augenphänotyp charakterisierten Defekte zu induzieren. Überexpression in den Linsen-sezernierenden Zellen führt dagegen zu allen der aufgelisteten phänotypischen Veränderungen, mit Ausnahme der veränderten Morphologie der Photorezeptorzellen. Eine zusätzliche Expression von UAS-*crb* in den Pigmentzellen führt zu Defekten der Photorezeptorzellen, wobei in diesem Falle möglicherweise eine Expression in Pigmentzellen und Photorezeptoren zusammen für die beobachteten Veränderungen verantwortlich /notwendig ist.

5. 1. 2 Funktion der Subdomänen des Crumbs-Proteins bei der Erzeugung des Crumbs-induzierten rauhen Augenphänotyps

Ektopische Expression sowohl des *crb*-Minigens als auch der wildtypischen zytoplasmatischen Domäne, *crb*^{intra}, kann fast alle der oben aufgeführten Defekte induzieren (Defekte der Photorezeptorzellen allerdings in Abhängigkeit vom verwendeten Treiber). Die einzigen Unterschiede sind quantitativer Natur. Bei Überexpression von UAS-*crb*^{intra} treten Defekte der Linsen bzw. der hierdurch geschädigten Ommatidien auf, die mit schwarzer Verfärbung einhergehen. Im Gegensatz hierzu treten bei Überexpression des UAS-*crb*^{MINI}-Transgens unter der Kontrolle von GMR-Gal4 zwar in allen Ommatidien Linsendefekte auf, aber nur wenige von ihnen verfärben sich schwarz.

Dass sich die Phänotypen dieser beiden Kreuzungen quantitativ, jedoch nicht qualitativ unterscheiden, zeigt, dass allein die ektopische Expression der zytoplasmatische Domäne für die Ausbildung der beobachteten Defekte verantwortlich ist.

Sollte die beobachtete Schwarzfärbung morphologisch geschädigter Ommatidien auf Nekrose zurückzuführen sein, könnte man zudem postulieren, dass die extrazelluläre Domäne dafür sorgt, dass die Ommatidien trotz vorhandener Defekte überleben. Hierdurch könnte man der extrazellulären Domäne eine antinekrotische Funktion zuordnen. Ob diese möglicherweise mit einer Vergrößerung des Rhabdomerstiels in Verbindung gebracht werden kann (Pellicka et al., 2002), ist aufgrund der vorhandenen Daten nicht zu beantworten.

Ektopische Expression eines UAS-*crb*^{intra}-Konstruktes, in welchem sowohl die N-terminal gelegenen Aminosäuren Y₁₀ und E₁₆ mutiert sind als auch das C-terminale ERLI-Motiv deletiert ist (UAS-*crb*^{intra}Y₁₀E₁₆, ΔERLI) zeigen unter der Kontrolle von Gal4^{sev} und GMR-Gal4 einen wildtypischen Phänotyp (diese Arbeit; Izaddoost et al., 2002). Eine Anwesenheit beider Subdomänen der zytoplasmatischen Domäne ist also für die Ausbildung des rauhen Augenphänotyps zwingend erforderlich.

Verlust der Y₁₀E₁₆-Domäne in einem Konstrukt, in dem das ERLI-Motiv intakt ist, führt bei ektopischer Expression zu einem mittelstark rauhen Augenphänotyp, der sich weder qualitativ noch quantitativ von dem Phänotyp unterscheidet, den eine Überexpression des wildtypischen *crb*^{intra} hervorruft. Deletion von ERLI bei gleichzeitigem Erhalt der Y₁₀E₁₆-Domäne führt jedoch bei ektopischer Expression nur zu einem sehr schwach rauhen Augenphänotyp, der kaum vom Wildtyp zu unterscheiden ist. Dem ERLI-Motiv kommt also die entscheidende Rolle bei der Bildung des rauhen Augenphänotyps zu.

Bei Überexpression von UAS-*crb*^{intra}ΔERLI beobachtet man eine schwache Reduktion des larvalen Zelltods sowie eine geringfügige Zunahme von Pigmentzellen, was zeigt, dass ein geringer Anteil des beobachteten Phänotyps auch auf die zweite Domäne, Y₁₀E₁₆, zurückzuführen ist. Ihr kommt, wie ERLI, bei Überexpression eine schwache, antiapoptotische Wirkung zu. Ob die über das ERLI-Motiv vermittelten starken und die Y₁₀E₁₆-abhängigen, schwächen Defekte die gleichen Ursachen haben, ist auf der Basis der bisher durchgeführten phänotypischen Analysen nicht zu beurteilen.

Insgesamt zeigen die Phänotypen der verschiedenen Kreuzungen, dass alle gefundenen Defekte, wie Bildung zusätzlicher Linsen-sezernierender Zellen, Unterdrückung von Apoptose, Zunahme von Pigmentzellen und Defekte der Linsen-sezernierenden Zellen und späteren Linsen der adulten Ommatidien, zum grössten Teil über das ERLI-Motiv vermittelt werden. Dem Y₁₀E₁₆-Motiv kann eine schwache antiapoptotische Funktion zugeordnet werden. Die extrazelluläre Domäne von Crumbs hat möglicherweise eine antinekrotische Wirkung, welche die Ommatidien trotz starker morphologischer Schäden überleben läßt.

5. 1. 3 Vergleich der beobachteten Phänotypen mit bereits beschriebenen Effekten von ektopischer Crumbs-Expression in Auge und Embryo

Verlust von *crumbs* resultiert im embryonalen Epithel in einem Verlust von *adherens junctions*. Die so geschädigten Zellen verlieren den Kontakt zueinander, runden sich ab und werden später mittels Zelltod eliminiert (Grawe et al., 1996). Im Rahmen einer Struktur-Funktionsanalyse der Subdomänen der zytoplasmatischen Domäne in epithelialen Geweben wurde gezeigt, dass der Crb-C-Terminus mit einem intakten ERLI-Motiv für eine Lokalisation der Proteine Dlt und DE-Cadherin verantwortlich ist.

Überexpression des ERLI-Motivs und hierdurch bedingt eine Umverteilung von DE-Cadherin begünstigt vermutlich die Bildung neuartiger Zell-Zellkontakte und führt so zur Umorganisation einschichtiger Epithelien in ungeordnete, mehrschichtige Verbände (Klebes, 1999).

Der $Y_{10}E_{16}$ -Region kommt währenddessen in einem *crumbs*-mutanten Embryo eine antiapoptotische Funktion zu, welche den embryonalen Zelltod *crumbs*-mutanter Embryonen teilweise unterdrücken kann. Für eine Aufrechterhaltung des epithelialen Zellverbandes und Sekretion zusammenhängender Kutikula ist jedoch auch das ERLI-Motiv notwendig. Nur bei Anwesenheit beider Domänen können der Zelltod unterdrückt ($Y_{10}E_{16}$) und die Komponenten der *adherens junctions* stabilisiert und DE-Cadherin korrekt lokalisiert werden (ERLI), so dass ein Kontakt der Zellen zueinander hergestellt und eine zusammenhängende, Kutikula sezernierende Epidermis gebildet werden kann (Klebes, 1999).

Diese für das embryonale Epithel postulierte Funktion beider Subdomänen von Crumbs liefert einen möglichen Denkansatz für eine Funktion von UAS-*crb* bei der Erzeugung des rauhen Augenphänotyps: Da das Überleben von Zellen der larvalen und pupalen Imaginalscheiben unter anderem von der Anwesenheit und/oder Neuorganisation von Zell-Zell-Kontakten abhängig ist (Reiter et al., 1996), könnte eine über das ERLI-Motiv vermittelte Umorganisation von DE-Cad und veränderte Adhäsionseigenschaften der interommatidialen Zellen untereinander den programmierten Zelltod unterdrücken, aber möglicherweise (pupal) nicht vollständig eliminieren. Ob Zellen larvaler Augenimaginalscheiben bei UAS-*crb*-Überexpression wie embryonale Epithelien ebenfalls eine mehrschichtige Organisation aufweisen wurde bislang nicht untersucht.

In einem gewissen Widerspruch hierzu stehen die Ergebnisse von Izaddoost et al. (2002), die dem $Y_{10}E_{16}$ -Motiv während der Entwicklung der Photorezeptorzellen eine Rolle bei der Lokalisierung von Komponenten der *adherens junction*, DE-Cadherin und β -Catenin, im Bereich des Rhabdomerstiels zuordnen. Das ERLI-Motiv soll hingegen für die Lokalisation von Dlt verantwortlich sein. Ektopische Expression der $Y_{10}E_{16}$ -Domäne führt zu ektopischen *adherens junctions*, während Überexpression eines Transgens mit intaktem ERLI-Motiv in einer Fehllokalisierung von Dlt resultiert. Erst Überexpression eines vollständigen *crb*^{intra}-Konstruktes, in welchem beide Domänen intakt sind, resultiert sowohl in ektopischen *adherens junctions* als auch in einer Fehlverteilung von Dlt verbunden mit einem Verlust von Zellpolarität.

Dies würde bedeuten, dass im Gegensatz zum embryonalen Epithel in den Photorezeptoren nicht der C-Terminus der zytoplasmatischen Domäne für eine korrekte Lokalisation von DE-Cadherin verantwortlich ist, sondern stattdessen die $Y_{10}E_{16}$ -Region. Dem ERLI-Motiv wird von diesen Autoren durch seine Interaktion mit Dlt eine stabilisierende, jedoch keine adhäsive Wirkung zugesprochen.

Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse kann dieser Widerspruch nicht aufgelöst werden. Offensichtlich sind beide Subdomänen der intrazellulären Domäne von Crumbs an der Lokalisation und Stabilisierung von DE-Cadherin beteiligt.

Eine Entscheidung darüber, welche von beiden eine überwiegende Bedeutung besitzt, könnte beispielsweise davon abhängig sein, in welchem Gewebe Crumbs agiert und welche Funktion es an dieser Stelle erfüllen muss. Zudem bleibt zu bedenken, dass die untersuchten Phänotypen auf Überexpression von Crumbs im Auge beruhen. Die aus den beobachteten Phänotypen abgeleitete Vorstellung über die Bedeutung der Subdomänen von Crumbs ist möglicherweise nicht auf das endogene Protein übertragbar.

Der extrazellulären Domäne von Crumbs konnte während der Embryonalentwicklung bislang keine Funktion zugeordnet werden. Im Auge jedoch ist sie an der Morphogenese des Rhabdomerstiels der Photorezeptorzellen beteiligt. Überexpression eines membrangebundenen UAS-*crb*^{extra}-Konstruktes führte zur Ausdehnung des Stiels, der wiederum in *crumbs*-Mutanten stark verkürzt ist (Pellicka et al., 2002; Johnson et al., 2002). Ebenso ist diese Domäne in der Lage, in einem degenerativen, lichtinduzierten Augenphänotyp den programmierten Zelltod zu unterdrücken und so den Phänotyp abzuschwächen (Johnson et al., 2002). *crb*^{extra} wirkt in diesem Falle antiapoptotisch.

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Befunde deuten an, dass durch Überexpression des vollständigen *crumbs*-Minigens im Auge möglicherweise ein Absterben morphologisch geschädigter Ommatidien verhindert werden kann. Wie solch ein antinekrotischer Effekt erzielt werden könnte, wurde bislang nicht näher untersucht.

Möglicherweise spielen bei der beobachteten Unterdrückung von Nekrose rein mechanische Aspekte eine Rolle. Defekte der Linse führen zu einem Austritt von Zellen, zu denen zum Teil auch Photorezeptorzellen gehören. Dieser Vorgang setzt diese Zellen mechanischem Stress aus (morphologische Veränderungen, Verlust von Kontakt zueinander). Die Zellen werden hierdurch nekrotisch und sterben. Überexpression der extrazellulären Domäne von *crumbs* oder des gesamten *crb*-Minigens führt zu einer Ausdehnung des Rhabdomerstiels. Möglicherweise verringert dies den mechanischen Stress, dem die Zellen ausgesetzt sind, oder fördert ihren Zusammenhalt, so dass sie während des Austritts aus den Ommatidien in erheblich geringerem Ausmaß geschädigt werden, als bei Überexpression von *crb*^{intra}, und größtenteils überleben.

5.1.4 Ein Modell für die Rolle von Crumbs während der Etablierung der zellulären Geometrie in der Retina von *Drosophila*.

Um ein Modell für die Entstehung der morphologischen Defekte, welche durch eine ektopische Expression von *crumbs* im Auge von *Drosophila* entstehen, entwickeln zu können, ist es notwendig, verschiedene Prozesse der Augenentwicklung, in die eine Überexpression von Crumbs eingreift, einzeln zu betrachten. Folgend Wirkungen wurden beobachtet:

- 1.) Bei Überexpression von *crumbs* werden zusätzliche Linsen-sezernierender Zellen und primärer Pigmentzellen gebildet.
- 2.) Der larvale Zelltod wird durch Überexpression von *crumbs* unterdrückt.
- 3.) Der pupale Zelltod wird gestört, aber nicht vollständig unterdrückt.

Crumbs greift also vermutlich in verschiedene Mechanismen der Augenentwicklung ein. Der beobachtete Endphänotyp ist somit ein additiver, der sich aus verschiedenen Teilaspekten zusammensetzt.

Im Folgenden wird beschrieben, welche molekularen Faktoren und Abläufe bisher mit der Steuerung dieser drei Prozesse, Spezifizierung von Zelltyp und Anzahl sowie Eliminierung überzähliger Zellen im larvalen oder im pupalen Stadium bekannt sind. Darauf aufbauend werden Arbeitshypothesen gebildet, wie Crumbs-Überexpression in diese Vorgänge eingreift.

1.) Bildung von Linsen-sezernierenden Zellen und primären Pigmentzellen

Linsen-sezernierende Zellen werden nach Spezifizierung der Photorezeptorzellen in den larvalen Augenimaginalscheiben gebildet. Sie entstehen aus einer sogenannten „R7-Äquivalenzgruppe“, einer Gruppe von Zellen, welche das Gen *sevenless* exprimiert und später fünf der sieben Photorezeptoren sowie die vier Linsen-sezernierenden Zellen bildet. Die Determination zu Linsen-sezernierenden Zellen geschieht unter der Kontrolle von Ras1 (aktiviert über EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) und seinen Liganden Spitz). Ras1 entgegengesetzt wirkt ein bislang unbekanntes Signal, das inhibierend wirkt und verhindert, dass sich weitere der bis dahin unspezifizierten interommatidialen Zellen zu Linsen-sezernierenden Zellen entwickeln. Die Funktion dieser beiden antagonistisch wirkenden Signale, wird durch die Aktivität von Canoe (Cno) moduliert. Hierbei handelt es sich um ein PDZ-Protein, das, an den *adherens junctions* lokalisiert ist und mittels seiner PDZ-Domäne Membranproteine zu funktionellen Komplexen verbinden kann. Gleichzeitig ist es in der Lage, mit Ras1 zu interagieren. Die modulierende Funktion von Cno entscheidet in diesem Fall über eine Anzahl von vier Linsen-sezernierenden Zellen. Bei Verlust von Cno kommt es (bei starken *cno* Allelen) zu einem Verlust von Linsen-sezernierenden Zellen, Überexpression von *cno* hingegen resultiert in einer stark erhöhten Anzahl. (Matsuo et al., 1997).

Zusätzliche Linsen-sezernierende Zellen entstehen durch Rekrutierung von retinalen Vorläuferzellen der sich entwickelnden Imaginalscheibe. Diese Rekrutierung geht auf Kosten von interommatidialen Vorläuferzellen, welche sich normalerweise zu interommatidialen Pigmentzellen entwickeln oder mittels Apoptose eliminiert werden würden. Imaginalscheiben von Tieren, deren Augen später eine stark erhöhte Anzahl Linsen-sezernierender Zellen aufweisen, zeigen daher in Acridinorangefärbungen keinen Zelltod (Matsuo et al., 1997; Matsuo et al., 1999).

Die Determination primärer Pigmentzellen in frühen pupalen Imaginalscheiben verläuft ähnlich wie zuvor die der Linsen-sezernierenden Zellen in drei Schritten: Etablierung einer Äquivalenzgruppe (eine für jede der beiden primären Pigmentzellen), Determination einer Zelle pro Äquivalenzgruppe als primäre Pigmentzelle und laterale Inhibition, durch welche ein Schicksal als primäre Pigmentzelle in allen anderen Zellen der Äquivalenzgruppe(n) unterbunden wird (Miller und Cagan, 1998).

Wie die Linsen-sezernierenden Zellen, stehen die primären Pigmentzellen ebenfalls unter der Kontrolle der aktivierenden EGFR/Ras1-Signaltransduktionskaskade. Ras1 entgegengesetzt wirken in diesem Falle der Transmembranrezeptor Notch und sein Ligand Delta. (Cagan und Ready, 1989a, b; Miller und Cagan, 1998; Parks et al., 1995; Freeman, 1997)

Obgleich die primären Pigmentzellen in direktem Kontakt zu den Linsen-sezernierenden Zellen stehen konnte gezeigt werden, dass diese keinen direkten Einfluss auf Anzahl und Positionierung der primären Pigmentzellen haben (Miller und Cagan, 1998).

Einfluß von Crumbs auf die Determinierung von Linsen-sezernierenden Zellen und primären Pigmentzellen

Pupale Augenimaginalscheiben von Tieren, in denen Crumbs überexprimiert wurde, weisen in einigen Ommatidien zusätzliche Linsen-sezernierende Zellen sowie zusätzliche primäre Pigmentzellen auf. Hierbei ist die Anzahl der sich entwickelnden primären Pigmentzellen unabhängig von der Anzahl der vorhandenen Linsen-sezernierenden Zellen (Miller und Cagan, 1998). Zu welchem Zeitpunkt der Augenentwicklung die zusätzlichen Linsen-sezernierenden Zellen gebildet werden, wurde bislang nicht genauer untersucht. Denkbar wäre eine fehlerhafte Determination zusätzlicher Zellen während der Larvalentwicklung. Da aber bei Cobaltsulfidfärbungen ebenfalls Zellen gefunden wurden, welche aufgrund ihrer Position entweder Linsen-sezernierende Zellen oder primäre Pigmentzellen sein könnten, besteht ebenso die Möglichkeit, dass pupal vor oder während der Bildung der primären Pigmentzellen zusätzliche Linsen-sezernierende Zellen hinzukommen.

In embryonalen epithelialen Zellen führt eine Überexpression des C-Terminus von Crumbs zu einer Umverteilung von DE-Cadherin auf die gesamte Plasmamembran einer Zelle. Hierdurch wird möglicherweise die Bildung neuer Zell-Zell-Kontakte begünstigt, was zu einer Mehrschichtigkeit des epithelialen Gewebes (Klebes, 1999) bzw. zu einer Hyperadhäsivität der epithelialen Zellen untereinander führt (Dumstrei et al., 2002). Ebenso schlägt ein Modell vor, dass Cadherine in der Lage sind, durch eine physikalische Assoziation mit Komponenten des Ras-Signaltransduktionswegs zu interagieren und hierdurch Zelltod zu unterdrücken oder Determinationsprozesse zu beeinflussen (Xu et al., 1997). *Crumbs*-Überexpression könnte also in der Augenimaginalscheibe, ähnlich wie im embryonalen Epithel, eine Umverteilung von DE-Cadherin induzieren und über dessen Interaktion mit der aktivierenden Ras1-Signaltransduktionskaskade die Bildung oder Determination zusätzlicher

Zellen fördern. Hierbei könnte es zum einen in der larvalen Imaginalscheibe die Ras1/Cno-abhängige Determination von Linsen-sezernierenden Zellen beeinflussen und pupal die Ras1/Notch-abhängige Determination primärer Pigmentzellen. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass Crb/DE-Cadherin-induzierte, ektopische Zell-Zell-Kontakte Einfluss auf die später normalerweise erfolgende laterale Inhibition nehmen und so die Determination weiterer primärer Pigmentzellen induzieren.

2.) Larvaler Zelltod

Im ersten Zelltodschrift werden in der larvalen Imaginalscheibe hinter der morphogenetischen Furche nicht determinierte, interommatidiale Vorläuferzellen, nicht aber bereits spezifizierte Photorezeptoren oder Linsen-sezernierende Zellen mittels Zelltod eliminiert (Wolff und Ready, 1991a). Sterben oder Überleben von Zellen ist hierbei, wie auch später in der pupalen Scheibe, vor allem abhängig von der Aktivität der EGFR/Ras1-Signaltransduktionskaskade (Baker und Yu, 2001).

Das EGFR-abhängige Überlebenssignal wirkt hierbei durch Inhibierung des proapoptischen Gens *hid* (*head involution defective*) auf DIAP1 (*Drosophila Inhibitor of Apoptosis 1*), einen Apoptoseinhibitor (Bergmann et al., 1998; Kurada und White, 1998; Miller und Cagan, 1998; Wang et al., 1999). DIAP1-Aktivität wiederum hemmt die Aktivität verschiedener Initiator- und Effektor-Kaspasen, welche für die Ausführung des Zelltods notwendig sind. Die Aktivität einiger dieser Kaspasen läßt sich durch Überexpression des Baculovirus-Proteins p35 unterbinden (Yu et al., 2002; Abb. 5.2).

Wie in larvalen Imaginalscheiben diese Signaltransduktionskaskade aktiviert wird, ist bislang ebensowenig bekannt wie der Mechanismus, durch den einzelne Zellen, welche mittels Zelltod eliminiert werden, ausgewählt werden. Ein Modell sieht vor, dass möglicherweise der diffusible EGFR-Ligand Spitz, der von den Linsen-sezernierenden Zellen gebildet wird, an diesem Vorgang beteiligt ist. Entfernung interommatidialer Vorläuferzellen von den Linsen-sezernierenden Zellen, sowie Zellkontakte der Zellen untereinander, würden über Stärke und Reichweite des Spitz-Signals entschieden. Zellen, welche die niedrigste Spitz-Konzentration erhalten bzw den geringsten Zellkontakt zu Nachbarzellen aufweisen, würden möglicherweise sterben. Allerdings kann die Anwesenheit weiterer Signale, welche ein Überleben der Zellen sichern, nicht ausgeschlossen werden (Baker und Yu, 2001).

Unterdrückung des larvalen Zelltods durch Crumbs

Das Baculovirus-Protein p35 ist während Augenentwicklung von *Drosophila* in der Lage alle drei Zelltodphasen zu unterdrücken (Hay et al., 1994; Yu et al., 2002). Hierbei wirkt es inhibierend auf eine Reihe von am Zelltod beteiligten Initiator-Kaspasen. Im Gegensatz hierzu ist von der Überexpression von UAS-crb nur der larvale Zelltodschrift vollständig betroffen. Der pupale Zelltodschrift findet, wenngleich gestört, statt und die Eliminierung der Perimeter Cluster findet

normal statt. Dies ist ein Hinweis darauf, dass *Crumbs* nicht, wie *p35* generell, in der Lage ist, in Zelltod-Prozesse einzugreifen und auf andere Art und Weise den Zelltod unterbindet.

Eine Möglichkeit, larvalen Zelltod zu unterdrücken, ist eine Spezifizierung von Zellen zu Linsen-sezernierenden Zellen. Rekrutierung dieser zusätzlichen Zellen findet auf Kosten interommatidialer Vorläuferzellen statt, welche sich normalerweise zu interommatidialen Pigmentzellen weiterentwickeln oder mittels Apoptose eliminiert werden würden (Matsuo et al., 1997). Sollte ektopisches *crumbs* bereits während dieses Schrittes die Spezifizierung Linsen-sezernierender Zellen beeinflussen, so wären diese vom larvalen Zelltod ausgenommen. Der beobachtete Effekt (eine zusätzliche Linsen-sezernierende Zelle pro Ommatidium) ist jedoch nicht stark genug, um hierdurch den larvalen Zelltod, wie in 4.1.5 gezeigt, vollständig zu unterdrücken.

Somit muss *Crumbs* auf andere Art und Weise zusätzlich in der Lage sein, Zelltod zu unterdrücken.

Dies könnte, ähnlich wie bei der vorherigen Determination der Linsen-sezernierenden Zellen durch eine *crb*^{intra}-induzierte Rekrutierung von DE-Cadherin erfolgen, die über eine Etablierung ektopischer Zell-Zell-Kontakte möglicherweise eine erhöhte Diffusion von Spitz und dadurch Aktivität der EGFR-Signaltransduktionskaskade und ein Überleben zusätzlicher Zellen gewährleistet.

3.) Pupaler Zelltod

Im Gegensatz zum Zelltod in der larvalen Imaginalscheibe, welcher (vermutlich) noch wenig spezifisch verläuft, ist, um ein regelmäßiges Augenmuster zu erzeugen, ein solcher in der pupalen Imaginalscheibe nicht mehr ausreichend. Hier ist es notwendig, durch Zellsortierung die Vorläufer der interommatidialen Pigmentzellen neu zu organisieren und dann mittels programmierten Zelltods individuelle Zellen, die nicht in das regelmäßige Zellmuster passen, zu identifizieren und spezifisch zu eliminieren. Die Zellsortierung findet in pupalen Imaginalscheiben durch eine Reorganisation von Zellkontakten statt. Hierbei werden die zuvor noch in mehreren Schichten nebeneinanderliegenden interommatidialen Vorläuferzellen zu einschichtigen Ketten organisiert, in welchen die Zellen Kopf-an-Kopf liegen. Ist dieser Schritt erfolgt, werden spezifische Zellen durch Zelltod eliminiert (Reiter et al., 1996). Findet allerdings eine Zellsortierung nicht oder nur unvollkommen statt, so unterbleibt in der Regel auch der nachfolgende Zelltodschritt oder findet in abgeschwächter Form in Abhängigkeit vom Grad der Zellsortierung statt.

An diesen Prozessen beteiligt sind drei Gene, deren Mutanten rauhe Augenphänotypen mit einer erhöhten Anzahl an Pigmentzellen zeigen: *Notch* (*N*) (Fehon et al., 1991), *Irregular-Chiasm-roughest* (*IrreC-rst*) und *echinus* (*ec*) (Wolff und Ready, 1991a).

Das Gen *Notch* kodiert für einen grossen Transmembran-Signalrezeptor, der im Auge von *Drosophila* während des Zelltodstadiums spezifisch in allen interommatidialen Vorläufern exprimiert wird, früher jedoch auch, wie oben erwähnt, an der Bildung der primären Pigmentzellen beteiligt ist (Fehon et al., 1991; Wolff und Ready, 1991a).

Wird das temperatursensitive Notch-Allel, *Notch^{ts1}* erst nach Bildung der primären Pigmentzellen einer restriktiven Temperatur ausgesetzt, so erhält man zusätzliche interommatidiale Pigmentzellen (Gorski et al., 2000).

Das Gen *IrreC-rst* kodiert für ein Adhäsionsmolekül der Immunglobulinfamilie (Ramos et al., 1993; Schneider et al., 1995). Im Wildtyp wird das Protein in allen interommatidialen Vorläuferzellen gebildet und unter Kontrolle von Notch und dessen Liganden Delta an den Zellgrenzen zwischen primären Pigmentzellen und interommatidialen Zellen lokalisiert, nicht aber an den Grenzen der interommatidialen Zellen untereinander (Reiter et al., 1996; Gorski et al., 2000, siehe Abb. 5.2). Unter der Kontrolle von *IrreC-rst*, sowie einem bislang unbekanntem Bindungspartner in den primären Pigmentzellen, erfolgt eine adhäsionsgesteuerte Zellsortierung derart, dass die interommatidialen Vorläuferzellen den grösstmöglichen Kontakt zu den primären Pigmentzellen aufweisen (Reiter et al., 1996).

In *IrreC-rst*-Verlustmutanten fehlt den interommatidialen Zellen während der Zellsortierung der durch *IrreC-rst* vermittelte Kontakt zu den primären Pigmentzellen. Hierdurch wird die Reorganisation der interommatidialen Zellen und Bildung neuer Zell-Zell-Kontakte unterbunden, was zur Folge hat, dass der normalerweise folgende Zelltodschrift ebenfalls unterbleibt. Die sekundären und tertiären Pigmentzellen sind in *IrreC-rst*-Mutanten vervielfacht und liegen oft parallel nebeneinander (*IrreC-rst^{CT}*), anstatt in Kettenform Kopf-an-Kopf. Schwächere *IrreC-rst*-Mutanten (z.B. das hypomorphe Allel *IrreC-rst³*), in welchen noch eine geringe Reorganisation und Zelltod stattfindet, zeigen das bei Überexpression von *UAS-crb* oft beobachtete „Sternmuster“ in welchem sich die überzähligen interommatidialen Pigmentzellen anordnen (Tanenbaum et al., 2000). Einen vergleichbaren Phänotyp findet man ebenfalls in *Notch^{ts}*-Augen, wenn sie nach Etablierung der primären Pigmentzellen der restriktiven Temperatur ausgesetzt wurden und somit das Gen inaktiviert wurde (Gorski et al., 2000).

Überexpression von *IrreC-rst* weist einen seiner Mutante ähnlichen Phänotyp auf. *IrreC-rst* wird hierbei an allen Zellmembranen der interommatidialen Zellen lokalisiert. Die Zellen finden bei einer adhäsionsgesteuerten Neuorganisation keine spezifischen Zell-Kontakte, an denen sie sich orientieren können, und eine Zellsortierung unterbleibt ebenso wie der folgende Zelltodschrift.

Über das dritte Gen, *echinus*, ist bislang wenig bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass obgleich der Schritt der Zellsortierung in *echinus*-Mutanten funktioniert, der abschließende Zelltodschrift teilweise gestört ist. *echinus* könnte also möglicherweise eine Rolle bei der Spezifizierung der zum Zelltod verurteilten Zellen zukommen (Wolf und Ready, 1991a; Reiter et al., 1996).

Der Phänotyp von *echinus*-Mutanten ähnelt dem bei einer Überexpression von p35 im Auge beobachteten Phänotyp. Das Baculovirus-Protein p35 ist während der gesamten Entwicklung von *Drosophila* in der Lage inhibierend auf einen Teil der Kaspasen der in Abb.5.2 gezeigten EGFR/MAPK/Hid-Kaskade zu wirken (Hay et al., 1994; Yu et al., 2002). Da p35 allerdings erst spät in die Zelltod-Kaskade eingreift, ist der von *IrreC-rst* gesteuerte Prozess der Zell-Reorganisation sowie

die Lokalisation des IrreC-rst-Proteins selbst von p35-Überexpression nicht betroffen (Reiter et al., 1996). Gleiches gilt für die Apoptoseinhibitoren DIAP1/DIAP2, welche die Zellsortierung ebenfalls nicht beeinträchtigen, allerdings den Zelltod unterdrücken, und später, wie p35, im dritten Zelltodschriff die Randommatidien („*Perimeter Cluster*“) retten können (Hay et al., 1995).

Yu et al. (2002, siehe Abb. 5.2) stellten ein Modell vor, in welchem die Aktivität der für ein Überleben von interommatidialen Zellen notwendigen EGFR-Signaltransduktionskaskade von der Aktivität von Notch abhängig ist. Notch ist demnach in der Lage, die EGFR-Signaltransduktionskaskade zu unterdrücken, wodurch die Zellen sterben würden. Es kann jedoch über ein bislang unbekanntes Signal der Linsen-sezernierenden Zellen oder primären Pigmentzellen inhibiert werden, was ein Überleben der Zellen gewährleistet. Ein Überleben von Zellen ist also von Aktivität oder Inhibierung von Notch abhängig. Gleichzeitig ist aber eine korrekte Lokalisation von IrreC-rst für die Reorganisation interommatidialer Zellen zwingend erforderlich (Reiter et al., 1996), und Notch-Aktivität in den interommatidialen Zellen ist für eine solche Lokalisation von IrreC-rst direkt verantwortlich (Gorski et al., 2000; Brachmann und Cagan, 2002).

Da also zum einen Notch-Aktivität in allen interommatidialen Zellen notwendig ist, um IrreC-rst korrekt zu lokalisieren, andererseits aber eine konstante Notch-Aktivität in den interommatidialen Zellen unweigerlich deren Tod zur Folge hätte, muss man einen regulatorischen Mechanismus postulieren, der eine Notch-abhängige IrreC-rst-Lokalisation zulässt, ohne gleichzeitig die EGFR-Signaltransduktionskaskade zu inhibieren. Unter der Kontrolle von IrreC-rst könnte eine Sortierung der interommatidialen Zellen erfolgen, und erst nach Abschluss dieser Sortierung würde in einzelnen Zellen Notch aktiviert, dadurch die EGFR-Signaltransduktionskaskade inhibiert und die Zellen durch Zelltod eliminiert.

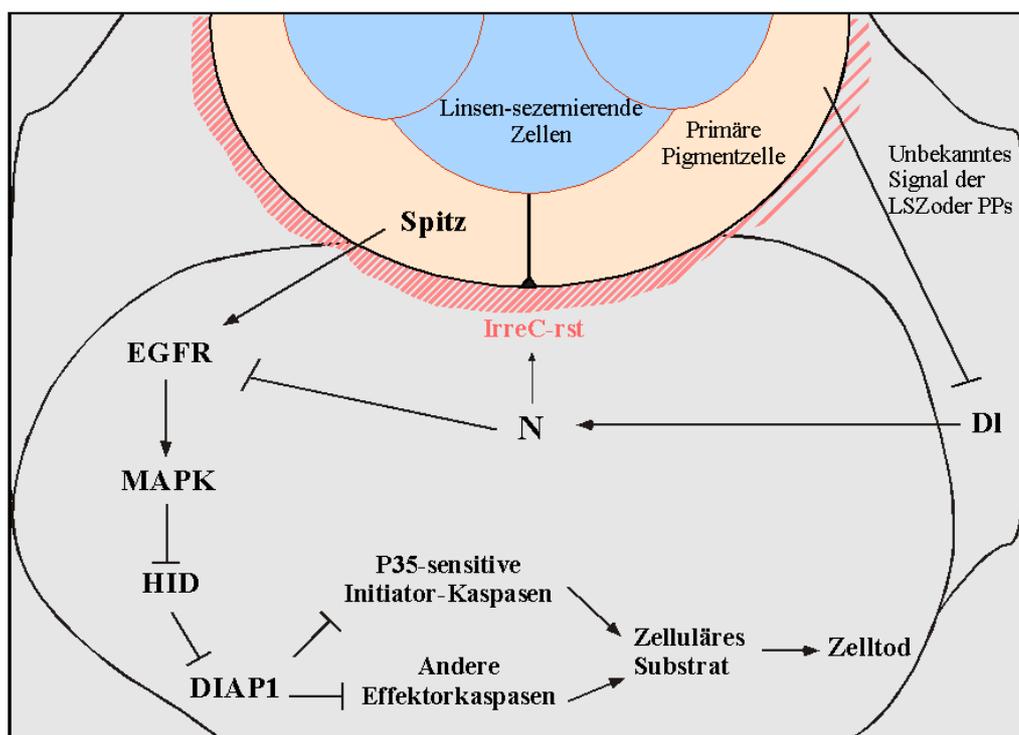


Abb. 5.2: Induktion von Zelltod in Interommatidialen Zellen.

(Modell nach Yu et al., 2002, modifiziert mit Daten aus Reiter et al., 1996 und Gorski et al., 2000)

Unterbleibt das Signal an Notch, so würde die Zelle überleben. Fehler während der Zellsortierung durch Verlust von Notch oder IrreC-rst würden das entsprechende Signal ebenfalls unterbinden oder abschwächen, und überzählige interommatidialen Zellen würden überleben.

Unterdrückung des pupalen Zelltods durch Crumbs

In diesem pupalen Entwicklungsschritt, in den eine Überexpression von *crumbs* eingreift, gibt es aufgrund der verschiedenen Expressionsmuster von Gal4^{sev} und GMR-Gal4 zwei verschiedene mögliche Wirkungsweisen, wie Crumbs-Überexpression auf die Augenentwicklung bzw bei der Unterdrückung des pupalen Zelltods wirken kann.

In Kreuzungen, in welchen UAS-*crb* unter der Kontrolle von Gal4^{sev} exprimiert wird, ergibt sich das oben angesprochene Problem, dass die Linsen-sezernierenden Zellen, in welchen Crumbs überexprimiert wird, zum Zeitpunkt der Zellsortierung und des folgenden pupalen Zelltods keinen direkten Kontakt mehr zu den interommatidialen Vorläuferzellen haben. Trotzdem wird sowohl die Neuorganisation und Sortierung der interommatidialen Zellen als auch der Zelltod teilweise unterbunden.

Reiter et al. (1996) haben in ihren Analysen IrreC-rst unter der Kontrolle von Gal4^{sev} in den Linsen-sezernierenden Zellen überexprimiert und ein vergleichbares Ergebnis bzw Problem gefunden. Ihre daraufhin aufgestellte Hypothese sah vor, dass IrreC-rst durch Interaktion mit einem unbekanntem Liganden in den primären Pigmentzellen, an den Grenzen zwischen interommatidialen Zellen und primären Pigmentzellen lokalisiert wird. Durch eine ektopische Expression von IrreC-rst in den Linsen-sezernierenden Zellen würde der unbekanntem Ligand an die falsche Zellgrenze rekrutiert. Das in den interommatidialen Zellen vorhandene endogene IrreC-rst würde daraufhin nicht mehr korrekt lokalisiert und eine Zellsortierung mit anschließendem Zelltod würde unterbleiben oder abgeschwächt (Reiter et al., 1996). Für eine Funktionsweise ektopischer Expression von transgenen *crb*^{intra}-Konstrukten unter der Kontrolle von Gal4^{sev} müsste ein ähnliches Modell entworfen werden, das zudem den vorhandenen, aber gestörten Zelltod in den interommatidialen Zellen erklären kann. *Crb*^{intra} müsste, da es keine extrazelluläre Domäne besitzt, über die es direkt auf Komponenten in den Nachbarzelle wirken oder mit extrazellulären Molekülen interagieren kann, weitere Faktoren, möglicherweise erneut DE-Cadherin rekrutieren. Diese Faktoren könnten den unbekanntem Liganden von IrreC-rst in den primären Pigmentzellen rekrutieren, so dass als Folge IrreC-rst in den interommatidialen Zellen nicht mehr oder, in Abhängigkeit von der Stärke des UAS-*crb*-Transgens, nur noch teilweise korrekt lokalisiert würde.

Im Gegensatz dazu werden UAS-*crb*-Transgene unter der Kontrolle von GMR-Gal4 direkt in den interommatidialen Zellen exprimiert. Normalerweise erfolgt die Neuorganisation interommatidialer Zellen über Bildung neuer Zell-Zell-Kontakte, vermittelt durch die korrekte Lokalisation von IrreC-rst und Interaktion mit seinem Liganden in den primären Pigmentzellen (Reiter et al., 1996). Überexpression von Crumbs in den interommatidialen Zellen und Rekrutierung von DE-Cadherin könnte zur Bildung ektopischer Zell-Zell-Kontakte führen und somit dem IrreC-rst gesteuerten Sortierungsprozess entgegenwirken.

In beiden Arten von Kreuzungen, unter der Kontrolle von Gal4^{sev} oder GMR-Gal4, würde in Abhängigkeit von der Stärke des verwendeten UAS-*crb*-Transgens, die Lokalisation von IrreC-rst in den interommatidialen Zellen gestört oder der von IrreC-rst gesteuerten Neuorganisation der Zellen entgegengewirkt.

Bislang ebenfalls unbekannt ist, ob die Anwesenheit der zusätzlichen Linsen-sezernierenden Zellen oder primären Pigmentzellen ein Überleben interommatidialer Zellen zusätzlich fördern kann. Brachmann und Cagan (2003) stellen fest, dass viele Mutanten, welche zusätzliche interommatidiale Zellen aufweisen, in den Augen eine zusätzliche (mögliche) primäre Pigmentzelle besitzen.

Gleichzeitig argumentieren sie, dass bei der Entscheidung, welche Zellen überleben und in welchen Zelltod aktiviert wird, möglicherweise nicht nur direkte Signale durch regulatorische Moleküle eine Rolle spielen, sondern möglicherweise auch Zellkontakte, wie z.B. die Kontaktstelle, an der die beiden primären Pigmentzellen aufeinandertreffen.

Gleichzeitig postulieren Yu et al (2002, vgl. Abb. 5.2), dass es ein bislang nicht genauer bekanntes Signal der Linsen-sezernierenden Zellen oder primären Pigmentzellen geben muss, das eine Aktivität von Notch unterbindet und somit ein Überleben der interommatidialen Zellen gewährleistet.

Die Tatsache, dass eine Überexpression von Crumbs zu zusätzlichen Linsen-sezernierenden Zellen und primären Pigmentzellen führt und dadurch zusätzliche Zell-Kontaktstellen entstehen, welche möglicherweise eine Rolle bei einer Unterdrückung des Zelltods spielen können, lässt Raum für Spekulationen offen, dass die in der pupalen Scheibe beobachtete Unterdrückung des pupalen Zelltods möglicherweise nicht vollständig auf eine direkte Funktion von Crumbs zurückzuführen ist. Ebenso könnten die in früheren Entwicklungsstadien durch *crumbs*-Überexpression induzierten Defekte sich nun indirekt in der pupalen Imaginalscheibe auswirken und die direkte Wirkung der ektopischen *crumbs*-Expression verstärken.

5.2 Modifikatoren der Genwirkung von *crumbs*

Um die Mechanismen, die an der Etablierung epithelialer Polarität beteiligt sind, näher zu charakterisieren, wurde eine Suche nach Modifikatorgenen durchgeführt, deren Mutation die phänotypische Wirkung eines durch Überexpression des *crumbs*-Gens induzierten dominanten Augenphänotyps beeinflussen können. Hierbei wurden Stämme einer Defizienzenkollektion oder Mutationen von Genen selektiert, die sowohl den rauhen Augenphänotyp modifizieren konnten als auch in der Lage waren, den embryonalen mutanten *crumbs*-Phänotyp zu abschwächen. Ziel dieser Suche war die Identifikation von Genen, welche direkt oder indirekt mit *crumbs* interagieren.

crumbs-Mutationen ebenso wie Mutationen des direkten Interaktionspartners *stardust* agieren als schwache Suppressoren des rauhen Augenphänotyps. Mit Hilfe des Modifier-Screens wurden jedoch Enhancer des rauhen Augenphänotyps identifiziert, die zudem den mutanten Kutikulaphänotyp von *crumbs* in unterschiedlichem Maße abschwächen können. Bei den auf diese Weise ermittelten Komponenten handelt es sich also nicht um direkte Interaktionspartner von Crumbs, sondern um Faktoren, die indirekt und antagonistisch zu Crumbs und Stardust wirken.

Im Rahmen der beiden durchgeführten Versuchsreihen wurden mehrere Regionen bzw. Gene gefunden, welche die geforderten Kriterien (Modifikation und Abschwächung des *crumbs*-Phänotyps) erfüllen und somit als mögliche Interaktionspartner von *crumbs* in Frage kommen. Diese sollten weitere Erkenntnisse über die Rolle von Crumbs während der Etablierung und Aufrechterhaltung der epithelialen Zellpolarität liefern.

5.2.1 Die Kartierung von Region 07D1-6 läßt keinen eindeutigen Schluss auf ein einziges Kandidatengen zu

Für Region 07D ist es mir im Rahmen meiner Analysen nicht gelungen, der Modifikation des rauhen Augenphänotyps bzw. der partiellen Rettung des embryonalen Kutikulaphänotyps ein einzelnes Gen zuzuordnen. Aufgrund von Analysen der ursprünglich im Modifier-Screen gefundenen Defizienzen und weiterer in Region 07D1-6 lokalisierten P-Element-induzierten Mutationen konnten drei mögliche Kandidaten, *fs(1)h* (= *rancor*) (Digan et al., 1986; Haynes et al., 1989), *mysospheroid* (*mys*) (Wieschaus et al., 1984; MacKrell et al., 1988) und eine bislang nicht näher charakterisierte E3-Ubiquitin-Protein-Ligase (Bourbon et al., 2002) als mögliche Interaktionspartner ermittelt werden.

In zwei anschließenden Analysen wurde versucht, die beobachteten Effekte, Modifikation und Abschwächung des mutanten embryonalen Kutikulaphänotyps einem dieser drei Gene zuzuordnen. Diese Analysen bestanden zum einen aus Tests weiterer, zumeist EMS-induzierter Mutationen der Gene *fs(1)h* und *mys*, um festzustellen, ob sie die gleichen Effekte wie die P-Element-induzierten

Mutationen zeigen; zum anderen wurden die P-Elemente, die für die Mutationen der beiden Gene verantwortlich sind, mobilisiert, um herauszufinden, ob wirklich die P-Elemente für die beobachteten Effekte verantwortlich sind, oder eine mögliche weitere Mutation auf dem gleichen Chromosom.

Diese Analysen ergaben sowohl für *mys* als auch *fs(1)h*, dass EMS-induzierte Mutanten im Gegensatz zu den P-Element-induzierten nicht in der Lage waren, den rauhen Augenphänotyp zu modifizieren, und in nur geringem Maße den mutanten *crumbs*-Phänotyp von Allel *crb*^{8F105} abschwächen konnten.

Da die getesteten EMS-Allele, *fs*⁴ und *fs*¹⁸ zu den stärksten überhaupt zur Verfügung stehenden *fs(1)h*-Allelen zählen (Digan et al., 1986), hätte man, wenn *fs(1)h* wirklich für eine Modifikation verantwortlich wäre, eigentlich erwartet, dass die EMS-Allele ähnlich starke Effekte wie die getesteten P-Element-induzierten Allele aufweisen würden, wenn nicht sogar stärkere.

Für *mysospheroid* wurden im Vergleich zur zur P-Element-induzierten Mutation, in der das P-Element ins erste Intron von *mys* inseriert ist, ein amorphes Null-Allel sowie ein sehr schwaches, homozygot vitales Allel getestet. Auch in diesem Falle hätte man erwartet, dass zumindest das amorphe Null-Allel ähnlich starke Effekte wie das getestete P-Element aufweisen würde, was allerdings nicht der Fall war. Zusammengefasst bedeutet dies, dass die Tests mit unterschiedlich starken EMS-Allele der beiden Gene, *mys* und *fs(1)h*, gegen ihre Rolle als funktionelle Interaktionspartner von *crumbs* sprechen.

Ein uneinheitliches Ergebnis ergab sich auch für die getesteten Revertanten der mobilisierten Element-Insertionen. Obgleich in keiner der Testkreuzungen eine Modifikation des rauhen Augenphänotyps mehr erfolgte, und ebenfalls keine Abschwächung des mutanten Phänotyps von *crb*^{11A22} zu beobachten war, konnte die Abschwächung des mutanten Phänotyps von Allel *crb*^{8F105} nicht vollständig unterbunden werden. Dieser Befund spricht einerseits für eine Rolle der beiden Gene als funktionelle Interaktionspartner von Crumbs, zeigt aber auch, dass ein Teil der in den P-Element-Mutationen beobachteten Suppression von *crb*^{8F105} nicht auf die Insertion der P-Elemente zurückzuführen ist, sondern vermutlich in einer weiteren Mutation auf dem gleichen Chromosom begründet liegt. Alle drei getesteten P-Element-Insertionen stammen laut Angaben der Flybase-Datenbank aus dem gleichen Ursprungslabor, so dass ihnen möglicherweise der gleiche Ursprungstamm mit zusätzlicher Mutation zugrunde liegt.

Eine vergleichbare Analyse der drei P-Element-induzierten Mutanten in 07D1, die möglicherweise die unbekannte Ubiquitin-(E3)-Ligase betreffen, ist bislang nicht gelungen. Obgleich keine dieser Mutationen in der Lage ist, den rauhen Augenphänotyp zu modifizieren, können alle den mutanten *crumbs*-Phänotyp in vergleichbarem Maße abschwächen. Ein Versuch, die P-Elemente zu mobilisieren scheiterte aus bislang unbekanntem Gründen. Die in der ursprünglichen Arbeit (Bourbon et al., 2000) publizierten Angaben weisen die inserierten P-Elemente als „P-lacW“ aus, d.h. zur gleichen Klasse gehörig wie auch die anderen getesteten und mobilisierten P-Elemente in *fs(1)h* und *mysospheroid*. Sie sollten daher normalerweise mobilisierbar sein. Da also die Ergebnisse dieser P-Element-Mobilisierung für die in 07D1 gelegenen P-Element-Insertionen fehlen, ist es in diesem Falle nicht

möglich, die Modifikation bzw. Rettung eindeutig den P-Element-induzierten Mutationen zuzuschreiben. Möglicherweise befindet sich auf dem 1. Chromosom dieser Linien noch eine weitere Letalmutation, was dazu führt, dass die Revertanten trotz Mobilisierung des letalen P-Elementes nicht überleben. Bislang wurde dies jedoch noch nicht getestet. Die Frage, ob durch Exzision der letalen P-Elemente das ursprüngliche Gen wiederhergestellt werden und dadurch die Abschwächung des Phänotyps der beiden *crumbs*-Allele unterbunden werden kann, ist somit nicht zu beantworten.

Eine weitere Möglichkeit eine nähere Auswahl zu treffen, erhält man durch Betrachten der (möglichen) Genfunktion bzw. des Expressionsmusters der drei Kandidaten.

Das Gen *fs(1)h* (*female sterile (1) homeotic*) (Digan et al., 1986; Haynes et al., 1989) kodiert für eine mögliche Proteinkinase (Manning, 2002), die sich durch eine Bromodomäne auszeichnet (Haynes et al., 1992) und möglicherweise an der Regulation der Transkription des Pol II Promotors beteiligt ist (SwissProt Project Members, 1990). Eine frühere Charakterisierung des Genprodukts weist zudem auf das mögliche Vorhandensein von Transmembrandomänen hin, d.h. eine mögliche Funktion des Genproduktes als Transmembranprotein (Haynes et al., 1989). Da die identifizierten Domänen jedoch von ihrer Aminosäure-Zusammensetzung her stark von „typischen“ Transmembrandomänen abweichen (Haynes et al., 1989; Eisenberg et al., 1984; von Heijne, 1986) und sie in späteren Publikationen nicht erwähnt werden, kann eine Rolle von *fs(1)h* als Transmembranprotein bezweifelt werden. *fs(1)h* ist während der späten Embryogenese an der Festlegung von Segmentidentitäten sowie der Etablierung eines korrekten Expressionsmusters von *Kr*, *eve*, *en* und *Ubx* beteiligt (Huang and Dawid, 1989). Das Genprodukt selbst interagiert mit den Proteinen der Tritohorax-Gruppe, *ash1* und *ash2* sowie dem Homeoboxprotein *Deformed (Dfd)* (Shearn, 1989). Bislang konnten zwei Transkripte unterschiedlicher Größe nachgewiesen werden, die vor allem in Ovarien und der Oozyte gefunden werden, nicht aber in den Follikelzellen. Im frühen Embryo (spätes syncytiales Blastoderm bis zur Ausstreckung des Keimstreifs) findet man ein Hybridisierungssignal uniform im corticalen Zytoplasma (Haynes et al., 1989).

Insgesamt betrachtet ist dieses Genprodukt als möglicher Interaktionspartner von Crumbs eher unwahrscheinlich.

Das Gen *mysospheroid (mys)* kodiert für die PS β -Untereinheit des Integrins, die einen Teil des Integrin-Komplexes darstellt (MacKrell et al., 1988; Noselli und Agnes, 1999; Hynes und Zhao, 2000). Dieser Komplex ist an der Bildung der Hemidesmosomen („focal adhesions“) beteiligt, die die basale Membran einer Zelle mit der extrazellulären Matrix verbinden und die Endpunkte von Aktinfilamenten darstellen (Hynes and Zhao, 2000). Als calcium-abhängiger Zelladhäsionsrezeptor mit einer Integrin- β -Kette und einer PSI-Domäne und ist das Gen maßgeblich an der Muskelentwicklung beteiligt. Zudem spielt es eine Rolle bei der Entwicklung des

Zentralnervensystems. Während der Augenentwicklung ist *mys* nur im Verlaufe der späten Pupalentwicklung aktiv, wo es eine Rolle in der Organisation ommatidialer Zellen, nicht aber ihrer Differenzierung spielt. Die hier gefundenen Defekte werden vor allem strukturellen Veränderungen der Linsen-sezernierenden Zellen zugeschrieben sowie einem Verlust der Hemidesmosomen der Pigmentzellen, durch welche diese den Kontakt zur Lamina verlieren (Longley and Ready, 1995).

Das Gen ist im Embryo im embryonalen und larvalen Mittel- und Hinterdarm sowie im Pharynx und an den sogenannten Apodemen exprimiert, der Verbindungsstelle zwischen der larvalen Muskulatur und der Epidermis. *Mys*-Mutationen weisen Defekte des dorsalen Schlusses auf (Wieschaus et al., 1984; Zusman et al., 1993) sowie Defekte des Hirns, des Mitteldarms und eine abnormale somatische, viscerele und pharyngeale Muskulatur (Roote und Zusman, 1995) Cytologisch wurde es nach 7D3-5 kartiert und interagiert mit *blistered (bs)*, *rhomboid (rho)*, *canoe (cno)* und etwa 20 weiteren Genen.

Die Rolle von Myospheroid in der Muskelentwicklung und Entwicklung des zentralen Nervensystems machen *mys* zu einem nicht sehr wahrscheinlichen Interaktionspartner von *Crumbs*, obgleich es wegen seiner Funktion als membrangebundener, calciumabhängiger Rezeptor, der an Adhäsionsvorgängen beteiligt ist, nicht vollkommen ausgeschlossen werden sollte. Im Gegensatz zu *Crumbs* findet sich das Genprodukt nicht in allen Geweben ektodermaler Herkunft. Ein überlappendes Expressionmuster von *crumbs* und *mys* findet man nur in bestimmten Geweben, wie z.B. Auge oder Hinterdarm. Sollte also eine funktionelle Interaktion mit *Crumbs* erfolgen, so ist anzunehmen, dass diese auf bestimmte Gewebe (Hinterdarm oder Auge) oder morphologische Prozesse (dorsaler Schluss) begrenzt ist.

Von zusätzlichlichem Interesse könnte *mys* durch seine Interaktion mit *Rhomboid* und *Cno* sein. *Rhomboid* ist ein Aktivator von *Spitz*, dem Liganden von EGFR (DER), und somit Aktivator der folgenden Ras-Interaktionkaskade (vgl. Diskussion 5.1). Wie bereits beschrieben, führt die Aktivierung dieser Genkaskade u.a. zur Unterdrückung des Zelltods und wirkt somit als Überlebenssignal.

Cno hingegen ist eine Komponente der *adherens junctions* (Matsuo et al., 1999; Noselli und Agnes, 1999) und ist in der Lage, Aktin zu binden (FlyBase, 1992). Es ist an verschiedenen biologischen Prozessen wie z.B. der Notch-Signaltransduktionskaskade, der Ras-Signaltransduktionskaskade (vgl. Diskussion 5.1 – Bildung Linsen-sezernierender Zellen) und dem Prozess des dorsalen Schlusses beteiligt (Noselli und Agnes, 1999). *cno*-Mutanten wurden im Modifier-Screen getestet und hier interessanterweise als schwacher Suppressor des rauhen Augenphänotyps identifiziert und nicht als Enhancer wie ein Teil der mutanten Allele von *mys*.

Aufgrund dieser Daten kommt *mys* als möglicher, wenngleich vermutlich auf bestimmte Regionen des Embryos beschränkter funktioneller Interaktionspartner von *crumbs* in Frage.

Über die in 07D1 lokalisierte E3-Ubiquitin-Protein-Ligase liegen bislang keine spezifischen Informationen vor. Im Rahmen von von H-M. Bourbon (Bourbon et al., 2002) durchgeführten

Analysen von P-Element-induzierten Mutationen, wurden die von mir getesteten P-Elemente kartiert und als betroffenes Gen bzw. seine Funktion eine E3-Ubiquitin-Protein-Ligase vorhergesagt. Homozygot mutante Embryonen weisen meist einen wildtypischen Phänotyp auf, selten findet man jedoch Embryonen mit Kopfddefekten und leichten Defekten des dorsalen Schlusses.

E3-Ubiquitin-Protein-Ligasen, auch als „N-Recogin“ bezeichnet, sind als Teil einer proteolytischen Proteininteraktionskaskade am sogenannten Ubiquitin-System beteiligt. Für die in 07D1 lokalisierte unbekannte E3-Ubiquitin-Ligase wird ein putatives Zink-Finger-Motiv vorhergesagt. Nähere Informationen, wie z.B. mögliche Interaktionspartner oder ein mögliches Substrat sind jedoch nicht bekannt. Daher kann die E3-Ubiquitin-Ligase als Interaktionspartner von *crumbs* weder ausgeschlossen noch bestätigt werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass aufgrund der erhobenen Befunde keines der drei Gene favorisiert oder ausgeschlossen werden kann. Da die ursprüngliche, im Modifier-Screen gefundene Defizienz Df(1)C128 (#949) mehr als nur ein Gen deletiert, muß in Betracht gezogen werden, dass nicht einer der drei Kandidaten allein für die beobachteten Effekte verantwortlich sein könnte, sondern dass zwei oder alle drei zusammenwirken. So könnte z.B. eine Mutation von *mysospheroid* für die Modifikation des Augenphänotyps sowie den mutanten Kutikulaphänotyp mit dorsalen Schlussdefekten verantwortlich sein, während die unbekannte Ubiquitin-E3-Protein-Ligase für die Suppression des mutanten *crumbs*-Phänotyps verantwortlich sein könnte.

Weitere Analysen sind notwendig, um die mögliche Interaktion der drei potentiellen Kandidaten mit *crumbs* aufzuklären.

5.2.2 In Region 29C-30C kann *raw* ein möglicher Interaktionspartner von *Crumbs* sein

Im Rahmen des Modifier-Screens konnte Defizienz Df(2L)N22-14 (#2892) als Enhancer des rauhen Augenphänotyps identifiziert werden. Ebenso ist die Defizienz in der Lage, die Phänotypen aller gesteten mutanten *crumbs*- und *stardust*-Allele abzuschwächen, dies sogar teilweise in dem Maße, wie es die ektopische Expression der zytoplasmatischen Domäne von *crumbs* selbst vermag. Homozygot mutante Embryonen der Defizienz Df(2L)N22-14 zeichnen sich durch einen Kutikulaphänotyp aus, bei dem bislang nicht ganz klar ist, ob überhaupt Kutikula sezerniert wird, oder diese nur sehr stark undifferenziert und zusätzlich fragmentiert ist.

In weiteren Kartierungen konnte zum einen das Gen *raw* als potentieller funktioneller Interaktionspartner identifiziert werden. Zum anderen konnte der mutante Kutikulaphänotyp der Region 30A-C und vermutlich dem in dieser Region lokalisierten Gen *remnants* zugeordnet werden, das ebenfalls (teilweise) in der Lage ist, den mutanten *crumbs*-Phänotyp zu supprimieren.

Von den drei getesteten *raw*-Allelen ist nur das amorphe, EMS-induzierte Allel *raw*¹ in der Lage den Augenphänotyp stark zu modifizieren und es weist hierbei sogar eine stärkere Modifikation auf als Defizienz Df(2L)N22-14. Alle drei Allele sind jedoch in der Lage, den mutanten *crumbs*-Phänotyp der beiden getesteten Allele *crb*^{11a22} und *crb*^{8F105} abzuschwächen, wenngleich in erheblich schwächerem Maße als die ursprüngliche Defizienz. Den Phänotyp der beiden getesteten *stardust*-Allele kann jedoch keine der drei *raw*-Mutationen abschwächen. Homozygot mutante Embryonen von *raw*¹ weisen zudem Defekte des dorsalen Rückenschlusses auf.

Das *Drosophila melanogaster* Gen *raw* kodiert für ein neuartiges Protein, das zum einen an der Etablierung einer korrekten Morphologie bestimmter, röhrenförmig organisierter epithelialer Gewebe beteiligt ist. Hierzu zählen beispielsweise die Malpighischen Gefäße (Jack und Myette, 1997). Zum anderen ist *raw* als Teil des Prozesses des dorsalen Schlusses daran beteiligt, dass die JNK-Signalkaskade auf die erste Zellreihe (*leading edge cells*) der nach dorsal wandernden Epidermis beschränkt bleibt. Es ist ebenso verantwortlich für eine korrekte Entwicklung der Amnioserosa, wo es selbst exprimiert wird (Byars et al., 1999). Mutationen betreffen in der Regel die Malpighischen Gefäße, die Speicheldrüsen, die embryonale dorsale Epidermis, das ZNS und den embryonalen und larvalen Mittel- und Hinterdarm (Jack und Myette, 1997; Byars et al., 1999; Blake et al., 1998; Blake et al., 1999). Das Gen interagiert genetisch mit *zipper (zip)*, *Jun-related antigen (Jra)* und *anterior open (aop)* (Byars et al., 1999; Blake et al., 1999).

Die beobachtete Modifikation des rauhen Augenphänotyps, die Fähigkeit den mutanten *crumbs*-Phänotyp zumindest teilweise supprimieren zu können, sowie seine Lokalisation und Beteiligung an Prozessen, wie dem des dorsalen Schlusses, machen das Produkt von *raw* zu einem möglichen Kandidaten, der in der Lage ist, mit Crumbs zu interagieren.

Allerdings ist anzunehmen dass es sich auch hier (wie schon by *mys* beobachtet) durch die Expression von *raw* in der Amnioserosa, nicht aber in der Epidermis, um eine lokal begrenzte Interaktion zwischen Crumbs und *Raw* handelt. Die beobachtete Abschwächung des mutanten *crumbs*-Phänotyps durch *raw*-Allele fällt daher sehr viel schwächer aus als beispielsweise eine Abschwächung des mutanten *crumbs*-Phänotyps durch Allele von *lgl*, *dlg* oder *scribble* (Tanentzapf und Tepass, 2003).

Da im Bezug auf die Stärke der Modifikation des Augenphänotyps, der Abschwächung des mutanten *crumbs*-Phänotyps sowie im Bezug auf den Kutikulaphänotyp homozygot mutanter Embryonen erhebliche Unterschiede zwischen *raw* und Df(2L)N22-14 zu beobachten waren, wurde angenommen, dass möglicherweise ein weiteres Gen in Defizienz Df(2L)N22-14 für die beobachteten Unterschiede verantwortlich ist.

Bislang im Rahmen dieser Hypothese getestet wurden zwei EMS-induzierte Allele des Gens *remnants (rem)*, das bislang nur grob kartiert und Region 30A3-C5 zugeordnet wurde.

Beide Allele sind nicht in der Lage, den rauhen Augenphänotyp zu modifizieren, und zeigen auch keine Auswirkungen auf den mutanten Phänotyp von *crb*^{11A22}. Sie sind jedoch in der Lage, den mutanten Phänotyp von *crb*^{8F105} abzuschwächen. Testkreuzungen zeigten, dass *remnants* möglicherweise ebenfalls für den in Defizienz Df(2L)N22-14 beobachteten mutanten Kutikulaphänotyp verantwortlich ist. Hierbei stören offensichtlich sehr frühe Defekte Bildung und Differenzierung der Kutikula. In homozygoten Embryonen der Defizienz Df(2L)N22-14, die *raw* einschließt, „überdecken“ diese frühen Defekte den Phänotyp von *raw*, da der Embryo durch die frühen Defekte später nicht in der Lage ist, den Prozess des dorsalen Schlusses durchzuführen.

Beim bislang unpublizierten Gen *remnants* handelt es sich nach persönlichen Angaben von T. Schuppbach um ein Zellzyklus regulierendes Gen (*cks1*). Die RNA scheint sehr spezifisch nur in der Oogenese und im frühen Embryo vorhanden zu sein, und es wird angenommen, dass *remnants* eine spezifische Funktion in der Meiose, und Initiation des Zellzyklus im Embryo hat. Bereits beschriebene Mutationen betreffen, wie bereits erwähnt, die embryonale Kutikula, die kaum differenziert ist und teilweise eine stark fragmentierte Struktur aufweist.

Obleich *remnants* aufgrund seiner Funktion als Zellzyklusregulator als Interaktionspartner von *crumbs* eher unwahrscheinlich ist, sollte er wegen seines Kutikulaphänotyps und seiner Fähigkeit den mutanten *crumbs*-Phänotyp von Allel *crb*^{8F105} zu supprimieren, nicht von der Liste der möglichen Kandidaten gestrichen werden. Weitere Studien dieses Gens sind jedoch notwendig, um eine eindeutige Aussage treffen zu können.

5.2.3 *Rho1*, *faint sausage* und ein unbekanntes Gen in Region 08A-09A sind mögliche Interaktionspartner von *Crumbs*

Im Rahmen eines weiteren Screens, in dem Mutationen von Genen getestet wurden, die Defekte des dorsalen Schlusses aufweisen, konnten drei mögliche Interaktionspartner identifiziert werden.

faint sausage

Die EMS-induzierte Mutation des Gens *faint sausage*, *fas*¹, agiert als starker Enhancer des rauhen Augenphänotyps und kann in hohem Maße den mutanten *crumbs*-Phänotyp der beiden getesteten Allele abschwächen. Diese beobachtete Abschwächung (Suppressor Klasse S3 für sowohl *crb*^{11A22} als auch *crb*^{8F105}) ist erheblich stärker als die zuvor für einzelne Gene wie z.B. *raw* gefundene. Bislang wurde eine Abschwächung dieser Stärke nur bei grösseren Defizienzen beobachtet, die mehr als ein Gen vollständig deletieren.

Im Rahmen weiterer Untersuchungen wurde eine Kollektion verschiedener EMS- und P-Element-induzierter Linien aus dem Bereich des *fas*-Gens analysiert.

Generell bestätigten diese *fas*-Allele die bei *fas*¹ beobachteten Effekte, allerdings fiel die Abschwächung des mutanten *crumbs*-Phänotyps durch einige Allele, in Abhängigkeit von der Art und Stärke der induzierten Mutation, schwächer als die von *fas*¹ aus. Zudem wurden bislang nicht alle *fas*-Allele auf eine Modifikation des Augenphänotyps hin getestet, so dass auch hier nicht ausgeschlossen werden kann, dass schwächere Allele den Augenphänotyp nicht oder nur sehr schwach modifizieren.

faint sausage ist ein bislang wenig untersuchtes Gen, das für ein extrazelluläres Protein der Immunglobulin-Superfamilie kodiert. Bislang beschrieben wurde seine Funktion im Zusammenhang mit Zellmigration und Etablierung bestimmter axonaler Verbindungen im Nervensystem von *Drosophila* (Lekven et al., 1998). Ebenso ist es an der Morphogenese der Speicheldrüsen (Bradley et al., 2001) sowie bei der Aufrechterhaltung der Zellpolarität in embryonalen Epithelien beteiligt (Tepass et al., 2001). Homozygot mutante Embryonen lassen eine wenig entwickelte Kutikula erkennen, welche nekrotische Flecken, teilweise Defekte des dorsalen Schlusses sowie ein abnormales Kopfskelett aufweist. Die Mutation ist embryonal letal und tritt zum ersten Mal im Stadium der Keimbandausstreckung auf. Zudem zeigen Mutationen unter anderem verschiedene Arten neuronaler Defekte (Lekven et al., 1998) sowie Defekte der Malpighischen Gefäße und des embryonalen Hinterdarms (Jack and Myette, 1999).

Sowohl die Ergebnisse des Modifier-Screens als auch die bislang beschriebene Funktion und Lokalisation machen *fas* zu einem sehr wahrscheinlichen funktionellen Interaktionspartner von *Crumbs*.

Rho1 = RhoA

Ebenfalls im zweiten Screen gefunden wurde eine Mutation von *Rho1*, *Rho1*^{E3.10}. Diese letale Punktmutation agiert als verhältnismäßig schwacher Enhancer des rauhen Augenphänotyps (Klasse E1), ist aber, wie *fas*, in erhöhtem Maße in der Lage, den mutanten *crumbs*-Phänotyp der beiden getesteten Allele abzuschwächen.

Bislang konnte dieser Befund nicht durch weitere Mutanten bestätigt werden, da für *Rho1* keine weiteren Mutationen zur Verfügung standen. Das einzige zusätzliche P-Element-induzierte Allel, das über das Stock-Center in Bloomington zu bestellen ist, weist eine Reihe von Eigenheiten auf (Anwesenheit von möglicherweise mehr als einem P-Element, Anwesenheit einer weiteren Letalmutation oder einer zu Sterilität führenden Mutation, die unabhängig vom Insertionsort der P-Elemente ist), so dass sie im Rahmen dieser Versuche ungünstig erschien und nicht getestet wurde. Insofern steht ein abschließender Test, mit dessen Hilfe *Rho1* als Kandidat bestätigt werden könnte, noch aus.

Das Gen *Rho1*, auch bekannt als *RhoA* kodiert für eine kleine, monomere GTPase und gehört zur Superfamilie der kleinen Ras-GTPasen, Unterfamilie der Rho-GTPasen (Noselli und Agnes, 1999; Newsome et al., 2000).

Rho1 wird eine Rolle bei der Organisation des Aktinzytoskeletts zugeschrieben. Neuorganisation des Zytoskeletts ist eine der Grundvoraussetzung für Vorgänge, denen eine Formveränderung von Zellen zugrunde liegt, d.h. beispielsweise Bewegungsprozesse, in welchen Zellkontakte gelöst und Filopodien gebildet werden oder endozytotische Vorgänge, in welchen membrangebundene Komponenten internalisiert werden müssen. Das Protein ist zudem für die Neuroblastenproliferation verantwortlich, und die Kutikula homozygot mutanter Tiere zeichnet sich durch ein anterior-dorsales Loch aus, wovon auch teilweise das Kopfskelett mitbetroffen ist. Zudem zeigen diese Embryonen Defekte der posterioren Spirakel und Filzkörper (Halsell et al., 2000).

Das Gen interagiert genetisch mit *zipper (zip)*, *frizzled (fz)*, *dishevelled (dsh)*, RhoGEF2 und einer Reihe weiterer Gene (Halsell et al., 2000; Halsell and Kiehart, 1998; Strutt et al., 1997; Boutros et al., 1998). Desweiteren wurde Rho1 als Antagonist Moesin-abhängiger Prozesse beschrieben (Speck et al., 2002). Da Moesin wiederum direkt mit Crumbs interagiert (Medina et al., 2002b), ist *Rho1* ein sehr wahrscheinlicher funktioneller Interaktionspartner von Crumbs.

l(1)PB18

Bei *l(1)PB18* handelt es sich um eine Letalmutation eines Gens des ersten Chromosoms, das zwischen den Bruchpunkten 08A5 und 09A2 lokalisiert ist.

Die bislang einzige getestete Mutante dieses Gens agiert, wie die beiden anderen vorgestellten Kandidaten, als starker Enhancer des Augenphänotyps und kann den mutanten Kutikulaphänotyp beider mutanter *crumbs*-Allele abschwächen. Mutationen dieses Gens zeigen in Keimbahnklonen einen Defekt des dorsalen Schlusses. Das bislang unbekanntes und nicht genauer kartierte Gen wurde in einer Suche nach zygotischen Letalmutationen gefunden, die gleichzeitig spezifische maternale Phänotypen zeigen (Perrimon et al., 1989).

Da weder von der Flybase-Datenbank weitere Informationen für dieses Gen zur Verfügung gestellt werden noch andere Publikationen existieren, ist es in diesem Falle notwendig, die Mutation bzw. das betroffene Gen mit Hilfe von Komplementationstests genauer zu kartieren und so die Lokalisation des unbekanntes Gens genau zu ermitteln.

Unter anderem liegt *D-Moesin*, dessen Genprodukt direkt mit der zytoplasmatischen Domäne von Crumbs interagiert (Medina et al., 2002b), in der zu untersuchenden Region. Daher sollten weitere Komplementationstests sich zuerst hierauf konzentrieren. Im Zusammenhang mit *Moesin* muss jedoch bedacht werden, dass für dieses Gen bislang keine Defekte des dorsalen Schlusses beschrieben wurden. Desweiteren findet man mehrere weitere Gene in dieser Region, welche sowohl am Prozess des dorsalen Schlusses als auch an der Zelladhäsion beieiligt sind (z.B. *Dsor1 (Downstream of raf1)* und *amx (almondex)*). Ob *D-Moesin* oder eines dieser beiden Gene für die beobachtete Modifikation des Augenphänotyps bzw die Suppression des mutanten *crumbs*-Phänotyps verantwortlich ist, läßt sich nur durch Komplementationskreuzungen und weitere Analysen ermitteln.

5.2.4 Betrachtung der mit unterschiedlichen Strategien gefundenen Kandidaten für eine Interaktion mit Crumbs

Die zwei im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Modifier-Screens waren darauf ausgerichtet, direkte oder indirekte Interaktionspartner von Crumbs zu ermitteln. Mit den verwendeten Analysen konnten jedoch nur Faktoren identifiziert werden, die antagonistisch zu Crumbs und Stardust wirken. Die beiden Ansätze unterschieden sich im Vorgehen bei der Kandidatensuche. Im einen Fall wurden ausgewählte große Deletionen systematisch unter Verwendung kleinerer Defizienzen eingengt, bis nur noch Bereiche mit wenigen Genen übrigblieben, von denen aussichtsreiche Kandidaten durch Einkreuzung bekannter Mutanten im Einzelnen getestet wurden. Im zweiten Ansatz wurden direkt von ihrer Funktion her interessante Kandidaten ausgewählt und ihre Wirkung auf den dominanten, crumbs-induzierten Augenphänotyp und die Kutikula *crb*-mutanter Embryos getestet.

Bei beiden Screening-Ansätzen wurden Kandidatengene identifiziert, die als Modifikatoren von crumbs in Betracht kommen. Der direkte Kandidatengensatz lieferte dabei mit geringerem zeitlichen und materiellem Einsatz interessante Bewerber für eine Rolle als funktionelle Interaktionspartner von Crumbs, die sich nunmehr für weiterführende Untersuchungen anbieten. Die breite, systematische Suche nach Kandidaten hat das Interesse auf zahlreiche Regionen auf den untersuchten Chromosomen gelenkt, deren systematische Feinkartierung Bewerber liefern kann, die zunächst nicht mit hoher Priorität analysiert worden wären. Somit eignen sich beide Methoden für eine Identifizierung funktioneller Interaktionspartner von *crumbs*, selbst wenn die Identifikation der verantwortlichen Gene mit Hilfe der Defizienzenkollektion und späterer Kartierung die in 4.2.1.2. aufgeführten Fehlerquellen enthalten kann.

Das in Geweben ektodermaler Herkunft apikal lokalisierte Transmembranprotein Crumbs ist an der Etablierung und Aufrechterhaltung zellulärer Polarität und der Organisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt. Verlust von *crumbs* führt zum Verlust von Zell-Zell-Kontakten, die *crumbs*-mutanten Zellen runden sich daraufhin ab, und werden mittels Apoptose eliminiert (Grawe et al., 1996).

Daher würde man als mögliche funktionelle Interaktionspartner vor allem Gene erwarten, die eine vergleichbare Funktion, Expression im Embryo, Lokalisation des Genprodukts in epithelialen Zellen, oder Ähnlichkeiten des Kutikulaphänotyps aufweisen. Ebenso kommen möglicherweise Gene in Frage, die eine Rolle in apoptotischen Prozessen spielen und durch deren Verlust *crumbs*-mutante epidermale Zellen, die den Kontakt zu den anderen Zellen verloren haben, trotzdem erhalten bleiben. In diesem Zusammenhang wurde bereits gezeigt, dass H99, eine Defizienz, die die drei proapoptotischen Gene *hid*, *rpr* und *grim* deletiert, in geringem Maße in der Lage ist, den Phänotyp *crumbs*-mutanter Embryonen abzuschwächen (Klebes, 1999; Tanentzapf und Tepass, 2003).

Erwartungsgemäß kodieren die in beiden Ansätzen gefundenen Gene, *fs(1)h* und die bislang nicht näher charakterisierten Gene (die Ubiquitin-E3-Ligase und das unbestimmte Gen in der genomischen Region 08A-09A) ausgenommen, für Faktoren der Zelladhäsion, Faktoren, die an morphologischen Veränderungen beteiligt sind und mit dem Zytoskelett interagieren sowie Faktoren, welche an der Aufrechterhaltung der Zellpolarität beteiligt sind. Da diese Vorgänge alle im Rahmen des Prozesses des dorsalen Schlusses von Bedeutung sind, ist es nicht verwunderlich, dass fast ausschließlich Mutationen von Genen oder Deletionen gefunden wurden, welche Defekte des dorsalen Schlusses zeigen.

Auffällig ist, daß unter den beim flächendeckenden Screen mit Defizienzen keine Transkriptionsfaktoren waren, welche in die engere Wahl gekommen sind. Theoretisch sollten diese Faktoren in der Lage sein, die Transkription von Genen, welche an Zelladhäsion oder Veränderungen des Zytoskeletts beteiligt sind, zu regulieren und hätten daher im Modifier-Screen ebenfalls gefunden werden können. Der Grund könnte darin liegen, dass insbesondere der Phänotyp des „rauen Auges“ aufgrund der Überexpression von Crumbs“ auf einem unphysiologischen Expressionsmuster beruht und sich aus einer Anzahl einzelner Störungen der Augenentwicklung zusammensetzt, die möglicherweise getrennter Regulation unterliegen. Dass sich hinter den bislang nicht getesteten schwachen Enhancern oder Suppressoren noch Gene von Transkriptionsfaktoren verbergen kann allerdings nicht vollständig ausgeschlossen werden.

In einem umfangreichen Modifier-Screen mit zufällig über das Genom hin verteilten P-Element Insertionsmutanten konnten kürzlich Tanentzapf und Tepass (2003) das Gen *lethal(2)giant larvae* (*lgl*) sowie durch direkte Tests von von Mutanten bekannter Gene die Gene *discs large* (*dlg*) und *scribbled* (*scrib*) als mögliche Interaktionspartner von Crumbs identifizieren. Die drei Gene bzw. ihre Genprodukte wirken aber ebenfalls nicht als direkte Interaktionspartner von *crumbs*, sondern wie die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Kandidatengene antagonistisch zu den von Crumbs gesteuerten Prozessen. Die Regionen, in denen diese Gene liegen, waren auch in unserem Ansatz als interessante Kandidaten identifiziert worden.

Um den Einsatz allerdings nicht auf dieselben Ziele zu fokussieren, waren die von dieser Gruppe bearbeiteten Gene dann von uns nicht detailliert betrachtet worden. Grundsätzlich kann man das von diesen Autoren verwendete Verfahren des systematischen Testens einer großen Anzahl zufällig ausgewählter mutierter Gene mit unserem Verfahren des flächendeckenden Screens mit Defizienzen vergleichen. Es hat den Vorteil, ohne längere Kartierungsversuche direkt zum Kandidatengen zu führen, wenn dieses in der verwendeten Kollektion enthalten ist, wird aber alle Gene übersehen, die nicht in der Kollektion der P-Element-Mutanten sind.

Die von Tanentzapf und Tepass (2003) als Kandidaten für eine Interaktion mit Crumbs beschriebenen Gene *dlg* und *scrib*, kodieren für PDZ-Proteine, die zusammen mit *lgl* an der Regulation apikaobasaler Polarität von Epithelzellen beteiligt sind (Bilder et al., 2000a/b; Woods et al., 1991).

Hierbei werden alle drei, in Abhängigkeit voneinander, im Bereich der lateralen Plasmamembran epithelialer Zellen lokalisiert. Es wird angenommen, dass sie hier möglicherweise einen Proteinkomplex formen („Lgl-Komplex“), obwohl für dessen Existenz biochemische Beweise noch ausstehen. Tanentzapf und Tepass (2003) haben auf dieser Basis ein Modell für die Interaktion dieser Proteine mit Crumbs entwickelt:

Demnach soll die Polarität der Epithelzellen sowie ihre Adhäsion untereinander von der korrekten Lokalisation der *zonula adherens* abhängig sein. Die ZA wird hierbei durch einen molekularen Sortierungsprozess etabliert, in welchem apikale und laterale Marker voneinander getrennt und drei Membrandomänen zugeordnet werden. Der Crumbs-Komplex wird in einer apikalen Randzone lokalisiert, den Lgl-Komplex findet man in einer lateralen Region und zwischen diesen beiden liegt die ZA etabliert. Für die korrekte Etablierung und Lokalisation der ZA wäre demnach ein Zusammenwirken der beiden antagonistisch wirkenden Komplexe verantwortlich.

In welcher Weise die von mir identifizierten potentiellen Interaktionspartner, die ebenfalls antagonistisch zu Crumbs wirken, möglicherweise mit dem Lgl-Komplex direkt interagieren könnten, ist aufgrund der bisher bekannten Eigenschaften dieser Faktoren nicht evident.

Dagegen zeichnet sich ein weiterer Interaktionsmechanismus ab, der insbesondere Rho1 als möglichen indirekten, zur Funktion von Crumbs und Stardust antagonistisch wirkenden Partner betrifft:

An einer Etablierung und Aufrechterhaltung epithelialer Zellverbände beteiligt sind zwei Prozesse, die Organisation/Regulation des Zytoskeletts sowie die Adhäsion der Zellen untereinander. Hierbei ist die Zelladhäsion von einer gerichteten Organisation des Zytoskeletts abhängig, d.h. durch Organisation des Zytoskeletts und folgenden Zellformveränderungen kommt es z.B. zur Ausbildung von Microvilli, welche den Kontakt epithelialer Zellen zueinander begünstigen (Speck et al., 2003) und Faktoren der Zelladhäsion wie DE-Cadherin den adhäsiven Kontakt zwischen den Zellen herstellen. Um diese Zelladhäsion zu gewährleisten ist somit eine Regulation bzw. Modulation des Zytoskeletts zwingend erforderlich. Eine solche Regulation erfolgt über die Familie der GTPasen der Rho-Familie. Rho1, welches im Modifier-Screen gefunden wurde, kann durch Cadherin reguliert (inaktiviert) werden.

Es wirkt an der Bildung adhäsiver Zellkontakte mit (Yap et al., 2003) und muss, um Organisation des Zytoskeletts und Zellformveränderungen zuzulassen, inaktiviert werden (Noren et al., 2003). Eine erhöhte Rho1-Aktivität kann dazu führen, dass F-Aktin fehllokalisiert wird und die Zellen den Kontakt zueinander verlieren (Noren et al., 2003; Speck et al., 2003).

Crumbs-Mutanten zeichnen sich durch den Verlust adhäsiver Zell-Zell-Kontakte aus was zu einem Verlust der polaren Organisation epithelialer Zellen führt (Grawe et al., 1996). Möglicherweise durch Verlust oder Fehllokalisation von DE-Cadherin und Komponenten der ZA begünstigt, würde Rho1 nicht mehr ausreichend inhibiert. Als Folge erhöhter Rho1-Aktivität würde das Zytoskelett reorganisiert und kontrahiert, die Zellen würden den Kontakt zueinander verlieren und sterben, so dass als Konsequenz keine Kutikula mehr sezerniert werden kann.

Ein Verlust von *Rho1* infolge einer Deletion könnte diese *crumbs*-induzierten Effekte möglicherweise zum Teil kompensieren. Trotz eines Verlustes der adhäsiven Kontaktstrukturen würden sich die Zellen wegen der verminderten Kontraktilität ihres Zytoskeletts nicht abrunden, und ein zusammenhängender Gewebeverband bliebe bestehen. Da der Aspekt der zellulären Polarität, d.h. ein Vorhandensein von distinkten apikalen und basolateralen Domänen der Plasmamembran in *crumbs*-mutanten Embryonen erhalten bleibt (Klebes, 1999), könnte möglicherweise ein Teil der so „geretteten“ Zellen noch Kutikula sezernieren.

In ähnlicher Weise könnte *Rho1* in die Augenentwicklung eingreifen. Hier ist, um in der pupalen Imaginalscheibe Zelltod zu gewährleisten, eine Reorganisation von Zell-Zell-Kontakten sowie der Zellen selbst notwendig, d.h. auch hier findet eine Bildung adhäsiver Kontakte in Abhängigkeit von Zellformveränderungen und vermutlich der Organisation des Zytoskeletts statt. Inaktivierung eines Faktors wie *Rho1*, welcher an diesen Prozessen beteiligt ist, sollte eine Reorganisation von Zellen unterbinden und möglicherweise die Bildung ektopischer Kontakte fördern, was den durch *crumbs*-Überexpression induzierten rauhen Augenphänotyp noch verstärken würde.

Ob die anderen identifizierten Faktoren eine ähnliche Rolle spielen können ist bislang nicht zu beurteilen, da viele von ihnen bislang nicht in ausreichendem Maße untersucht wurden. Aufgrund ihrer bislang beschriebenen Phänotypen und Funktion könnte jedoch postuliert werden, die von mir identifizierten Komponenten an der Organisation des Zytoskeletts, Zellformveränderungen und hierdurch an der Etablierung von Zell-Zell-Kontakten beteiligt sind, was den embryonalen mutanten *crumbs*-Phänotyp abschwächen kann. Ebenso ist in diesen Prozessen, ähnlich wie bei *Rho1*, der Grund zu suchen, wie und weshalb die jeweiligen Faktoren verstärkend auf den *crumbs*-induzierten rauhen Augenphänotyp einwirken.

Grundsätzlich liefern die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse mannigfaltige Ansätze zur weiteren Analyse der Funktion von *Crumbs*. Sie etablieren grundlegende Vorstellungen über die Rolle von *Crumbs* bei der Entwicklung des Facettenauges von *Drosophila melanogaster*, fokussieren die Suche nach funktionellen Interaktionspartnern von *Crumbs* auf definierte Regionen des Fliegen-genoms und identifizieren konkret Kandidatengene, deren Beteiligung nunmehr durch weitere Experimente überprüft werden kann.

Zusammenfassung

Das Protein Crumbs ist ein Transmembranprotein, das in *Drosophila melanogaster* in epithelialen Zellen als apikale Determinante agiert und an der Bildung und Aufrechterhaltung der *zonula adherens* (ZA) beteiligt ist, einer Zell-Zell-Kontaktstruktur, die u.a. essentiell für die Aufrechterhaltung einer apikobasalen Polarität in Epithelzellen ist. Maßgeblich verantwortlich für die Funktion des Crumbs-Proteins ist seine N-terminal gelegene, 37 AS lange zytoplasmatische Domäne. Überexpression dieser zytoplasmatischen Domäne mit Hilfe des UAS/Gal4-Systems im Auge von *Drosophila* führt zu einem dominanten rauhen Augenphänotyp.

Zur Verwendung von Tieren mit diesem Phänotyp als Modell für die Analyse der Funktion von Crumbs wurde der *crumbs*-induzierte rauhe Augenphänotyp morphologisch und funktionell charakterisiert. Zugleich wurde geprüft, ob die Ausprägung bestimmter Merkmale bei der Entwicklung des Auges von bestimmten Subdomänen des Crumbs-Proteins beeinflusst wird. Es wurde gezeigt, dass Überexpression von Crumbs vor allem den larvalen und pupalen Zelltod unterdrückt bzw. stört. Dies resultiert im pupalen wie im adulten Auge in einer erhöhten Anzahl Linsen-sezernierenden Zellen, Pigmentzellen und Borsten. In Abhängigkeit von der verwendeten Treiberlinie können auch Defekte der Photorezeptorzellen beobachtet werden. Die identifizierten Veränderungen sind maßgeblich vom C-terminalen ERLI-Motiv der zytoplasmatischen Domäne abhängig. Dem N-terminalen FERM-Motiv dieser Domäne kommt eine schwache antiapoptotische Funktion zu. Die extrazelluläre Domäne von Crumbs wirkt bei Überexpression möglicherweise antinekrotisch.

Um die Mechanismen, die an der Etablierung epithelialer Polarität beteiligt sind, näher zu charakterisieren, wurde im zweiten Teil dieser Arbeit eine „Modifier-Screen“, d.h. eine Suche nach Modifikatoren eines *crumbs*-induzierten rauhen Augenphänotyps durchgeführt. Gesucht wurden Gene, deren Produkte funktionell mit Crumbs interagieren. Dieser Methode liegt das Prinzip zugrunde, dass ein durch Überexpression von *crumbs* im Auge von *Drosophila* erzeugter rauher Augenphänotyp durch Einkreuzung mutierter Gene, die direkt oder indirekt mit *crumbs* interagieren, modifiziert werden kann. Diese Mutanten agieren, je nach Interaktion ihres Produkts mit Crumbs, als Enhancer oder Suppressoren des rauhen Augenphänotyps. Als Faktoren, die nicht nur im Auge sondern auch im embryonalen Epithel mit Crumbs funktionell interagieren, wurden Enhancer identifiziert, deren Verlust Kutikuladefekte *crumbs*-mutanter Embryonen abschwächt. Mit diesem Ansatz wurden sowohl eine Kollektion von Defizienzen als auch Mutanten bereits bekannter Gene getestet. Für drei der gefundenen Kandidatengene kann aufgrund der beschriebenen Eigenschaften eine Interaktion mit Crumbs als sehr wahrscheinlich angesehen werden: *Rho1*, *faint sausage* und *raw*. Es handelt sich um Gene, deren Produkte an der Organisation des Zytoskeletts, an Migrationsprozessen von Zellen, oder an der Etablierung zellulärer Polarität beteiligt sind. Zusätzlich wurden vier weitere Kandidaten ermittelt, *mys*, *remnants*, *l(1)PB18* sowie eine Ubiquitin-Protein-Ligase, deren funktionelle Interaktion mit *crumbs* noch gesichert werden muß. Die Befunde unterstützen das Modell einer Rolle von Crumbs beim Aufrechterhalten adhäsiver Zell-Zell-Kontakte und der Organisation des Zytoskeletts.

7. Literatur

Abbott, L.A. und Sprey, T.E. (1990).

Components of positional information in the developing wing margin of the *Lyra* mutant of *Drosophila*. *Roux Arch. dev. Biol.* 198, 448-459.

Aparisi, M.L. und Najera, C. (1990).

Genetic location and biochemical characterization of eye-colour mutants from natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genome*. 33, 203-208.

Ashburner, M. (1989).

Drosophila, A laboratory handbook. Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York.

Bachmann, A., Schneider, M., Theilenberg, E., Grawe, F. und Knust, E. (2001).

Drosophila Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity. *Nature*. 414, 638-643.

Baker, N.E. und Yu, S.Y. (2001).

The EGF receptor defines domains of cell cycle progression and survival to regulate cell number in the developing *Drosophila* eye. *Cell*. 104, 699-708.

Bennett, V. und Baines, A.J. (2001).

Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev.* 81, 1353-1392.

Bergmann, A., Agapite, J., McCall, K. und Steller, H. (1998).

The *Drosophila* gene *hid* is a direct molecular target of Ras-dependent survival signaling. *Cell*. 95, 331-341.

Bhat, M. A., Izaddoost, S., Lu, Y., Cho, K. O., Choi, K. W. und Bellen, H. J. (1999).

Discs Lost, a novel multi-PDZ domain protein, establishes and maintains epithelial polarity. *Cell*. 96, 833-845.

Bier, E., Vässin, H., Shepherd, S., Lee, K., McCall, K., Barbel, S., Ackerman, L., Carretto, R., Uemura, T., Grell, E., Jan, L.Y. und Jan, Y.N. (1989).

Searching for pattern and mutation in the *Drosophila* genome with a P-*lacZ* vector. *Genes Dev.* 3, 1273-1287.

Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979).

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.

Bilder, D. und Perrimon, N. (2000).

Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature*. 403, 676-680.

Bilder, D., Li, M. und Perrimon, N. (2000).

Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science*. 289, 113-116.

Bilder, D., Schober, M. und Perrimon, N. (2003).

Integrated activity of PDZ protein complexes regulates epithelial polarity. *Nat Cell Biol.* 5, 53-58.

Blake, K. J., Myette, G. und Jack, J. (1998).

The products of *ribbon* and *raw* are necessary for proper cell shape and cellular localization of nonmuscle myosin in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 203, 177-188.

Blake, K.J., Myette, G. und Jack, J. (1999).

ribbon, *raw*, and *zipper* have distinct functions in reshaping the *Drosophila* cytoskeleton. *Dev. Genes Evol.* 209, 555-559.

Bonini, N.M., Leier, W.M. und Benzer, S. (1993).

The *eyes absent* gene: genetic control of cell survival and differentiation in the developing *Drosophila* eye. *Cell.* 72, 379-395.

Bossinger, O., Klebes, A., Segbert, C., Theres, C. und Knust, E. (2001).

Zonula adherens formation in *Caenorhabditis elegans* requires *dlg-1*, the homologue of the *Drosophila* gene *discs large*. *Dev Biol.* 230, 29-42.

Bourbon, H.M., Gonzy-Treboul, G., Peronnet, F., Alin, M.F., Ardourel, C., Benassayag, C., Cribbs, D., Deutsch, J., Ferrer, P., Haenlin, M., Lepesant, J.A., Noselli, S. und Vincent, A. (2002).

A P-insertion screen identifying novel X-linked essential genes in *Drosophila*. *Mech Dev.* 110, 71-83.

Boutros, M., Paricio, N., Strutt, D.I. und Mlodzik, M. (1998).

Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and *wingless* signaling. *Cell.* 94, 109-118.

Brachmann, C.B. und Cagan, R.L. (2003).

Patterning the fly eye: the role of apoptosis. *Trends Genet.* 19, 91-96.

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.

Bridges, C.B. (1937).

Drosophila melanogaster. Symbols, characteristics of mutants, valuations. Corrections and supplement to lists in D. I. S. 4, 1-13.

Bryant, P.J. (1997).

Junction genetics. *Dev. Genet.* 20, 75-90.

Byars, C.L., Bates, K.L. und Letsou, A. (1999).

The dorsal-open group gene *raw* is required for restricted DJNK signaling during closure. *Development.* 126, 4913-4923.

Cagan, R.L. und Ready D.F. (1989a).

The emergence of order in the *Drosophila* pupal retina. *Dev Biol.* 136, 346-362.

Cagan, R.L. und Ready D.F. (1989b).

Notch is required for successive cell decisions in the developing *Drosophila* retina. *Genes Dev.* 3, 1099-1112.

Campos-Ortega, J.A. und Hartenstein, V. (1997).

The Embryonic Development of *Drosophila melanogaster*. Second Edition. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg.

Chishti, A.H., Kim, A.C., Marfatia, S.M., Lutchman, M., Hanspal, M., Jindal, H., Liu, S.C., Low, P.S., Rouleau, G.A., Mohandas, N., Chasis, J.A., Conboy, J.G., Gascard, P., Takakuwa, Y., Huang, S.C., Benz, E.J.Jr., Bretscher, A., Fehon, R.G., Gusella, J.F., Ramesh, V., Solomon, F., Marchesi, V.T., Tsukita, S., Tsukita, S., Hoover, K.B., et al. (1998).

The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. Trends Biochem Sci. 23, 281-2.

Craymer, L. und Roy, E. (1980).

New mutants. Dros. Inf. Serv. 55, 200-204.

De Matteis, M.A. und Morrow, J.S. (2000).

Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway. J Cell Sci. 113, 2331-2343.

den Hollander, A. I., ten Brink, J. B., de Kok, Y. J., van Soest, S., van Den Born, L. I., van Driel, M. A., van De Pol, D. J., Payne, A. M., Bhattacharya, S. S., Kellner, U., Hoyng, C. B., Westerveld, A., Brunner, H. G., Bleeker-Wagemakers, E. M., Deutman, A. F., Heckenlively, J. R., Cremers, F. P. und Bergen, A. A. (1999).

Mutations in a human homologue of *Drosophila* crumbs cause retinitis pigmentosa (RP12) [In Process Citation]. Nat Genet. 23, 217-221.

den Hollander, A.I., Johnson, K., de Kok. Y.J., Klebes, A., Brunner, H.G., Knust, E. und Cremers, F.P. (2001).

CRB1 has a cytoplasmic domain that is functionally conserved between human and *Drosophila*. Hum Mol Genet. 10, 2767-2773.

Dickson, B. und Hafen, E. (1993).

The Development of *Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1327-1360.

Digan, M.E., Haynes, S.R., Mozer, B.A., Dawid, I.B., Forquignon, F. und Gans M. (1986).

Genetic and molecular analysis of *fs(1)h*, a maternal effect homeotic gene in *Drosophila*. Dev Biol. 114, 161-169.

Drubin, D. G. und Nelson, W. J. (1996).

Origins of cell polarity. Cell. 84, 335-344.

Dumstrei, K., Wang, F., Shy, D., Tepass, U. und Hartenstein V. (2002).

Interaction between EGFR signaling and DE-cadherin during nervous system morphogenesis. Development. 129, 3983-3994.

Eaton, S. und Simons, K. (1995).

Apical, basal, and lateral cues for epithelial polarization. Cell. 82, 5-8.

Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M und Wall, R. (1984).

Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. J Mol. Biol. 179, 125-142.

Ellis, M.C., O'Neill, E.M. und Rubin, G.M. (1993).

Expression of *Drosophila* glass protein and evidence for negative regulation of its activity in non-neuronal cells by another DNA-binding protein. Development. 119, 855-865.

Engelbert, M. (1997).

Genetische Untersuchung zur Kontrolle epithelialer Zellpolarität und funktionelle Analyse der extrazellulären Domäne des Proteins CRUMBS aus *Drosophila melanogaster*. In Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät Universität zu Köln.

Fehon, R.G., Johansen, K., Rebay, I. und Artavanis-Tsakonas S. (1991).

Complex cellular and subcellular regulation of notch expression during embryonic and imaginal development of *Drosophila*: implications for *notch* function. *J Cell Biol.* 113, 657-669.

Fehon, R.G., Dawson, I.A. und Artavanis-Tsakonas, S. (1994).

A *Drosophila* homologue of membrane-skeleton protein 4.1 is associated with *septate junctions* and is encoded by the *coracle* gene. *Development.* 120, 545-557.

Freeman, M., Nüsslein-Volhard, C. und Glover, D.M. (1986).

The dissociation of nuclear and centrosomal division in *gnu*, a mutation causing giant nuclei in *Drosophila*. *Cell.* 46, 457-468.

Freeman, M. (1986).

Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the *Drosophila* eye. *Cell.* 87, 651-660.

Freeman, M. und Bienz, M. (2001).

EGF receptor/Rolled MAP kinase signalling protects cells against activated Armadillo in the *Drosophila* eye. *EMBO Rpts.* 2, 157-162.

Freeman, M. (1997).

Cell determination strategies in the *Drosophila* eye. *Development.* 124, 261-270.

Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S. und Tsukita, S. (1993).

Occludin: a novel integral membrane protein localizing at *tight junctions*. *J Cell Biol.* 123, 1777-1788.

Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K. und Tsukita, S. (1998).

Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at *tight junctions* with no sequence similarity to *occludin*. *J Cell Biol.* 141, 1539-1550.

García-Bellido, A. und Merriam, J.R. (1969).

Cell lineage of the imaginal discs in *Drosophila* gynandromorphs. *J Exp Zool.* 170, 61-75.

George, H. und Terracol, R. (1997).

The *vrije* gene of *Drosophila* is a maternal enhancer of decapentaplegic and encodes a new member of the bZIP family of transcription factors. *Genetics.* 146, 1345-1363.

Glise, B., Bourbon, H. und Noselli, S. (1995).

hemipterous encodes a novel *Drosophila* MAP kinase kinase, required for epithelial cell sheet movement. *Cell.* 83, 451-461.

Glise, B. und Noselli, S. (1997).

Coupling of Jun amino-terminal kinase and Decapentaplegic signaling pathways in *Drosophila* morphogenesis. *GenesDev.* 11, 1738-1747.

Gorski, S.M., Brachmann, C.B., Tanenbaum, S.B. und Cagan, R.L. (2000).

Delta and Notch promote correct localization of IrreC-rst. *Cell Death Differ.* 7, 1011-1013.

Grawe, F., Wodarz, A., Lee, B., Knust, E. und Skaer, H. (1996).

The *Drosophila* genes *crumbs* and *stardust* are involved in the biogenesis of *adherens junctions*. *Development*. 122, 951-959.

Greaves, S., Sanson, B., White, P. und Vincent, J.P. (1999).

A screen for identifying genes interacting with *armadillo*, the *Drosophila* homolog of *beta-catenin*. *Genetics*. 153, 1753-1766.

Gumbiner, B. M. (1996).

Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*. 84, 345-357.

Hafen, E., Basler, K., Edstroem, J. E. und Rubin, G. M. (1987).

Sevenless, a cell-specific homeotic gene of *Drosophila*, encodes a putative transmembrane receptor with a tyrosine kinase domain. *Science*. 236, 55-63.

Halsell, S.R. und Kiehart, D.P. (1998).

Second-site noncomplementation identifies genomic regions required for *Drosophila* nonmuscle myosin function during morphogenesis. *Genetics*. 148, 1845-1863.

Halsell, S.R., Chu, B.I. und Kiehart, D.P. (2000).

Genetic analysis demonstrates a direct link between *rho* signaling and nonmuscle myosin function during *Drosophila* morphogenesis. *Genetics*. 155, 1253-1265.

Hanahan, D., Jessee, J. und Bloom, F.R. (1991).

Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol*. 204, 63-113.

Harden, N. (2002).

Signaling pathways directing the movement and fusion of epithelial sheets: lessons from dorsal closure in *Drosophila*. *Differentiation*. 70, 181-203.

Hay, B. A., Wolff, T. und Rubin, G. M. (1994).

Expression of baculovirus P35 prevents cell death in *Drosophila*. *Development*. 120, 2121-2129.

Hay, B.A., Wassarman, D.A. und Rubin, G.M. (1995).

Drosophila homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death. *Cell*. 83, 1253-1262.

Haynes, S.R., Mozer, B.A., Bhatia-Dey, N. und Dawid, I.B. (1989).

The *Drosophila fsh* locus, a maternal effect homeotic gene, encodes apparent membrane proteins. *Dev Biol*. 134, 246-257.

Hong, Y., Stronach, B., Perrimon, N., Jan, L.Y. und Jan, Y.N. (2001).

Drosophila Stardust interacts with Crumbs to control polarity of epithelia but not neuroblasts. *Nature*. 414, 634-638.

Hou, X. S., Goldstein, E. S. und Perrimon, N. (1997).

Drosophila Jun relays the Jun amino-terminal kinase signal transduction pathway to the Decapentaplegic signal transduction pathway in regulating epithelial cell sheet movement. *Genes Dev*. 11, 1728-1737.

Huang, D.H. und Dawid, I.B. (1990).

The maternal-effect gene *fsh* is essential for the specification of the central region of the *Drosophila* embryo. *New Biol*. 2, 163-170.

Hülsmann-Volkert, G. (1999).

Isolierung und Charakterisierung von Orthologen des *Drosophila* Gens *crumbs*. In Naturwissenschaftliche Fakultät II (Erlangen, Nürnberg: Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg).

Hynes, R. O. (1992).

Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 69, 11-25.

Hynes, R.O. und Zhao, Q. (2000).

The evolution of cell adhesion. *J Cell Biol*. 150, F89-96.

Izaddoost, S., Nam, S.-C. Bhat, M.A., Bellen, H.J. und Choi, K.W. (2002).

Drosophila Crumbs is a positional cue in photoreceptor *adherens junctions* and rhabdomers. *Nature*. 416, 178-183.

Jack, J. und Myette, G. (1997).

The genes *raw* and *ribbon* are required for proper shape of tubular epithelial tissues in *Drosophila*. *Genetics*. 147, 243-253.

Jack, J. und Myette, G. (1999).

Mutations that alter the morphology of the Malpighian tubules in *Drosophila*. *Dev Genes Evol*. 209, 546-554.

Johnson, K., Grawe, F., Grzeschik, N. und Knust E. (2002).

Drosophila crumbs is required to inhibit light-induced photoreceptor degeneration. *Curr Biol*. 12, 1675-1680.

Jürgens, G., Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C. und Kluding, H. (1984).

Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*, II. Zygotic loci on the third chromosome. *Roux's Arch Dev Biol*. 193, 283-295.

Kiehart, D.P., Galbraith, C.G., Edwards, K.A., Rickoll, W.L. und Montague, R.A. (2000).

Multiple forces contribute to cell sheet morphogenesis for dorsal closure in *Drosophila*. *J Cell Biol*. 149, 471-490.

Klebes, A. und Knust, E. (2000).

A conserved motif in Crumbs is required for E-cadherin localisation and *zonula adherens* formation in *Drosophila*. *Curr Biol*. 10, 76-85.

Klebes, A. (1999).

Funktionsanalyse der zytoplasmatischen Domäne des *Drosophila* Crumbs-Proteins. In Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät Heinrich Heine Universität Düsseldorf.

Knust, E., Dietrich, U., Tepass, U., Bremer, K. A., Weigel, D., Vassin, H. und Campos-Ortega, J. A. (1987).

EGF homologous sequences encoded in the genome of *Drosophila melanogaster*, and their relation to neurogenic genes. *Embo J*. 6, 761-766.

Knust, E. (2000).

Control of epithelial cell shape and polarity. *Curr Opin Genet Dev*. 10, 471-475.

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.

- Koh, Y.H., Popova, E., Thomas, U., Griffith, L.C. und Budnik, V. (1999).**
Regulation of DLG localization at synapses by CaMKII-dependent phosphorylation. *Cell*. 98, 353-363.
- Konev, A.Y., Varentsova, E.R. und Khromykh, Y.M. (1994).**
Cytogenetic analysis of the chromosome region containing radiosensitivity gene in *Drosophila*. *Genetika, Moscow*. 30, 201-211.
- Kuchinke, U., Grawe, F. und Knust, E. (1998).**
Control of spindle orientation in *Drosophila* by the Par-3-related PDZ- domain protein Bazooka. *Curr Biol*. 8, 1357-1365.
- Kurada, P. und White, K. (1998).**
Ras promotes cell survival in *Drosophila* by downregulating *hid* expression. *Cell*. 95, 319-329.
- Laski, F.A., Rio, D.C. und Rubin, G.M. (1986).**
Tissue specificity of *Drosophila* P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing. *Cell*. 44, 7-19.
- Lawrence, P.A. und Struhl, G. (1996).**
Morphogens, compartments, and pattern: Lessons from *Drosophila*? *Cell*. 85, 951-961.
- Lekven, A.C., Tepass, U., Keshmeshian, M. und Hartenstein, V. (1998).**
faint sausage encodes a novel extracellular protein of the immunoglobulin superfamily required for cell migration and the establishment of normal axonal pathways in the *Drosophila* nervous system. *Development*. 125, 2747-2758.
- Leptin, M., Bogaert, T., Lehmann, R. und Wilcox, M. (1989).**
The function of PS integrins during *Drosophila* embryogenesis. *Cell*. 56, 401-408.
- Lin, D.M. und Goodman, C.S. 1994**
Ectopic and increased expression of Fasciclin II alters motoneuron growth cone guidance. *Neuron*. 13, 507-523.
- Lindsley, D. L. und Zimm, G. G. (1992).**
The Genome of *Drosophila melanogaster* (San Diego: Academic Press, Inc.).
- Liu, Y., Nusrat, A., Schnell, F.J., Reaves, T.A., Walsh, S., Pochet, M. und Parkos, C.A. (2000).**
Human junction adhesion molecule regulates *tight junction* resealing in epithelia. *J Cell Sci*. 113, 2363-2374.
- Longley, R.L. Jr und Ready, D.F. (1995).**
Integrins and the development of three-dimensional structure in the *Drosophila* compound eye. *Dev Biol*. 1995, 171, 415-33.
- Lotery, A.J., Jacobson, S.G., Fishman, G.A., Weleber, R.G., Fulton, A.B., Namperumalsamy, P., Heon, E., Levin, A.V., Grover, S., Rosenow, J.R., Kopp, K.K., Sheffield, V.C. und Stone, E.M. (2001).**
Mutations in the CRB1 gene cause Leber congenital amaurosis. *Arch Ophthalmol*. 119, 426-427.
- Lu, Y. und Settleman, J. (1999).**
The *Drosophila* pkn protein kinase is a Rho/Rac effector target required for dorsal closure during embryogenesis. *Genes Dev*. 13, 1168-1180.

Luo, L., Liao, Y.J., Jan, L.Y. und Jan. Y.N. (1994).

Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: *Drosophila* Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Genes Dev.* 8, 1787-1802.

MacKrell, A.J., Blumberg, B., Haynes, S.R. und Fessler, J.H. (1988).

The lethal myospheroid gene of *Drosophila* encodes a membrane protein homologous to vertebrate integrin b subunits. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85, 2633-2637.

Marfatia, S.M., Morais-Cabral, J.H., Kim, A.C., Byron, O. und Chishti, A.H. (1997).

The PDZ domain of human erythrocyte p55 mediates its binding to the cytoplasmic carboxyl terminus of glycophorin C. Analysis of the binding interface by in vitro mutagenesis. *J Biol Chem.* 272, 24191-24197.

Magie, C.R., Meyer, M.R., Gorsuch, M.S. und Parkhurst, S.M. (1999).

Mutations in the Rho1 small GTPase disrupt morphogenesis and segmentation during early *Drosophila* development. *Development.* 126, 5353-5364.

Manning, G. (2002)

Personal communication to FlyBase.

<http://flybase.bio.indiana.edu/.bin/fbpcq.html?FBrf0151620>

Marsh, J. L., Erfle, M. und Wykes, E. J. (1984).

The pIC plasmid and phage vectors with versatile cloning sites for recombinant selection by insertional inactivation. *Gene.* 32, 481-485.

Martin-Blanco, E., Gampel, A., Ring, J., Virdee, K., Kirov, N., Tolkovsky, A. M. und Martinez-Arias, A. (1998).

puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*. *Genes Dev.* 12, 557-570.

Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A., Simmons, D. und Dejana, E. (1998).

Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol.* 142, 117-127.

Matsuo, T., Takahashi, K., Kondo, S., Kaibuchi, K. und Yamamoto, D. (1997).

Regulation of cone cell formation by Canoe and Ras in the developing *Drosophila* eye. *Development.* 124, 2671-2680.

Matsuo, T., Takahashi, K., Suzuki, E. und Yamamoto, D. (1999).

The Canoe protein is necessary in *adherens junctions* for development of ommatidial architecture in the *Drosophila* compound eye. *Cell Tissue Res.* 298, 397-404.

Matter, K. und Mellman, I. (1994).

Mechanisms of cell polarity: sorting and transport in epithelial cells. *Curr Opin Cell Biol.* 6, 545-554.

Mays, R.W., Beck, K.A. und Nelson, W.J. (1994).

Organization and function of the cytoskeleton in polarized epithelial cells: a component of the protein sorting machinery. *Curr Opin Cell Biol.* 6, 16-24.

McKeown, C., Praitis, V. und Austin, J. (1998).

sma-1 encodes a betaH-spectrin homolog required for *Caenorhabditis elegans* morphogenesis. *Development.* 125, 2087-2098.

Mechler, B.M., McGinnis, W. und Gehring, W.J. (1985).

Molecular cloning of *lethal(2)giant larvae*, a recessive oncogene of *Drosophila melanogaster*. EMBO J. 4, 1551-1557.

Medina, E., Lemmers, C., Lane-Guermonprez, L. und Le Bivic A. (2002a).

Role of the Crumbs complex in the regulation of junction formation in *Drosophila* and mammalian epithelial cells. Biol Cell. 94, 305-313.

Medina, E., Williams, J., Klipfell, E., Zarnescu, D., Thomas, G. und Le Bivic, A. (2002b).

Crumbs interacts with *moesin* and *beta(Heavy)-spectrin* in the apical membrane skeleton of *Drosophila*. J Cell Biol. 158, 941-951.

Melamed, J. und Trujillo-Cenoz, O. (1975).

The fine structure of the eye imagina disks in muscoid flies. J Ultrastruct Res. 51, 79-93.

Miller, D.T. und Cagan, R.L. (1998).

Local induction of patterning and programmed cell death in the developing *Drosophila* retina. Development. 125, 2327-2335.

Mitchison, T.J und Sedat, J. (1983).

Localization of antigene Determinants in whole *Drosophila* embryos. Developmental Biology. 99, 261-264.

Miyamoto, H., Nihonmatsu, I., Kondo, S., Ueda, R., Togashi, S., Hirata, K., Ikegami, Y. und Yamamoto, D. (1995).

canoe encodes a novel protein containing a GLGF/DHR motif and functions with *Notch* and *scabrous* in common developmental pathways in *Drosophila*. Genes Dev. 9, 612-625.

Morita, K., Furuse, M., Fujimoto, K. und Tsukita, S. (1999).

Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of *tight junction* strands. Proc Natl Acad Sci USA. 96, 511-516.

Moses, K., Ellis, M.C. und Rubin, G.M. (1991).

glass encodes a site-specific DNA-binding protein that is regulated in response to positional signals in the developing *Drosophila* eye. Genes Devel. 5, 583-593.

Müller, H. A. und Wieschaus, E. (1996).

armadillo, *bazooka*, and *stardust* are critical for early stages in formation of the *zonula adherens* and maintenance of the polarized blastoderm epithelium in *Drosophila*. J Cell Biol. 134, 149-163.

Müller, H.A.J. (2000).

Genetic control of epithelial cell polarity: lessons from *Drosophila*. Dev Dyn. 218, 52-67.

Mullis, K.B. und Faloona, F.A. (1987).

Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 155, 335-350.

Nelson, W. J. (1992).

Regulation of cell surface polarity from bacteria to mammals. Science. 258, 948-955.

Newsome, T.P., Schmidt, S., Dietzl, G., Keleman, K., Asling, B., Debant, A. und Dickson, B.J. (2000).

Trio combines with Dock to regulate Pak activity during photoreceptor axon pathfinding in *Drosophila*. Cell. 101, 283-294.

Noselli, S. und Agnes, F. (1999).

Roles of the JNK signaling pathway in *Drosophila* morphogenesis.
Curr Opin Genet Dev. 9, 466-472.

Noren, N.K., Arthur, W.T. und Burridge, K. (2003).

Cadherin engagement inhibits RhoA via p190RhoGAP.
J Biol Chem. [in print]

Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E. und Kluding, H. (1984).

Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*, III. Zygotic loci on the X-chromosome and fourth chromosome. Roux's Arch Dev Biol. 193, 267-282.

Oda, H., Uemura, T., Harada, Y., Iwai, Y. und Takeichi, M. (1994).

A *Drosophila* homolog of *cadherin* associated with *armadillo* and essential for embryonic cell-cell adhesion. Dev Biol. 165, 716-26.

Patthy, L. (1991).

Laminin A-related domains in *crb* protein of *Drosophila* and their possible role in epithelial polarization. FEBS Lett. 289, 99-101.

Pelikka, M., Tanentzapf, G., Pinto, M., Smith, C., McGlade, J., Ready, D.F. und Tepass, U. (2002).

Crumbs, the *Drosophila* homologue of human CRB1/RP12, is essential for photoreceptor morphogenesis. Nature. 416, 143-149.

Perrimon, N., Smouse, D. und Miklos, G.L.G. (1989).

Developmental genetics of loci at the base of the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. Genetics 121, 313-331.

Perrimon, N., Engstrom, L. und Mahowald, A.P. (1989).

Zygotic lethals with specific maternal effect phenotypes in *Drosophila melanogaster*. Genetics 121, 333-352.

Peter, A., Schottler, P., Werner, M., Beinert, N., Dowe, G., Burkert, P., Mourkioti, F., Dentzer, L., He, Y., Deak, P., Benos, P.V., Gatt, M.K., Murphy, L., Harris, D., Barrell, B., Ferraz, C., Vidal, S., Brun, C., Demaille, J., Cadieu, E., Dreano, S., Gloux, S., Lelaure, V., Mottier, S., Galibert, F., Borkova, D., Minana, B., Kafatos, F.C., Bolshakov, S., Siden-Kiamos, I., Papagiannakis, G., Spanos, L., Louis, C., Madueno, E., de Pablos, B., Modolell, J., Bucheton, A., Callister, D., Campbell, L., Henderson, N.S., McMillan, P.J., Salles, C., Tait, E., Valenti, P., Saunders, R.D., Billaud, A., Pachter, L., Klapper, R., Janning, W., Glover, D.M., Ashburner, M., Bellen, H.J., Jäckle, H. und Schafer, U. (2002).

Mapping and identification of essential gene functions on the X chromosome of *Drosophila*. EMBO Rep. 3, 34-38.

Petronczki, M. und Knoblich, J.A. (2001).

DmPAR-6 directs epithelial polarity and asymmetric cell division of neuroblasts in *Drosophila*. Nat Cell Biol. 3, 43-49.

Peifer, M. und Wieschaus, E. (1990).

The segment polarity gene *armadillo* encodes a functionally modular protein that is the *Drosophila* homolog of human plakoglobin. Cell. 63, 1167-1176.

Pichaud, F. und Desplan, C. (2002).

Cell biology: a new view of photoreceptors. Nature. 416, 139-140.

Pirotta, V. (1986).

Cloning *Drosophila* Genes

in Roberts, D.B. (Hrsg.), *Drosophila: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, 83-10.

Ramos, R.G., Igloi, G.L., Lichte, B., Baumann, U., Maier, D., Schneider, T., Brandstatter, J.H., Frohlich, A. und Fischbach, K.F. (1993).

The *irregular chiasm C-roughest* locus of *Drosophila*, which affects axonal projections and programmed cell death, encodes a novel immunoglobulin-like protein. *Genes Dev* 7, 2533-2547.

Rashbass, P. und Skaer, H. (2000).

Cell polarity: Nailing Crumbs to the scaffold. *Curr Biol*. 10, R234-R236.

Reiter, C., Schimansky, T., Nie, Z. und Fischbach, K.F. (1996).

Reorganization of membrane contacts prior to apoptosis in the *Drosophila* retina: the role of the IrreC-rst protein. *Development*. 122, 1931-1940.

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.

Riesgo-Escovar, J. R. und Hafen, E. (1997a).

Drosophila Jun kinase regulates expression of *decapentaplegic* via the ETS-domain protein Aop and the AP-1 transcription factor DJun during dorsal closure. *Genes Dev*. 11, 1717-1727.

Riesgo-Escovar, J. R. und Hafen, E. (1997b).

Common and distinct roles of DFos and DJun during *Drosophila* development. *Science*. 278, 669-671.

Rørth, P. (1996).

A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes.

Proc Natl Acad Sci USA. 93, 12418-1422.

Rogge, R., Green, P.J., Urano, J., Horn-Saban, S., Mlodzik, M., Shilo, B.Z., Hartenstein, V. und Banerjee, U. (1995).

The role of *yan* in mediating the choice between cell division and differentiation. *Development*. 121, 3947-3958.

Roote, C.E. und Zusman, S. (1995).

Functions for PS integrins in tissue adhesion, migration, and shape changes during early embryonic development in *Drosophila*. *Dev Biol*. 169, 322-336.

Rubin, G.M. (1989).

Development of the *Drosophila* retina: inductive events studied at single cell resolution.

Cell. 57, 519-20.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989).

Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York.

Schonbaum, C.P., Organ, E.L., Qu, S. und Cavener, D.R. (1992).

The *Drosophila melanogaster* *stranded at second (sas)* gene encodes a putative epidermal cell surface receptor required for larval development. *Dev Biol*. 151, 431-445.

Schneider, T., Reiter, C., Eule, E., Bader, B., Lichte, B., Nie, Z., Schimansky, T., Ramos, R.G. und Fischbach, K.F. (1995).

Restricted expression of the irreC-rst protein is required for normal axonal projections of columnar visual neurons. *Neuron*. 15, 259-271.

Shearn, A. (1989).

The ash-1, ash-2 and trithorax genes of *Drosophila melanogaster* are functionally related. *Genetics*. 121, 517-525.

Simon, M.A., Bowtell, D.L., Dodson, G.S., Lavery, T.R. und Rubin, G.M. (1991).

Ras1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the sevenless protein tyrosine kinase. *Cell*. 67, 701-716.

Simons, K. (1995).

Biogenesis of epithelial cell surface polarity. *Harvey Lect.* 89, 125-46.

Sluss, H. K., Han, Z., Barrett, T., Davis, R. J. und Ip, T. Y. (1996).

A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in *Drosophila*. *Genes Dev.* 10, 2745-2758.

Speck, O., Hughes, S.C., Noren, N.K., Kulikauskas, R.M. und Fehon, R.G. (2003).

Moesin functions antagonistically to the Rho pathway to maintain epithelial integrity. *Nature*. 421, 83-87.

Spradling, A. C. (1986).

P element mediated transformation. In: *Drosophila*, a practical approach. (ed) Roberts, D. B. (Oxford, IRL press 175-197).

Spradling, A.C., Stern, D., Beaton, A., Rhem, E.J., Lavery, T., Mozden, N., Misra, S. und Rubin, G.M. (1999).

The Berkeley *Drosophila* genome project gene disruption project. Single P-element insertions mutating 25% of vital *Drosophila* genes. *Genetics*. 153, 135-177.

Spreij, T.H.E. (1971).

Cell death during the development of the imaginal discs of *Calliphora erythrocephala*. *Netherlands J Zool.* 21, 221-264.

Steller, H. und Pirotta, V. (1986).

P-Transposons controlled by the Heat Shock Promoters. *Mol Cell Biol.* 6, 1640-1649.

Strutt, D.I., Weber, U. und Mlodzik, M. (1997).

The role of RhoA in tissue polarity and Frizzled signalling. *Nature*. 387, 292-295.

Su, Y. -C, Treisman, J. und Skolnik, E. Y. (1998).

The *Drosophila* Ste20-related kinase *misshapen* is required for embryonic dorsal closure and acts through a JNK MAPK module on an evolutionarily conserved signaling pathway. *Genes Dev.* 12, 2371-2380.

Steinberg, M.S. und McNutt, P.M. (1999).

Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions. *Curr Opin Cell Biol.* 11, 554-560.

Tanenbaum, S.B., Gorski, S.M., Rusconi, J.C. und Cagan, R.L. (2000).

A screen for dominant modifiers of the *irreC-rst* cell death phenotype in the developing *Drosophila* retina. *Genetics*. 156, 205-217.

Tanentzapf, G. und Tepass U. (2003).

Interactions between the crumbs, lethal giant larvae and bazooka pathways in epithelial polarization. *Nat Cell Biol.* 5, 46-52.

Tearle, R.G. und Nüsslein-Volhard, C. (1987).

Tübingen mutants and stock list. *D. I. S.* 66, 209-269.

Tepass, U. (1990).

Genetische und molekulare Aspekte der Aufrechterhaltung der epithelialen Gewebestruktur in *Drosophila melanogaster*. In Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät Universität zu Köln.

Tepass, U. und Knust, E. (1990).

Phenotypic and developmental analysis of mutations at the *crumbs* locus, a gene required for the development of epithelia in *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch Dev Biol.* 199, 189-206.

Tepass, U., Theres, C. und Knust, E. (1990).

crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of *Drosophila* epithelial cells and required for organization of epithelia. *Cell.* 61, 787-799.

Tepass, U. und Knust, E. (1993).

Crumbs and *stardust* act in a genetic pathway that controls the organization of epithelia in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol.* 159, 311-326.

Tepass, U. und Hartenstein, V. (1994).

The development of cellular junctions in the *Drosophila* embryo. *Dev Biol.* 161, 563-596.

Tepass, U., Gruszynski-DeFeo, E., Haag, T. A., Omatyar, L., Torok, T. und Hartenstein, V. (1996).

shotgun encodes *Drosophila* E-cadherin and is preferentially required during cell rearrangement in the neuroectoderm and other morphogenetically active epithelia. *Genes Dev.* 10, 672-685.

Tepass, U. (1996).

Crumbs, a component of the apical membrane, is required for *zonula adherens* formation in primary epithelia of *Drosophila*. *Dev Biol.* 177, 217-225.

Tepass, U. (1997).

Epithelial differentiation in *Drosophila*. *BioEssays.* 19, 673-682.

Tepass, U., Tanentzapf, G., Ward, R. und Fehon, R. (2001).

Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*. *Ann Rev Genet.* 35, 747-784.

Therrien, M., Morrison, D.K., Wong, A.M. und Rubin, G.M. (2000).

A genetic screen for modifiers of a kinase suppressor of Ras-dependent rough eye phenotype in *Drosophila*. *Genetics.* 156, 1231-42.

Tomlinson, A., Kimmel, B. und Rubin, G.M. (1987).

Neuronal differentiation in the *Drosophila* ommatidium. *Dev. Biol.* 120, 336-376.

Thomas, G. H. und Kiehart, D. P. (1994).

Beta heavy-spectrin has a restricted tissue and subcellular distribution during *Drosophila* embryogenesis. *Development.* 120, 2039-2050.

Tsukita, S. und Furuse, M. (1999).

Occludin and claudins in *tight-junction* strands: leading or supporting players. *Trends Cell Biol.* 9, 268-273.

Tsukita, S. und Furuse, M. (2000).

Pores in the wall: claudins constitute *tight junction* strands containing aqueous pores. *J Cell Biol.* 149, 13-16.

Tsukita, S. und Yonemura, S. (1999).

Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *J Biol Chem.* 274, 34507-34510.

von Heijne, G. (1986).

Towards comparative anatomy of N-terminal topogenic protein sequences. *J Mol Biol.* 189, 239-242

Wang, S.L., Hawkins, C.J., Yoo, S.J., Müller, H.A. und Hay, B.A. (1999).

The *Drosophila* caspase inhibitor DIAP1 is essential for cell survival and is negatively regulated by HID. *Cell.* 98, 453-463.

White, K., Grether, M. E., Abrams, J. M., Young, L., Farrell, K. und Steller, H. (1994).

Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science.* 264, 677-683.

Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C. und Jürgens, G. (1984).

Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*, III. Zygotic loci on the X-chromosome and fourth chromosome. *Roux's Arch Dev Biol.* 193, 296-307.

Wieschaus, E. und Gehring, W. (1976).

Clonal analysis of primordial disc cells in the early embryo of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol.* 50, 249-263.

Wodarz, A. (1993).

Untersuchung zur Funktion des Gens *crumbs* bei der Entwicklung von Epithelien in *Drosophila melanogaster*. In Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät Universität zu Köln.

Wodarz, A., Grawe, F. und Knust, E. (1993).

CRUMBS is involved in the control of apical protein targeting during *Drosophila* epithelial development. *Mech Dev.* 44, 175-87.

Wodarz, A., Hinz, U., Engelbert, M. und Knust, E. (1995).

Expression of *crumbs* confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *Drosophila*. *Cell.* 82, 67-76.

Wodarz, A., Ramrath, A., Grimm, A. und Knust, E. (2000).

Drosophila atypical protein kinase C associates with Bazooka and controls polarity of epithelia and neuroblasts. *J Cell Biol.*, 150, 1361-1374.

Wolff, T. und Ready, D.F. (1991a).

Cell death in normal and rough eye mutants of *Drosophila*. *Development.* 113, 825-839.

Wolff, T. und Ready, D.F. (1991b).

The beginning of pattern formation in the *Drosophila* compound eye: the morphogenetic furrow and the second mitotic wave. *Development.* 113, 841-850.

Woods, D.F. und Bryant, P.J. (1991)

The discs-large tumor suppressor gene of *Drosophila* encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. *Cell.* 66, 451-464.

Wright, T. (1968).

The phenogenetics of temperature sensitive alleles of lethal *myospheroid* in *Drosophila*. *Int Congr Genet.* 121-141.

- Xu, Y., Guo, D. F., Davidson, M., Inagami, T., und Carpenter, G. (1997).**
Interaction of the adaptor protein Shc and the adhesion molecule cadherin. *J Biol Chem.* 272, 13463-6.
- Yap, A.S. und Kovacs, E.M. (2003)**
Direct cadherin-activated cell signaling: a view from the plasma membrane.
J Cell Biol. 160, 11-16.
- Yeaman, C., Grindstaff, K.K. und Nelson, W.J. (1999a).**
New perspectives on mechanisms involved in generating epithelial cell polarity.
Physiol Rev. 79, 73-98.
- Yeaman, C., Grindstaff, K.K., Hansen, M.D.H. und Nelson, W.J. (1999b).**
Cell polarity: Versatile scaffolds keep things in place. *Curr Biol.* 9, R515-R517.
- Young, P. E., Richman, A. M., Ketchum, A. S. und Kiehart, D. P. (1993).**
Morphogenesis in *Drosophila* requires nonmuscle myosin heavy chain function. *Genes Dev.* 7, 29-41.
- Yu, S.Y., Yoo, S.J., Yang, L., Zapata, C., Srinivasan, A., Hay, B.A. und Baker, N.E. (2002).**
A pathway of signals regulating effector and initiator caspases in the developing *Drosophila* eye.
Development. 129, 3269-3278.
- Zhang, Q., Zheng, Q. und Lu, X. (1999).**
A genetic screen for modifiers of *Drosophila* Src42A identifies mutations in *Egfr*, *rolled* and a novel signaling gene. *Genetics.* 151, 697-711.
- Zusman, S., Grinblat, Y., Yee, G., Kafatos, F.C. und Hynes, R.O. (1993).**
Analyses of PS integrin functions during *Drosophila* development.
Development. 118, 737-750.

8. Anhang

8.1 Abkürzungen

3'-UTR	3'- untranslatierte Region	konz.-abh.	konzentrationsabhängig
5'-UTR	5'- untranslatierte Region	l	Liter
α	anti-...	LB	Luria Bertani Medium
A	Adenosin	M	Molarität (mol/l)
Abb.	Abbildung	MeOH	Methanol
Amp	Ampicillin	μ ...	mikro... (10^{-6})
Anz.	Anzahl	m...	milli... (10^{-3})
AP	Alkalische Phosphatase	MCS	multiple-cloning-site (Polylinker)
AS	Aminosäure	min	Minuten
ATP	Adenosintriphosphat	n...	nano... (10^{-9})
Bal.	Balancer-Chromosom	ngs	natives Ziegenserum
bp	Basenpaare	OD	Optische Dichte
BSA	Rinderserumalbumin	p.d.	Pupalentwicklung (pupal development)
bzw.	beziehungsweise	PBS	Phosphat-gepufferte NaCl- Lösung
C	Cytosin	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
ca.	circa	R	Rad
cDNA	complementary DNA	RNA	Ribonukleinsäure
Chr.	Chromosom	rpm	Umdrehung pro Minute
CIP	alkalische Phosphatase (Kalb)	RT	Raumtemperatur
DAB	Diaminobenzidin	SDS	Natriumdodecylsulfat
dATP	Desoxy-Adenosin-5'- triphosphat	s.	siehe
dCTP	Desoxy-Cytidin-5'-triphosphat	sec	Sekunden
dGTP	Desoxy-Guanosin-5'- triphosphat	s.o.	siehe oben
dTTP	Desoxy-Thymidin-5'- triphosphat	s.u.	siehe unten
Def.	Defizienz	T	Tymidin
dest.	destilliert	Tab.	Tabelle
dH ₂ O	destilliertes Wasser	TAE	Tris-Acetat-EDTA
DMF	Dimethylformamid	TBE	Tris-Borat-EDTA
DMSO	Dimethylsulfoxid	TE	Tris-EDTA
DNA	Desoxyribonukleinsäure	TAQ	Thermophilus aquaticus
dNTP	Desoxyribonukleotid- triphosphat	TE	Tris-EDTA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	Temp.	Temperatur
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	Tris	Tris (Hydroxymethyl)- aminomethan
EtBr	Ethidiumbromid	U	Unit
EtOH	Ethanol	u.a.	unter anderem
et al.	et alii (und weitere)	UV-Licht	ultraviolettes Licht
g	Gramm	ü.N.	über Nacht
G	Guanin	V	Volt
genom.	genomisch	vgl.	vergleiche
°C	Grad Celsius	Vol.	Volumen
h	Stunde(n)	VT	Volumenteil
<i>hsp</i>	heat-shock-promotor	wdh.	wiederholen
HRP	Meerrettich-Peroxidase	z.B.	zum Beispiel
kb	Kilo-Basenpaare	z.T.	zum Teil
konz.	konzentriert	z.Zt.	zur Zeit

8.2 Kartierungen

In diesem Abschnitt werden Ergebnisse von Feinkartierungsexperimenten beschrieben, die nicht zur Einengung der Kandidatenregion innerhalb einer großen Defizienz führten.

8.2.1 Df(1)A113;Dp(1;2)64b (Linie #940)

Die im Rahmen des Modifier-Screens gefundene Defizienz Df(1)A113; Dp(1;2)64b ist auf dem ersten Chromosom lokalisiert und hat, nach Angaben der Flybase-Datenbank, die Bruchpunkte 03D6-E1; 04F5. Der linke Bruchpunkt wurde bislang nicht genau kartiert. Die getestete Linie trägt außerdem eine Duplikation, wobei ein Teil des ersten Chromosoms in das zweite Chromosom inseriert ist. Defizienz Df(1)RR62 (#6009), welche an die von Defizienz Df(1)A113; Dp(1;2)64b markierte Region angrenzt, zeigt keine Modifikation des Augenphänotyps und wurde daher nicht näher auf eine Abschwächung des *crumbs*-Phänotyps hin getestet. Mit ihrer Hilfe konnte jedoch die Region von Interesse auf den Bereich 03E1;04F5 eingegrenzt werden.

Df(1)A113; Dp(1;2)64b verstärkt als Enhancer der Klasse 3 den rauhen Augenphänotyp von GMR-Gal4-*crb*^{intra38.1.2b} und agiert zudem als Suppressor der Klasse 2-3 des mutanten Kutikula-Phänotyps der *crumbs*-Allele *crb*^{11A22} und *crb*^{8F105} (in Abb. 8.1 farbig markiert). Der Phänotyp, der entsteht, wenn dieser defiziente Stamm mit *crb*-Mutanten gekreuzt wird, zeigt Kopfdefekte, Defekte des Keimstreifrückzugs sowie einen unvollständigen dorsalen Rückenschluss. Zudem ist die vorhandene Kutikula sehr schwach differenziert, und obgleich eine schwache Segmentierung vorhanden ist, sind keine Zähnchenbänder zu erkennen (Abb. 8.6). Mit Hilfe weiterer Defizienzen aus der Bloomington-Kollektion wurde versucht, eine Kandidatenregion weiter einzugrenzen, jedoch ohne Erfolg. Keine der getesteten kleineren Defizienzen erzielte bei Einkreuzung eine Modifikation des Augenphänotyps oder eine Abschwächung der beiden mutanten *crumbs*-Phänotypen, welche so stark wie die von Defizienz Df(1)A113; Dp(1;2) 64b war. Nur Defizienz Df(1)HC244 (#941), welche eine ähnlich grosse Region deletiert, wie Defizienz Df(1)A113; Dp(1;2) 64b, zeigte eine stärkere Modifikation bzw Abschwächung. In Tabelle 8.1 und Abb 8.1 sind die Ergebnisse der Kartierung zusammengefasst.

In allen anderen Fällen sind Modifikation und Suppression schwach und die Resultate uneinheitlich. Das läßt den Schluß zu, dass mehrere chromosomale Bereiche in der Defizienz an einer Abschwächung des mutanten *crumbs*-Phänotyps beteiligt sind. Df(1)GA102 (#1877) und Df(1)ovo44 (#6005), die sich nicht überschneiden, zeigten beide eine Abschwächung des Phänotyps in unterschiedlicher Stärke. In jedem dieser Bereiche können unterschiedliche Gene an einer Modifikation oder Suppression der mutanten *crumbs*-Phänotypen beteiligt sein. Einige Defizienzen, z.B. Tp(1;2)rb+71g (#909) und Df(1)Sp(rb) (#3372), modifizierten den Augenphänotyp, ohne dass sie zugleich den mutanten Kutikula-Phänotyp supprimierten. Ebenso gab es Defizienz-Stämme, durch

deren Einkreuzung der Augenphänotyp nicht modifiziert wurde, während die Kutikula-Defekte abgeschwächt wurden, (z. B. Df(1)GA102 (#1877) und Df(1)ovo44 (#6005).

Eine weitere Möglichkeit einer Erklärung für die phänotypischen Befunde war, dass möglicherweise nicht nur die Deletion der Region 03D6 - 04F5, sondern auch die Duplikation eines Genom-Abschnitts des ersten Chromosoms oder seine Integration ins dritte Chromosom in der Region 64B7 von Bedeutung ist. Da zwischen diesen Alternativen nicht unterschieden werden konnte, wurde diese Defizienz im Rahmen dieser Arbeit nicht genauer untersucht.

Chr.	Linie	Bruchpunkte	Kutikula	x GMR-Gal4-38.1.2b	x GMR-Gal4-ΔERLI	x <i>crb</i> ^{11A22} Kutikula	x <i>crb</i> ^{8F105} Kutikula
I	(#940) Df(1)A113;Dp(1;2) 64b	03D6-E1; 04F5 (03D6-E1; 0415-16)	undifferenziert (schwach)	Enhancer E 3	E 0	Suppressor 2-3	Suppressor 3
I	Def # 6009 Df(1)RR62	03C; 03D	-----	E 0	E 0	S 0	-----
I	Def # 939 Df(1)dm75 e19	03C11; 03E4	-----	E 0	E 0	S 0	-----
I	Def # 5980 Df(1)cho5	03D; 04A	-----	E 0	E 0	Suppressor 1	-----
I	Def # 1877 Df(1)GA102	03D4-5; 03F7-8	-----	E 0	E 0	Suppressor 1	Suppressor 1-2
I	Def # 1494 Df(1)cho2	03E; 04A	-----	E 0 (-1)	E 0	S 0	S 0
I	Def # 941 Df(1)HC244	03E8; 04F11	-----	Enhancer E 1	E 0	Suppressor 1	Suppressor 1-2
I	Def # 909 Tp(1;2)rb+ 71g	03F3; 05E8	-----	E 0 (-1)	E 0	S 0	S 0
I	Def # 3372 Df(1)Sp(rb)	03F4-04B6; 04C6-7 – 05A4	-----	Enhancer E 1-2	E 0	S 0	S 0
I	Def # 5981 Df(1)cho10	03F4; 03F1- 4	-----	E 0 (-1)	E 0	S 0 (-1)	Suppressor 1 (-2)
I	Def # 5982 Df(1)cho24	03F4; 04A1-4 – 04C6	-----	E 0	E 0	S 0	Suppressor 1-2
I	Def # 5983 Df(1)cho25	03F4; 04A1-4 – 04C6	-----	E 0 (-1)	E 0	Suppressor 1	Suppressor 1-2
I	Def # 3200 Df(1)bi-DL1	04A3-5; 04C15-16	-----	E 0	E 0	S0	-----
I	Def # 6005 Df(1)ovo44	04A4-5; 04F11-12	undiff, Kopf defekt	E 0	E 0	Suppressor 1-2	Suppressor 2

Tab. 8.1: Tabellarische Auflistung der Ergebnisse der Kartierung von Defizienz Df(1)A113;Dp(1;2) 64b

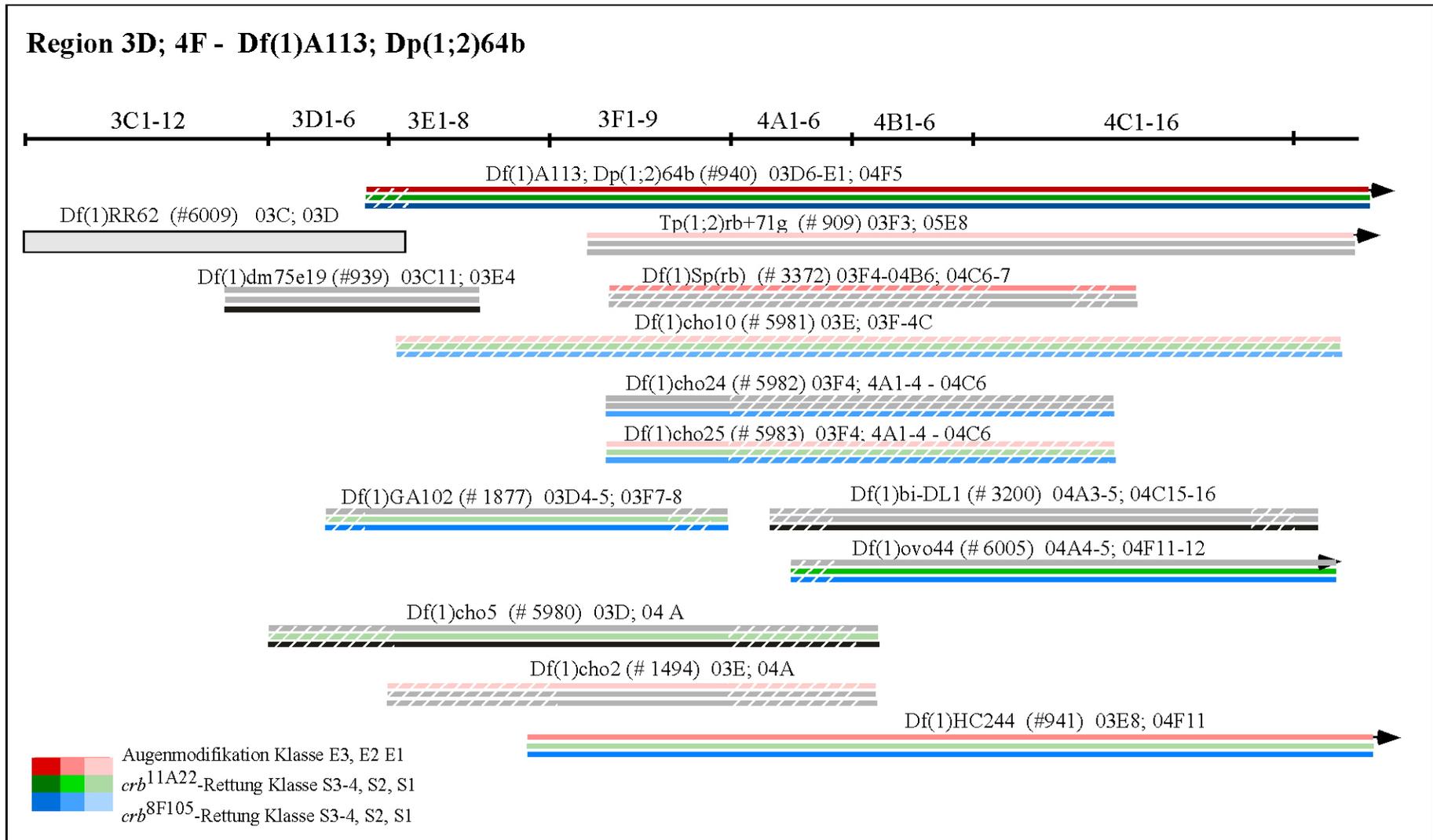


Abb. 8.1: Nähere Kartierung von Defizienz Df(1)A113; Dp (1;2)64b (#940) (03D3-E1;04F5)

Defizienz Df(1)A113; Dp (1;2)64b (#940) und Df(1)RR62 (#6009) wurden im ursprünglichen Screen gefunden. Df(1)RR62 (#6009) zeigte jedoch keine Modifikation und wurde nicht weiter untersucht. In den anderen untersuchten Defizienzen wird eine Modifizierung des rauhen Augenphänotyps unterschiedlicher Stärke durch einen rot/rosafarbenen Balken gekennzeichnet, grün und blau kennzeichnet eine Rettung des mutanten Phänotyps der beiden *crumbs*-Allele *crb*^{11A22} und *crb*^{8F105}. In grau gekennzeichnete Balken stehen für fehlende Modifikation oder Rettung, schwarze Balken dafür, dass der entsprechende Versuch nicht durchgeführt wurde und eine Schraffierung der Balkenenden kennzeichnet der entsprechende Bruchpunkt nicht genau kartiert worden ist. Details zur Kartierung siehe Text.

8.2.2 Df(2L)b87e25 (Linie #3138) und Df(2L)TE35BC-24 (Linie #3588)

In dieser genomischen Region auf Chromosom 2 konnten zwei Defizienzen identifiziert werden, Df(2L)b87e25 (#3138) und Df(2L)TE35BC-24 (#3588), die in gleichem Maße in der Lage sind, den rauhen Augenphänotyp zu modifizieren (Klasse E3) sowie den fehlerhaften Kutikula-Phänotyp der Allele *crb*^{11A22} und *crb*^{8F105} abzuschwächen (Abb. 8.5). Sowohl homozygot mutante Embryonen beider Linien als auch Embryonen, in welchen die beiden Defizienzen in Hemizygotie übereinander vorliegen, weisen den gleichen Phänotyp auf, der sich durch Defekte des dorsalen Schlusses auszeichnet. Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, dass die gefundenen Effekte auf demselben Gen beruhen.

Die beiden Defizienzen überlappen in der genomischen Region 35B4-35C1.

Mit Hilfe einer Reihe kleinerer Defizienzen wurde versucht, die Kandidatenregion im Überlappungsbereich genauer zu kartieren und hierdurch möglicherweise das verantwortliche Gen zu identifizieren. Dieses Ziel konnte nicht erreicht werden. Die Befunde sind in Abb. 8.2 und Tab. 8.2 zusammengefasst. Zwar waren einige der getesteten Defizienzen in der Lage, den mutanten Kutikula-Phänotyp abzuschwächen, keine von ihnen konnte aber den rauhen Augenphänotyp in dem Ausmaß modifizieren, wie die beiden Defizienzen Df(2L)b87e25 (#3138) und Df(2L)TE35BC-24 (#3588). Zudem fanden sich im Bezug auf Modifikation des Augenphänotyps oder Abschwächung des mutanten Kutikula-Phänotyps grosse Unterschiede beim Vergleich der Effekte von Defizienzen, welche nach Angaben der Flybase-Datenbank ähnliche Bereiche abdecken sollten (z.B. #6058 und #6242). Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse wurde die weitere Analyse dieser Region zu Gunsten anderer Kandidaten zurückgestellt.

Im Rahmen eines Praktikums wurde die Region von N. Menne weiter kartiert. Die von ihr gefundenen Ergebnisse wurden mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt und sind in die zusammenfassende Tabelle aufgenommen worden (Tab. 8.2, kursiver Schrifttyp). Sie sind jedoch in der entsprechenden Karte (Abb. 8.2) nicht enthalten.

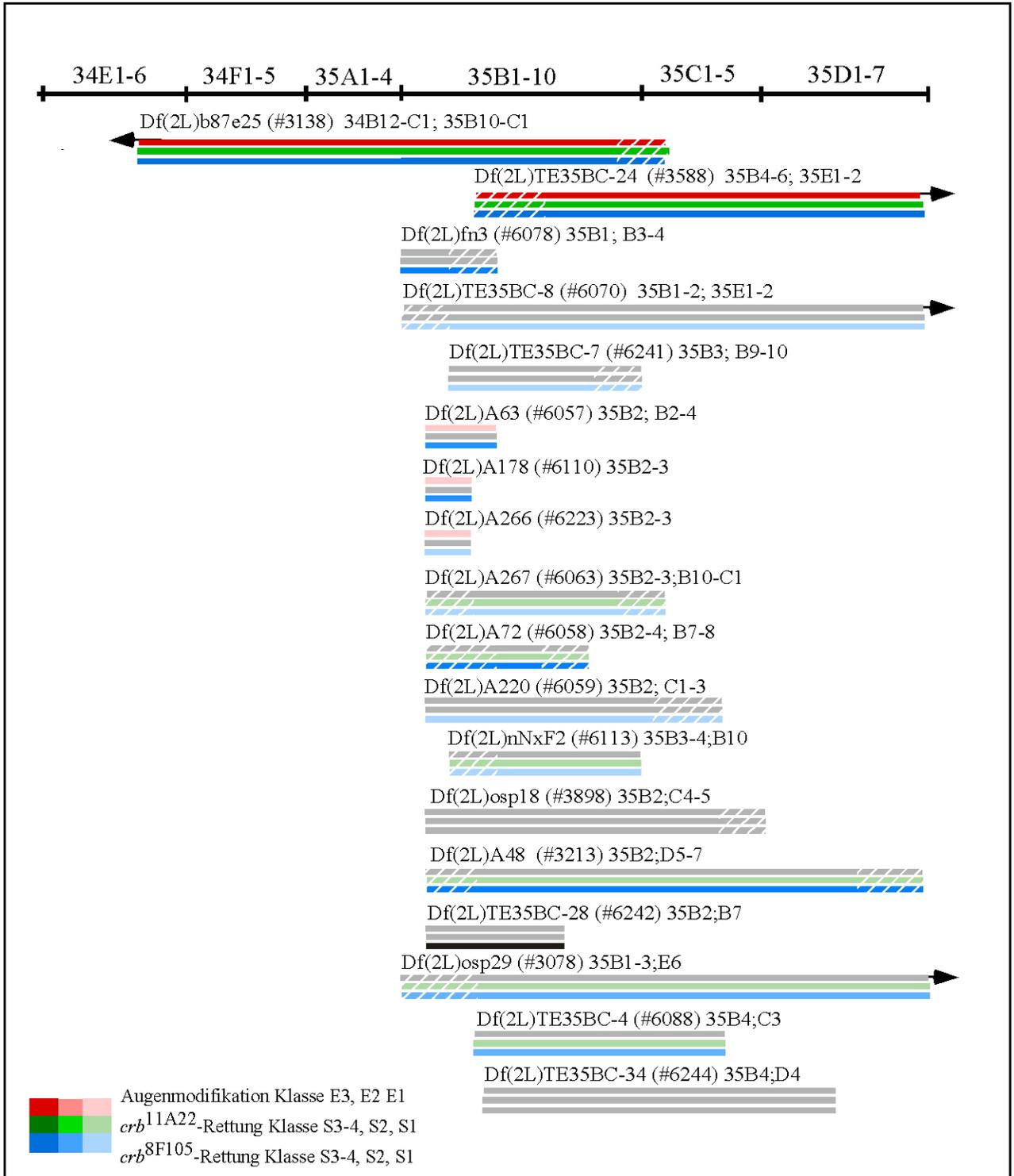


Abb. 8.2: Nähere Kartierung der Defizienzen Df(2L)b87e25 (#3138) und Df(2L)TE35BC-24 (#3588) (35B4-6; 35C1) Die beiden Defizienzen #8138 und #3588 wurden im ursprünglichen Screen gefunden. Beide zeigen eine vergleichbar starke Modifikation des rauhen Augenphänotyps sowie eine Rettung des Phänotyps der *crumbs*-Allele *crb*^{8F105} und *crb*^{11A22}. Ebenso weisen beide Defizienzen einen identischen Kutikulaphänotyp auf. Da möglicherweise beide Defizienzen beide das gesuchte Gen betreffen wurde die überlappende Region, 35B4-6; 35C1 mit Hilfe weiterer Defizienzen näher kartiert. In den untersuchten Defizienzen wird eine Modifizierung des rauhen Augenphänotyps unterschiedlicher Stärke durch einen rot/rosafarbenen Balken gekennzeichnet, grün und blau kennzeichnet eine Rettung des mutanten Phänotyps der beiden *crb*-Allele *crb*^{11A22} und *crb*^{8F105}. Grau gekennzeichnete Balken stehen für fehlende Modifikation oder Rettung, schwarze Balken dafür, dass der entsprechende Versuch nicht durchgeführt wurde. Eine Schraffierung der Balkenenden kennzeichnet, dass der Bruchpunkt nicht genau kartiert worden ist. Details zur Kartierung siehe Text/Tabelle.

Chr.	Linie Nr.	Region	Kutikula-Phänotyp	X GMR-Gal4- <i>crb</i> ^{intra} 38.1.2b	X GMR-Gal4- Δ ERLI	X <i>crb</i> ^{11a22} (Kutikula)	X <i>crb</i> ^{8F105} (Kutikula)	X <i>sdt</i> ^{XD96} (Kutik.)	X <i>sdt</i> ^{XN05} (Kutik.)	X <i>baz</i> ^{XI106} (Kutik.)
II	Def # 3138 Df(2L)b87e25	34B12-C1; 35B10-C1	dorsal offen	Enhancer E 3	E 0	Suppressor 1-3	Suppressor 3	S 0	S 0	S 0
II	Def # 3588 Df(2L)TE35BC-24	35B4-6; 35F1-7	dorsal offen	Enhancer E 3	E 0	Suppressor 1-3	Suppressor 3	Suppressor 1	Suppressor 1-2	S 0
	Def # 6078 Df(2L)fn3	35B01;35B03-04	-----	E 0 (-1)	E 0	S 0	Suppressor 2-3	-----	-----	-----
	Def # 6070 Df(2L)TE35BC-8	35B01; 35E01	-----	E 0 (-1)	E 0	S 0	Suppressor 1	-----	-----	-----
	Def # 6241 Df(2L)TE35BC-7	35B03; 35B09- 10	-----	E 0	E 0	S 0	Suppressor 1 (-2)	-----	-----	-----
	Def # 6057 Df(2L)A63	35B02; 35B02- 04	-----	Enhancer 1	E 0	S 0	Suppressor 2	-----	-----	-----
	Def # 6110 R Df(2L)A178	35B01-02; 35B01-02	-----	Enhancer 1	E 0	S 0	Suppressor 2 (-3)	-----	-----	-----
	Def # 6223 R Df(2L)A266	35B02- 03;35B02-03	-----	Enhancer 1	E 0	S 0	Suppressor 1	-----	-----	-----
	Def # 6063 Df(2L)A267	35B02- 03;35B10-C01	-----	E 0 (-1)	E 0	Suppressor 1	Suppressor 1	-----	-----	-----
	Def # 6059 Df(2L)A220	35B02; 35C01- 03	-----	E 0 (-1)	E 0	S 0	Suppressor 1	-----	-----	-----
	Def # 6058 Df(2L)A72	35B02- 03;35B07-08	-----	E 0 (-1)	E 0	Suppressor 1 (-2)	Suppressor 2-3	-----	-----	-----
	Def # 6113 Df(2L)nNxF2	35B03;35B10	-----	E 0 (-1)	E 0	Suppressor 1	Suppressor 1	-----	-----	-----
	Def # 3898 Df(2L)osp18	35B02;35C04-05	-----	E 0	E 0	S 0	S 0 (-1)	-----	-----	-----
	Def # 3213 Df(2L)A48	35B02- 03;35D05-07	-----	E 0 (-1)	E 0	Suppressor 1	Suppressor 2-3	-----	-----	-----
	Def # 6242 Df(2L)TE35BC-28	35B02;35B07	-----	E 0	E 0	S 0	-----	-----	-----	-----

	Def # 6240 Df(2L)TE35BC-35	35B02;35D04	-----	E 0	E 0	S 0 (-1)	S 0 (-1)	-----	-----	-----
	Def # 3078 Df(2L)osp29	35B03; 35E06	-----	E 1/2	E 0	Suppressor 1	Suppressor 1 (-2)	-----	-----	-----
	Def # 6088 Df(2L)TE35BC-4	35B04;35C03	-----	E 0	E 0	Suppressor 1-2	Suppressor 1 (-2)	-----	-----	-----
	Def # 6244 Df(2L)TE35BC-34	35B04;35D04	-----	E 0 (1/2)	E 0	S 0	S 0	-----	-----	-----
	<i>P – 12046</i> <i>P{PZ}osp[rJ571]</i>	<i>35B01-35B04</i>	-----	<i>E 0</i>	-----	<i>S 0</i>	-----	-----	-----	-----
	<i>P – 10810</i> <i>P{lacW}l(2)</i> <i>35Bc[k08808]</i>	<i>35B06-35B10</i>	-----	<i>E 0</i>	-----	<i>S 0</i>	<i>Suppressor 2</i>	-----	-----	-----
	<i>P – 12173</i> <i>P{lacW}l(2)</i> <i>35Bb[k11524a]</i>	<i>35B06-35B07</i>	-----	<i>E 0</i>	-----	<i>S 0</i>	<i>Suppressor 1-2</i>	-----	-----	-----
	<i>P – 12174</i> <i>P{lacW}l(2)</i> <i>35Bg[k10011]</i>	<i>35B08-35B10</i>	-----	<i>E 0</i>	-----	<i>Suppressor 0 (-1)</i>	<i>Suppressor 1 (-2)</i>	-----	-----	-----
	<i>P – 12366</i> <i>P{PZ}l(2)35Bd[10 408]</i>	<i>35B08-09</i>	-----	<i>E 0</i>	-----	<i>Suppressor 1 (-2)</i>	<i>Suppressor 2</i>	-----	-----	-----
	<i>P – 602</i>		-----	<i>E 0</i>	-----	<i>S 0</i>	<i>Suppressor 1 (-2)</i>	-----	-----	-----
	<i>P – 10689</i> <i>P{lacW}Su(H)^{k07904}</i>	<i>35B08-35B09</i>	-----	<i>E 0</i>	-----	<i>S 0</i>	<i>Suppressor 1-2</i>	-----	-----	-----
	<i>P – 10707</i> <i>P{lacW}C3-2-9</i>	<i>35C01-35C05</i>	-----	<i>E 0</i>	-----	<i>Suppressor 0 (1-2)</i>	<i>Suppressor 1</i>	-----	-----	-----
	<i>P – 4651</i> <i>P{418}Su(Pc)</i> <i>35CD[T41.2]</i>	<i>35C-D</i>	-----	<i>E 0</i>	-----	<i>0 (-1)</i>	<i>Suppressor 1 mix</i>	-----	-----	-----
	<i>P – 12337</i> <i>P{PZ}ck[07130]</i>	<i>35C01-35C03</i>	-----	<i>E 0</i>	-----	<i>Suppressor 0 (1-2)</i>	<i>Suppressor 2-3</i>	-----	-----	-----

<i>P – 11408</i> <i>P{PZ}stc[05441]</i>	<i>35C01-C02</i>	-----	<i>E 0</i>	-----	<i>Suppressor</i> <i>0 (1-2)</i>	<i>Suppressor</i> <i>2-3</i>	-----	-----	-----
<i>P – 10927</i> <i>P{lacW}esg[B7-2-22]</i>	<i>35C03</i>	-----	<i>Enhancer 2-3</i>	-----	<i>Suppressor</i> <i>0-1</i>	<i>0 (-1)</i>	-----	-----	-----
<i>P – 11759</i> <i>P{PZ}ms(2)⁰²35Ci₃₁₆</i>	<i>P-Element</i>	-----	<i>E 0</i>	-----	<i>0 (-1)</i>	<i>Suppressor</i> <i>1-2</i>	-----	-----	-----
<i>P – 10359</i> <i>P{lacW}esg^{k00606}</i>	<i>35D01-D02</i>	-----	<i>Enhancer 2-3</i>	-----	-----	<i>Suppressor</i> <i>1 (-2)</i>	-----	-----	-----
<i>P – 11033</i> <i>P{ArB}A507.2M2</i>	<i>35D01-E06</i>	-----	<i>E 0</i>	-----	<i>S 0</i>	-----	-----	-----	-----
<i>P – 5328</i> <i>P{lacW}k09017b</i>	<i>35D01-02</i>	-----	<i>E 0</i>	-----	<i>Suppressor</i> <i>0-1</i>	<i>Suppressor</i> <i>1-2</i>	-----	-----	-----
<i>P – 12535</i> <i>P{GT1}Adh[BG01049]</i>	<i>35B03</i>	-----	<i>E 0</i>	-----	<i>S 0</i>	<i>Suppressor 1</i>	-----	-----	-----
<i>P – 12457</i> <i>P{GT1}Rab14^{BG011}₃₄</i>	<i>35A01</i>	-----	<i>E 0</i>	-----	<i>S 0</i>	-----	-----	-----	-----
<i>crinkled⁰⁷¹³⁰</i>	<i>35C01-C03</i>	-----	<i>Enhancer 1</i>	-----	<i>Suppressor 1</i>	<i>Suppressor 1</i>	-----	-----	-----

Tab. 8.2: Tabellarische Auflistung der näheren Kartierung der Defizienzen Df(2L)b87e25 (#3138) und Df(2L)TE35BC-24 (#3588)

Zusätzlich zu der von mir vorgenommenen Feinkartierung mit kleineren Defizienzen wurde die Region von N. Menne mit P-Element-induzierten Mutationen kartiert. Die dabei erhobenen Daten wurden mir der Vollständigkeit halber für diese Tabelle zur Verfügung gestellt und sind durch kursiven Schrifttyp markiert.

8.2.3 Df(2L)cact-255rv64 (#2583)

Bei der im Rahmen des Modifier-Screens gefundenen Defizienz Df(2L)cact-255rv64 (#2583) handelt es sich um eine Region auf dem zweiten Chromosom, welche die genomische Region 35F-36A;36D deletiert. Ihr linker Bruchpunkt wurde bislang nicht genauer kartiert. Die modifizierende Region von Interesse konnte jedoch durch zwei weitere Defizienzen, 1491 und 3180, die den rauhen Augenphänotyp nicht modifizieren können, auf den Bereich 36A6;36A8-9 eingegrenzt werden. In diesem Gebiet überschneiden sich diese beiden Defizienzen nicht. Die genaue Lage ihrer Bruchpunkte in diesem Bereich wurde bislang nicht genauer kartiert.

Df(2L)cact-255rv64 agiert als starker Enhancer der Klasse 4 und ist in der Lage, den mutanten Kutikula-Phänotyp der beiden getesteten *crumbs*-Allele in unterschiedlicher Stärke zu abschwächen (1-2/2-3). Homozygote Embryonen von Df(2L)cact-255rv64 zeigen keinen auffälligen Kutikulaphänotyp. Nur in einigen von ihnen beobachtet man leichte Defekte der Zähnchenreihen, die leicht reduziert oder auch verwachsen sein können..

Für eine nähere Kartierung standen keine weiteren Defizienzen zur Verfügung. Daher wurden Linien mit P-Element-Insertionen getestet, die in der Region 36A6;36A8-9 kartieren. Obwohl einige dieser P-Element-Mutationslinien eine sehr schwache Modifikation des Augenphänotyps erzielten, war keines der P-Elemente in der Lage, den mutanten Kutikula-Phänotyp des Allels *crb*^{11A22} abzuschwächen. Da die Kandidatenregion mit keinem der gewählten Ansätze weiter eingegrenzt werden konnte, wurde ihre Untersuchung zugunsten anderer Kandidaten zurückgestellt. Die Ergebnisse der Kartierung aus Region 36A sind in Tabelle 8.3 und Abb. 8.3 zusammengefasst. Beispiele für die im Schweregrad abgeschwächten Kutikula-Veränderungen bei Embryonen, die durch Kreuzung von *crb*-Mutanten mit Defizienz-Tieren entstehen, finden sich in Abb 8.6.

Chr.	Linie Nr.	Region	Kutikula-Phänotyp	X GMR-Gal4- <i>crb</i> ^{intra} 38.1.2b	X GMR-Gal4-ΔERLI	X <i>crb</i> ^{11a22} (Kutikula)	X <i>crb</i> ^{8F105} (Kutikula)
II	Def # 2583 = Df(2L)cact-255rv64	35F-36A; 36D	normal, leichte Zähnchen-Defekte	Enhancer E 4	E 0	Suppressor 1-2	Suppressor 2-3
II	P - 3656 = P{lacW} l(2)35Fg ^{k08106a}	35F11 – 36A2	-----	E 0 (-1)	E 0	S 0	-----
	P – 10831 P{lacW}glu[k 08819]	36A12-14	-----	E 0 (-1)	E 0	S 0	-----
	P – 12047 P{PZ}dac[P]	36A1-2	-----	E 0 (-1)	E 0	S 0 (-1)	-----
	P – 11174	36A4-5	-----	E 0 (-1)	E 0	S 0	-----

	P{\lacW}1(2) k16215 ^{k16215}						
	P – 12219 P{PZ}grp ⁰⁶⁰³⁴	36A6-7	-----	E 0	E 0	S 0	-----
	P – 11763 P{PZ}bln[1]	36A8-B6	-----	E 0	E 0	S 0	-----
	P – 11139 P{\lacW}1(2) k15102 ^{k15102}	36A10-11	-----	E 0	E 0	S 0	-----
	P – 11115 P{\lacW}1(2) k13905 ^{k1}	36A10-11	-----	E 0	E 0	S 0	-----

Tab. 8.3: Tabellarische Auflistung der Ergebnisse der Feinkartierung von Defizienz Df(2L)cact-255rv64

8.2.4 Df(2R)en-A (#190)

Die im Rahmen des Modifier-Screens gefundene Defizienz Df(2R)en-A (#190) ist auf dem zweiten Chromosom lokalisiert und deletiert die Region von 47D3 – 48B2. Mit Hilfe der Defizienzen Df(2R)E3363 (#520) und Df(2R)en30 (#1145), welche teilweise mit Df(2R)en-A (#190) überlappen, jedoch beide keine Modifikation des Augenphänotyps erreichen, ließ sich die Region von Interesse auf 47F-48A3-4 eingrenzen. Df(2R)en-A modifiziert als Enhancer der Klasse 2 den rauhen Augenphänotyp und unterdrückt als Suppressor der Stärke S1 bzw S2-3 die mutanten Kutikula-Phänotypen der *crumbs* Allele *crb*^{11A22} und ^{8F105} im Embryo. Homozygot mutante Embryonen besitzen nur ventrale Kutikula, welche von einem Zähnenrasen überzogen ist. Die phänotypischen Auswirkungen der Deletion auf den Kutikula-Phänotyp von *crb*-Mutanten sind exemplarisch in Abb. 8.6 gezeigt.

Mit Hilfe weiterer Defizienzen, Df(2R)en-B (#1142), Df(2R)en28 (#1143), Df(2R)enE, *inv*^E*en*^E (#2216) und Df(2R)en-SFX31 (#3373), und P-Element-Insertionen wurde die Region näher kartiert (Abb. 8.3, Tab. 8.3). Alle vier Defizienzen erzielten bei Einkreuzung sowohl eine Modifikation des Augenphänotyps als auch eine Abschwächung der Kutikula-Veränderungen beider *crumbs*-Mutanten.. Nach Angaben der Flybase-Datenbank deletieren diese Defizienzen unter anderem das Gen *engrailed*. Zusätzliche Tests mit einem amorphen, EMS-induzierten *engrailed*-Allel zeigten jedoch weder eine Veränderung des Augenphänotyps noch eine Abschwächung des gestörten Kutikula-Phänotyps.

Da auch weitere Versuche mit P-Element-induzierten Mutationen negativ ausfielen, wurde die genauere Kartierung des Bereichs zugunsten anderer Regionen zurückgestellt.

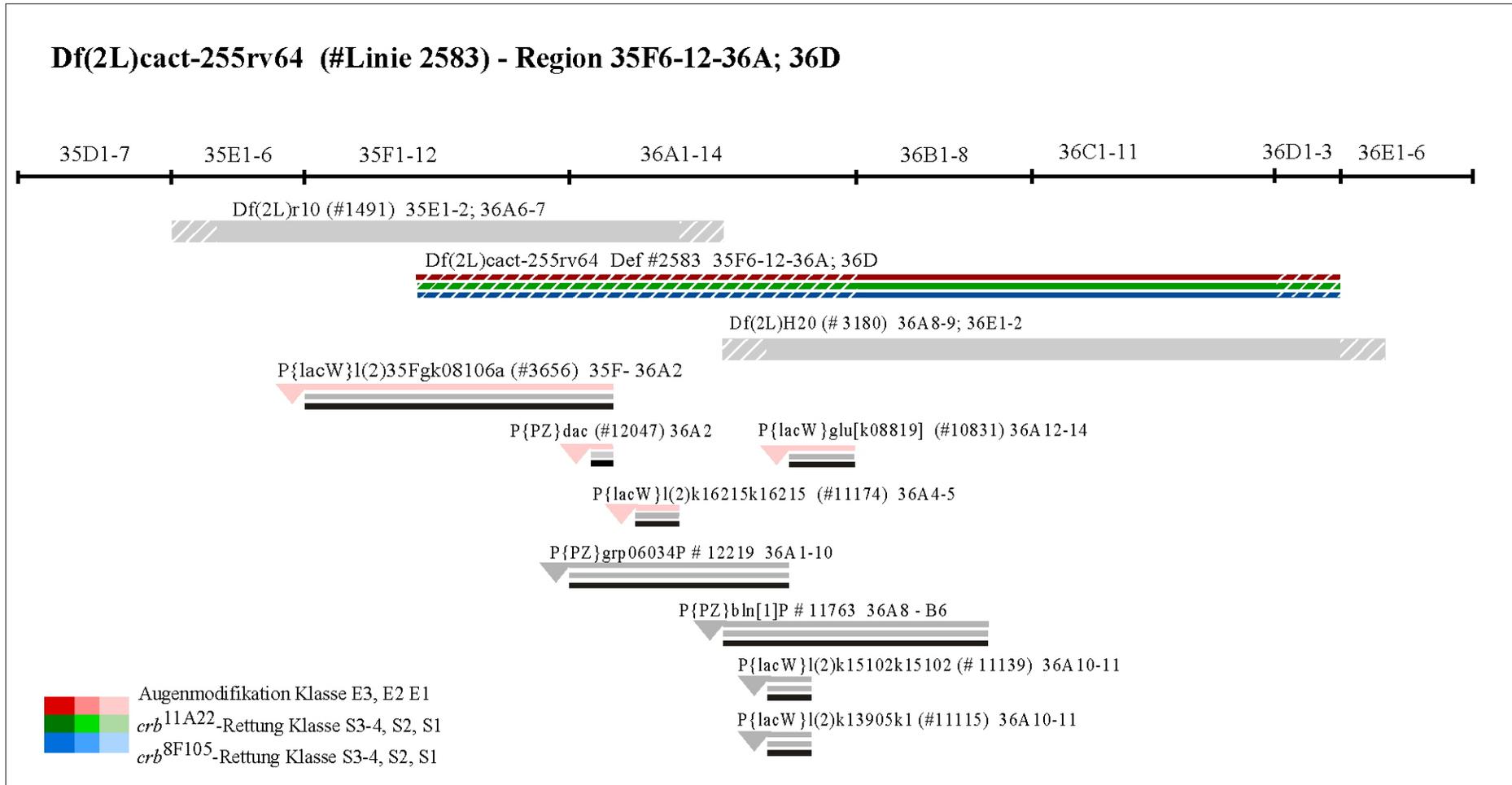


Abb. 8.3: Nähere Kartierung von Defizienz Df(2L)cact-255rv64 (#2583) Region 35F-36A;36D

Defizienzen Df(2L)r10 (#1491), Df(2L)cact-255rv64 (#2583) und Df(2L)H20 (#3180) wurden im ursprünglichen Screen getestet. #1491 und #3180 zeigten keine Modifikation und wurden nicht weiter untersucht. In den anderen Defizienzen wird eine Modifizierung des rauhen Augenphänotyps unterschiedlicher Stärke durch einen rot/rosafarbenen Balken gekennzeichnet, grün und blau kennzeichnet eine Rettung des mutanten Phänotyps der beiden *crumbs*-Allele *crb*^{11A22} und *crb*^{8F105}. In grau gekennzeichnete Balken stehen für fehlende Modifikation oder Rettung, schwarze Balken dafür, dass der entsprechende Versuch nicht durchgeführt wurde und eine Schraffur der Balkenenden kennzeichnet die Region, in der der Bruchpunkt nicht genau kartiert worden ist. Da die genauen Insertionsorte der getesteten P-Elemente meist nicht bekannt waren werden auch für die P-Elemente Regionen angegeben, in denen sie an einer bestimmten Stelle inseriert sind. Details zur Kartierung siehe Text.

Chr.	Linie Nr.	Region	Kutikula-Phänotyp	X GMR-Gal4- crb ^{intra} 38.1.2b	X GMR- Gal4- ΔERLI	X <i>crb</i> ^{11a22} (Kutikula)	X <i>crb</i> ^{8F105} (Kutikula)	X <i>sdt</i> ^{XD96} (Kutikula)	X <i>sdt</i> ^{XN05} (Kutikula)	X <i>baz</i> ^{XI106} (Kutikula)
II	# 190 Df(2R)en-A	47D3; 48B2	nur ventral, Zähnen-rasen	Enhancer E 2	E 0	Suppressor 1	Suppressor 2-3	S 0	S 0-1	S 0
	Def # 1142 Df(2R)en-B	47E3; 48A4	= 190	Enhancer 1-2	E 0	Suppressor 1	Suppressor 2	-----	-----	-----
	Def # 1143 Df(2R)en28	48A1-2; 48B- C1	Zähnen- rasen (en)	Enhancer 2-3	E 0	Suppressor 1	Suppressor 2-3	-----	-----	-----
	Def # 1145 Df(2R)en30	48A3-4; 48C6- 8	-----	E 0	E 0	S 0	S 0	-----	-----	-----
	Def # 2216 Df(2R)en ^E , inv ^E	47F15; 48A1	Zähnen- rasen (en)	Enhancer 4-5	E 0	Suppressor 2-3	Suppressor 3	-----	-----	-----
	Def # 3373 Df(2R)en-SFX31	48A1; 48B5	Mix	Enhancer 2-3	E 0	Mix, S0 + Suppr. 2-3	Mix, S0 + Suppr. 2-3	-----	-----	-----
	P – 10604 P{lacW}Fpps ^{k06103}	47E5 - F1-2	-----	E 0	E 0	-----	-----	-----	-----	-----
	P – 10532 P{lacW}v(2) k03514	47F1-2	-----	E 0	E 0	-----	-----	-----	-----	-----
	P – 11222 P{lacW}Tapdelta ^k 17005	47F4-9	-----	E 0	E 0	-----	-----	-----	-----	-----
	P – 10631 P{lacW}oho48A ^{k0} 6524	48B1-2	-----	E 0	E 0	-----	-----	-----	-----	-----
	P – 4400 P{lacW}rack ^{k5001}	48A	-----	E 0	E 0	-----	-----	-----	-----	-----
	P – 5801 P{en-lacZ} enXho25	48A1-2	-----	E 0	E 0	-----	-----	-----	-----	-----
	P – 11133 P{lacW}l(2)k1470 8[k14708]	48A3-5	-----	E 0	E 0	S 0	S 0	-----	-----	-----

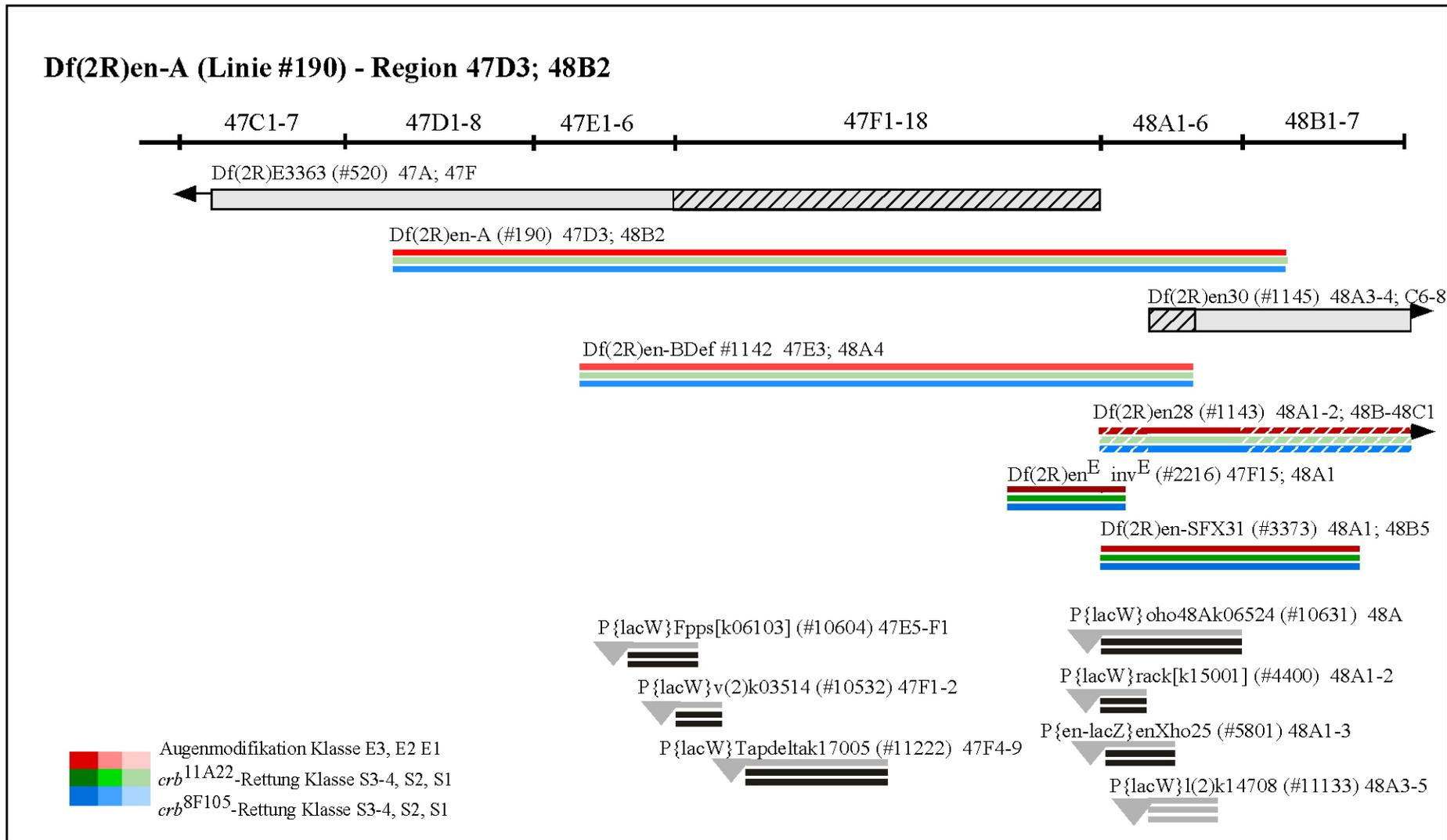


Abb. 8.4: Nähere Kartierung von Defizienz Df(2r)en-A (#190) (47D3; 48B2)

Defizienz Df(2R)en-A (#190), Df(2R)E3363 (#520) und Df(2R)en30 (#1145) wurden im ursprünglichen Screen gefunden. Df(2R)E3363 und Df(2R)en30 zeigen selbst keine Modifikation des rauhen Augenphänotyps und wurden daher nicht weiter untersucht. Mit ihrer Hilfe ist es allerdings möglich, die gesuchte, modifizierende Region auf 47F; 48A4 einzuschränken. In den weiteren untersuchten Defizienzen wird eine Modifizierung des rauhen Augenphänotyps unterschiedlicher Stärke durch einen rot/rosafarbenen Balken gekennzeichnet, grün und blau kennzeichnet eine Rettung des mutanten Phänotyps der beiden *crb*-Allele *crb*^{11A22} und *crb*^{8F105}. Grau gekennzeichnete Balken stehen für fehlende Modifikation oder Rettung, schwarze Balken dafür, dass der entsprechende Versuch nicht durchgeführt wurde, und eine Schraffierung der Balkenenden kennzeichnet eine Region, in der der Bruchpunkt nicht genau kartiert worden ist. Details zur Kartierung siehe Text.

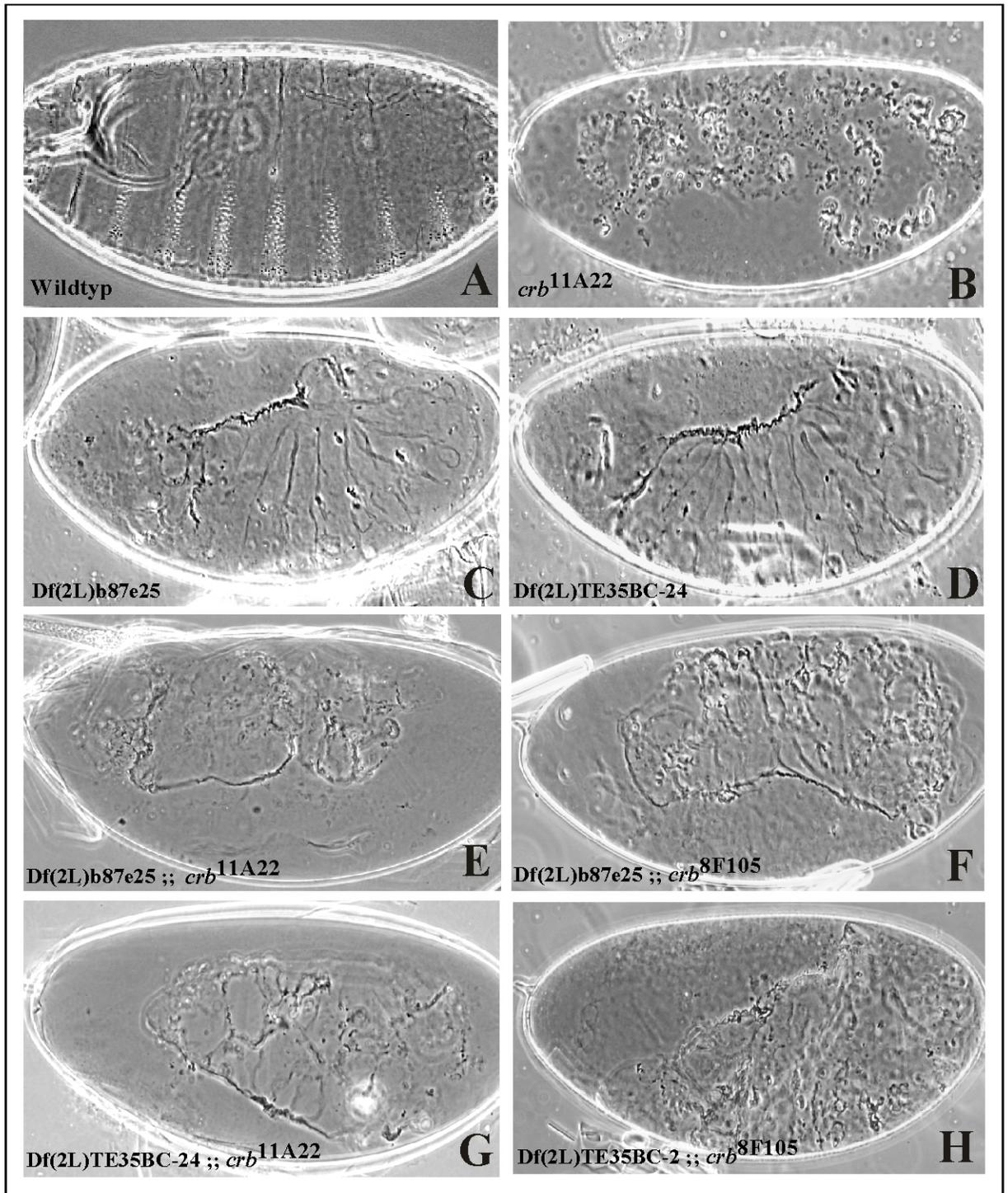


Abb. 8.5: Abschwächung des mutanten Phänotyps von crb^{11A22} und crb^{8F105} durch Kreuzung mit Defizienz $Df(2L)b87e25$ und $Df(2L)TE35BC-24$

(A) Wildtyp (B) Kutikula des mutanten *crumbs*-Allels crb^{11A22} .

(C) Homozygote Embryonen der Defizienzen $Df(2L)b87e25$ und $Df(2L)TE35BC-24$ weisen beide dorsale Schlussdefekte sowie einen Verlust des Kopfskeletts auf.

(E-H) Abschwächung des mutanten Phänotyps der Allele crb^{11A22} und crb^{8F105} durch Kreuzung mit Defizienz $Df(2L)b87e25$ und $Df(2L)TE35BC-24$. Details siehe Text und Tabelle 8.3

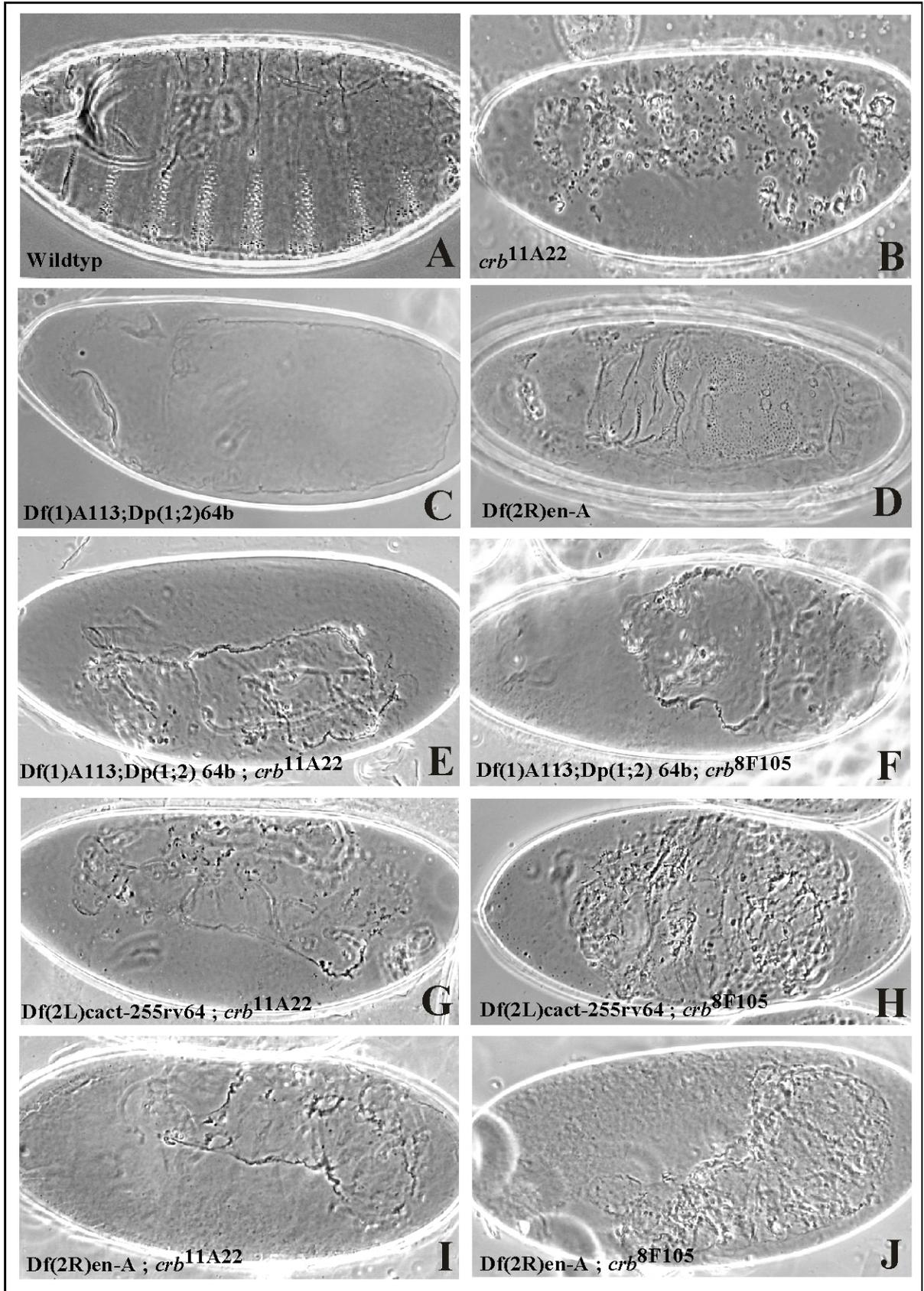


Abb. 8.5: Kutikulaphänotyp und Abschwächung des mutanten Phänotyps von *crb11A22* und *crb8F105* durch Kreuzung mit Defizienz *Df(1)A113;Dp(1;2)64b*, *Df(2L)cact-255rv64*, *Df(2R)en-A*

(A) Wildtyp (B) Kutikula des mutanten *crumbs*-Allels *crb11A22*.

(C) Homozygote Embryonen der Defizienzen *Df(1)A113;Dp(1;2)64b* weist eine vollkommen undifferenzierte Kutikula auf sowie einen Verlust des Kopfskeletts auf. (D) (ventrale Ansicht) *Df(2R)en-A* weist einen ventralen Kutikulaschild auf, der von einem regelmässigen Zähnchenrasen überzogen wird.

Df(2L)cact-255rv64 weist keinen vom wildtyp abweichenden Kutikulaphänotyp auf, daher ist kein Bild aufgeführt. (E-H) Abschwächung des mutanten Phänotyps der Allele *crb^{11A22}* und *crb^{8F105}* durch Kreuzung mit Defizienz *Df(1)A113;Dp(1;2)64b* und *Df(2L)cact-255rv64* und *Df(2R)en-A*. Details siehe Text und Tabelle 8.4.

8.3 Defizienzenkollection

In der folgenden Tabelle sind die für den Modifier-Screen verwendeten Defizienzen, ihre Bestellnummer sowie ihre Bruchpunkte aufgelistet. Die Informationen entstammen der Bloomington-Homepage (<http://flystocks.bio.indiana.edu/>).

Nr.	Genotyp	Bruchpunkte
1057	<i>Df(1)259, C(1;Y)6, w[1]/C(1)RM, y[1] v[1] f[1]; Dp(1;4)174/+</i>	001A01-04;001A08-B01
1329	<i>Df(1)BA1, w[*]/FM7a; Dp(1;2)E1, y[+]/+</i>	001A01;002A
1546	<i>T(1;3)sc[J4], sc[J4]/C(1)DX, y[1] f[1]; Dp(1;f)z9 ! = Df(1)sc-J4</i>	001B02-14;003A03 (Df in T(1;3))
1098	<i>Df(1)AD11, w[*]/FM7c</i>	001B;002A
936	<i>Df(1)64c18, g[1] sd[1]/Dp(1;2;Y)w[+]/C(1)DX, y[1] w[1] f[1]</i>	002E01-02;003C02
935	<i>Df(1)JC19/FM7c</i>	002F06;003C05
1517	<i>Df(1)62g18, y[1]/Dp(1;2;Y)w[+] & C(1)DX, y[1] f[1]/Dp(1;2;Y)w[+]</i>	003A01-02;003A04-05
721	<i>Df(1)65j26, y[1]/Dp(1;2;Y)w[+]/C(1)DX, y[1] f[1]</i>	003A03;003A04-06
733	<i>Df(1)w258-42, y[1]/FM1, lz[+]</i>	003A04-06;003C05-06
735	<i>Df(1)w258-48, y[1] sc[5] N[spl-1]/C(1)DX, y[1] f[1]; Dp(1;3)w[vco]/+ ! see comment</i>	003A09-B01;003C02-03
734	<i>Df(1)w258-45, y[1]/FM4</i>	003B02-03;003C02-03
902	<i>Df(1)w258-45, y[2] sn[3]/C(1)DX, y[1] w[1] f[1]; Dp(1;3)w[+]67k/+</i>	003B02-03;003C02-03
729	<i>Df(1)N-8/FM7c</i>	003C02-03;003E03-04
91	<i>Df(1)rst2/FM1, lz[+]</i>	003C03-04;003C6-7
731	<i>Df(1)N-264-105/FM1, lz[+]</i>	003C06-7;003D02-03
939	<i>Df(1)dm75e19/FM7c</i>	003C11-003E04
1877	<i>Df(1)GA102/FM7c</i>	003D04-05;003F07-08
940	<i>Df(1)A113/C(1)DX, y[1] w[1] f[1]; Dp(1;2)w[+]64b/+</i>	003D06-E01;004F05
941	<i>Df(1)HC244/FM7c</i>	003E08;004F11-12
1494	<i>Df(1)cho2, y[1] w[a]/FM7c</i>	003E;004A

Nr.	Genotyp	Bruchpunkte
3372	Df(1)Sp(rb), y[1?]/FM1	003F03-004B06;004C06-005A04
3200	Df(1)bi-DL1, y[59b] z[1] w[i] ct[6] f[1]/FM7c	004A03-05;004C05-D01
944	Df(1)JC70/FM7c, sn[+]	004C15-16;005A01-02
945	Df(1)C149/FM6	005A08-09;005C05-06
946	Df(1)N73/FM6	005C02;005D05-06
5281	Df(1)dx81, w[*]/Dp(1;Y)dx[+]1/C(1)M5	005C03-10;006C03-12
3196	Df(1)Sx1-bt, y[1]/Binsinscy	006E02;007A06
948	Df(1)ct-J4, In(1)dl-49, f[1]/C(1)DX, y[1] w[1] f[1]; Dp(1;3)sn[13a1]/Ki[1]	007A02-03;007C01
3221	Df(1)ct4b1, y[1]/Binsn	007B02-04;007C03-04
2984	Df(1)C128/C(1)DX, y[1] f[1]; Dp(1;2)sn[+]72d/Dp(?;2)bw[D], bw[D]	007D01;007D05-06
949	Df(1)C128/FM6	007D01;007D05-06
2476	Df(1)RA2/C(1)DX, y[1] w[1] f[1]; Dp(1;2)sn[+]72d/Dp(?;2)bw[D], bw[D]	007D10;008A04-05
950	Df(1)RA2/FM7c	007D10;008A04-05
951	Df(1)KA14/FM7c	007F01-02;008C06
3651	Df(1)lz-90b24, y[2] w[a]/FM7c	008B05-06;008D08-09 or 008D01-02;008E01-02
952	Df(1)C52, flw[C52]/FM6	008E;009C-D
954	Df(1)v-L15/FM6	009B01-02;010A01-02
953	Df(1)N110/FM6	009B03-04;009D01-02
955	Df(1)HC133/FM7c	009B09-10;009E-F
1952	Df(1)v-L11/FM0	009C04;010A01-02
3560	Df(1)v-N48, f[*]/Dp(1;Y)B[S-]v[+]y[+]/C(1)DX, y[1] f[1]	009F;010C03-05
956	Df(1)RA37/FM7c	010A07;010B17
957	Df(1)KA7/C(1)DX, y[1] w[1] f[1]; Dp(1;2)v[+]65b/+	010A09;010F06-07
3559	Df(1)GA112/Dp(1;Y)B[S-]v[+]y[+]/FM7a	010B01-02;010C01-02
3558	Df(1)HM456, ptg[1]/Dp(1;Y)B[S-]v[+]y[+]/FM7a	010B;010D
959	Df(1)HA85/FM7c	010C01-02;011A01-02
728	Df(1)m259-4, m[259-4]/FM4	010C02-03;010E01-02
905	Df(1)m259-4, ras[1] m[259-4] f[1]/Dp(1;Y)y[+]v[+]#3/C(1)DX, y[1]w[1] f[1]	010C02-03;010E01-02
961	Df(1)RA47/FM7c	010F01;010F09-10
962	Df(1)N105/FM6	010F07;011D01
963	Df(1)KA10, sn[3] m[1]/FM7c	011A01;011A07-08
964	Df(1)JA26/FM7c	011A01;011D-E
965	Df(1)HF368, nbA[HF368]/FM7c	011A02;011B09
967	Df(1)C246/FM6	011D-E;012A01-02
966	Df(1)N12, ras[1] v[1]/FM6	011D01-02;011F01-02
968	Df(1)HA92/FM7c	012A06-07;012D03
727	Df(1)g, f[1] B[1]/In(1)AM	012A;012E or 011F10;012F01
998	Df(1)RK2/FM7a	012D02-E01;013A02-05
1039	Df(1)RK4/FM7c/Dp(1;Y)y[+], y[1]	012F05-06;013A09-B01
3347	Df(1)sd72b/FM7a	013F01;014B01

Nr.	Genotyp	Bruchpunkte
993	Df(1)r-D1, v[1] f[1]/C(1)DX, y[1] w[1] f[1]; Dp(1;4)r[+]*/+	014C02-04;015B02-C01
4741	Df(1)B25, Sh[14]/FM6	015D03;016A04-06
723	Df(1)B, B[263-20]/In(1)sc[7], In(1)AM, sc[7] ptg[4]	016A02;016A06
4953	Df(1)BK10, r[*] f[1]/Dp(1;Y)W73/C(1)DX	016A02;16C07-10, 015C01-D06;016F;Yh1-h25
970	Df(1)N19/FM6	017A01;018A02
971	Df(1)JA27/FM7c	018A05;018D
972	Df(1)HF396/FM7c	018E01-02;020
977	Df(1)DCB1-35b/FM6/Dp(1;Y)y[+]mal[106], mal[106]	019F01-02;020E-F
3714	Df(1)A209/FM7a	020A;020F
3638	Df(2L)net-PMF/SM6a	021A01;021B07-08
3548	Df(2L)al/In(2L)Cy, Cy[1]	021B08-C01;021C08-D01
3084	Df(2L)ast2/SM1 (rauh)	021D01-02;022B02-03
3133	Df(2L)dp-79b, dp[DA], cn[1]/In(2LR)bw[V1], ds[33k] b[1] bw[V1] ! does not delete dp	022A02-03;022D05-E01
90	Df(2L)C144, dpp[d-ho] ed[1]/In(2LR)Gla, Gla[1] Bc[1] Egfr[E1]	023A01-02;023C03-05
97	Df(2L)JS32, dpp[d-ho]/SM6a	023C03-05;023D01-02
3573	In(2LR)DTD16[L]DTD42[R], bw[1] sp[1]/CyO! = Df(2L)23C;23E3-6	023C;023E03-06
4954	Df(2L)S2590/CyO, P{ry[+t7.2]=sevRas1.V12} FK1 (rauh)	023D02;023E3
712	Df(2L)ed1, al[1] b[1]/SM5	024A03-04;024D03-04
693	Df(2L)sc19-8/SM6b; Dp(2;1)B19, y[1], ed[1] dp[o2] cl[1] (rauh)	024C02-08;025C08-09
3813	Df(2L)sc19-4/In(2L)Cy[L]t[R] In(2R)Cy, Cy[1] Roi[1] cn[2] sp[2] (or[*]); Dp(2;1)B19, y[1] ac[1] sc[1] pn[1] ed[1] dp[o2] cl[1] (rauh)	025A05;025E05
781	Df(2L)cl-h3/SM6b	025D02-04;026B02-05
490	In(1)w[m4]; Df(2L)E110/CyO	025F03-026A01;026D03-11
3571	Df(2L)Dwee-delta5/Dp(2;?)bw[D], S[1] wg[Sp-1] Ms(2)M[1] bw[D]/CyO	027A;028A
1357	Df(2L)J-H/SM5	027C02-09;028B03-04
3077	Df(2L)spd, al[1] dp[ov1]/CyO	027D-E;028C
4955	Df(2L)XE-2750/CyO, P{ry[+t7.2]=sevRas1.V12} FK1	028B02;028D03
140	Df(1)w67c23, y[1]; Df(2L)Trf-C6R31/CyO	028DE (within)
179	In(1)w[m4h], y[1]; Df(2L)TE29Aa-11/CyO	028E04-07;029B02-C01
2892	Df(2L)N22-14/CyO	029C01-02;030C08-09
556	w[*]; Df(2L)s1402, P{w[+mC]=lacW}s1402/CyO	030C01-02;030F
1045	Df(2L)Mdh, cn[1]/Dp(2;2)Mdh3, cn[1] ! see comment	030D-30F;031F
1469	Df(2L)J39/In(2L)Cy; Dp(2;Y)cb50, Dp(1;Y) B[S] Yy[+]/C(1)RM	031C-D;032D-E
3079	Df(2L)Prl, Prl[1] nub[Prl]/CyO	032F01-03;033F01-02
3344	Df(2L)prd1.7, b[1] Adh[n2] pr[1] cn[1] sca[1]/CyO, P{ry[+*]=elav-lacZ.H} YH2	033B02-03;034A01-02
3138	Df(2L)b87e25/CyO	034B12-C01;035B10-C01
3588	Df(2L)TE35BC-24, b[1] pr[1] pk[1] cn[1] sp[1]/CyO	035B04-06;035F01-07

Nr.	Genotyp	Bruchpunkte
1491	Df(2L)r10, cn[1]/CyO	035E01-02;036A06-07
2583	Df(2L)cact-255rv64, cact[chif64]/CyO; ry[506]	035F-036A;036D
3180	Df(2L)H20, b[1] pr[1] cn[1] sca[1]/CyO	036A08-09;036E01-02
420	Df(2L)TW137, cn[1] bw[1]/CyO, Dp(2;2) M(2)m[+] (schwach rauh)	036C02-04;037B09-C01
3189	Df(2L)TW50, cn[1]/CyO, Dp(2;2)M(2)m[+]	036E04-F01;038A06-07
167	Df(2L)TW161, cn[1] bw[1]/CyO	038A06-B01;040A04-B01
4959	Df(2L)C'/CyO	040h35;040h38L
749	In(2R)bw[VDe2L]Cy[R]/In(2LR)Gla, Gla[1]	041A-B;042A02-03
739	Df(2R)M41A4/SM1	041A
1006	Df(2R)nap9	
1007	Df(2R)nap9/In(2LR)Gla, Dp(2;2)BG, Gla[1]	042A01-02;042E06-F01
1888	Df(2R)ST1, Adh[n5] pr[1] cn[*]/CyO	042B03-05;043E15-18
1930	Df(2R)pk78s/CyO	042C01-07;043F05-08 or 042B;042C max or 42F;43F+
3368	Df(2R)cn9/Roi[1] sp[*]	042E;044C
198	w[118]; Df(2R)H3C1/CyO	043F;044D03-08
201	w[118]; Df(2R)H3E1/CyO	044D01-04;044F12
3591	w[1]; Df(2R)Np5, In(2LR)w45-32n, cn[1]/CyO	044F10;045D09-E01
4966	w[1]; Df(2R)w45-30n cn[1]/CyO	045A06-07;045E02-03
1743	w[1118]; Df(2R)B5, px[1] sp[1]/CyO, Adh[nB]	046A;046C
1719		
1702	Df(2R)X1, Mef2[X1]/CyO, Adh[nB]	046C;047A01
596	Df(2R)stan2, b[1] pr[1] P{ry[+t7.2]=neoFRT} 42D /CyO	046F01-02;047D01-02
520	Df(2R)E3363/CyO, P{ry[+t7.2]=sevRas1.V12} FK1 (stark rauh)	047A;047F
190	Df(2R)en-A/CyO	047D03;048B02
1145	Df(2R)en30/SM5; Dp(1;Ybb[-])B[S]	048A03-04;048C06-08
4960	Df(2R)CB21/CyO; ry[506]	048E;049A
1642	Df(2R)vg135, nompA[vg135]/CyO, S[*]bw[1]	049A-B;049D-E
754	Df(2R)vg-C/SM5	049A04-13;049E07-F01
442	Df(2R)CX1, b[1] pr[1]/SM1	049C01-04;050C23-D02
1896	Df(2R)trix/CyO?	051A01-02;051B06
1150	w[1]/Dp(1;Y)y[+]; Df(2R)knSA3, Tp(1;2) TE21F22A/CyO	051B05-11;051F05-13
3518	w[a] N[fa-g]; Df(2R)Jp1/CyO	051C03;052F05-09
3520	w[a] N[fa-g]; Df(2R)Jp8, w[+]/CyO	052F05-09;052F10-53A01
3064	Df(2R)Pcl7B/CyO	054E08-F01;055B09-C01
3120		
1547	Df(2R)PC4/CyO	055A;055F
757	y[*] w[*]/Dp(1;Y)y[+]; Df(2R)P34/CyO	055E02-04;056C01-11
543	Df(2R)017/SM1	056F05;056F015
3467	Df(2R)AA21, c[1] px[1] sp[1]/SM1	056F09-17;057D11-12
2606	Df(2R)Pu-D17, cn[1] bw[1] sp[1]/SM1	057B04;058B
283	Dp(1;Y)y[+]/y[1]; Df(2R)X58-7, pr[1] cn[1]/CyO, bw[1]	058A01-02;058E04-10 or 058B01-02;058E01-04
282	Dp(1;Y)y[+]/y[1]; Df(2R)X58-12/SM5	058D01-02;059A
3909	w[*]; Df(2R)59AD/SM1	059A01-03;059D01-04
1682	Df(2R)or-BR6, cn[1] bw[1] sp[1]/In(2LR)lt[G16L]bw[V32gR]	059D05-10;060B03-08
1587	Df(2R)bw[VDe2L]Px[KR]/SM1	059D06-E01;060C-D

Nr.	Genotyp	Bruchpunkte
4542	y[1] w[*]; Df(2R)Chi[g230], Chi[g230], P{w[+mF] ry[+t7.2]=wF}4-1/CyO, Ts(Y;2Lt)B80, Kr[-] y[+]	060A03-07;060B04-07
2604	Df(2R)Px2/SM5	060C05-06;060D09-10
2471	Df(2R)M60E/In(2LR)bw[V32g], bw[V32g]	060E02-03;060E11-12
3157	Df(2R)ES1, b[1] pr[1] cn[1] wx[wxt] Kr[If-1]/SM1	060E06-08;060F01-02
4961	Df(2R)Kr10/CyO	060F01;060F05
Ade-2-2 X58- SM	Zur Verfügung gestellt von C. Klämbt, keine näheren Angaben vorhanden	
1479	Df(3L)Ar11, red[1]/TM2, p[p]	061C03-04;061E
439	Df(3L)Ar14-8, red[1]/TM2, p[p]	061C05-08;062A08
1478	Df(3L)Ar12-1, red[1]/TM2, p[p]	061C;061F
4214	Df(3L)ru-22, mwh[1] red[1] e[4]/DcxF	062A01;062A02-03
X1	Def (3L) Aprt-133 /TM2 Ubx	062A02-B01;062C02-D01
X2	Def (3L) Aprt-148 /TM2 Ubx	062A07-B01;062E06-F01
X3	Def (3L) Aprt-100 /TM2 Ubx	062A10-B01;062C02-D01
2399	Df(3L)R-G5, ve[1]/TM6	062A10-B01;062C04-D01
600	Df(3L)Aprt-1, ru[1] h[1]/TM3, Sb[1] Ser[1]	062A10-B01;062D02-05
X4	Def (3L) Aprt-32 /TM2	062B01;062E03
X5	Def (3L) Aprt-12 /TM2	062B02-04;062C02-D01
57	Df(3L)R/TM6C, cu[1] Sb[1] Tb[1]	062B07;062B12
2400	Df(3L)R-G7, ve[1]/TM6B, Tb[+]	062B08-09;062F02-05
X6	Def (3L) Aprt-53 /TM2	062B08-10;062B11-C01
3650	Df(3L)M21, kni[ri-1] p[p]/In(3LR)T33[L]f19[R]	062F;063D
3647	Df(3L)HR370/In(3LR)T33[L]f19[R]	063A01;063D01
49	Df(3L)HR218, Dp(3;3)pdp7, ca[1]/TM6B, Tb[1], ca[1]	063A02-07;063B09-10
3648	Df(3L)HR232/TM6B, Tb[1]	063C01;063D02
3649	Df(3L)HR119/TM6B, Tb[1]	063C02;063F07
3687	w[1118]; Df(3L)GN50/TM8, l(3)DTS4[1]	063E01-02;064B17
463	w[1118]; Df(3L)GN34/TM3, ry[*] su(Hw)[2] Sb[1]	063E06-09;064A08-09
416	w[1118]; Df(3L)GN19/TM3, ry[*] su(Hw)[2] Sb[1]	063F04-07;064B09-11
X7	Df(3L) C175/TM3 Sb	064A03;064A06
3686	Df(3L)GN24/TM8, l(3)DTS4[1]	063F04-07;064C13-15
3096	Df(3L)ZN47, ry[506]/TM3, Sb[1]	064C;065C
4393	w[*]; Df(3L)XDI98, e[1]/TM6B, Tb[1]	065A02;065E01
X10	Df(3L)W5.4	065A; 065E
1420	Df(3L)pbl-X1/TM6B, Tb[1]	065F03;066B10
1520	w[*]; Df(3L)pbl-NR/TM3, Sb[1]	066B01;066B02
1541	y[1] w[1] N[spl-1]; Df(3L)66C-G28/TM3, Sb[1]	066B08-09;066C09-10
209	w[*]; Df(3L)66C-I65/TM3, Sb[1]	066C07-10;066C07-10
3024	Df(3L)h-i22, h[i22] Ki[1] roe[1] p[p]/TM3, Ser[1]	066D10-11;066E01-02
1688	Df(3L)Rdl-2, e[1]/TM3, Sb[1]	066F05;066F05
2479	Df(3L)29A6, kni[ri-1] p[p]/TM3, Sb[1]	066F05;067B01
997	Df(3L)AC1, roe[1] p[p]/TM3, Sb[1]	067A02;067D07-13 or 067A05;067D09-13
89	y[1?]; Df(3L)lxd6/TM3, Sb[1] Ser[1]	067E01-02;068C01-02
2547	Df(3L)vin2, ru[1] h[1] gl[2] e[4] ca[1]/TM3, Sb[1]	067F02-03;068D06
2611 A/B	Df(3L)vin5, ru[1] h[1] gl[2] e[4] ca[1]/TM3, Sb[1] Ser[1]	068A02-03;069A01-03
2610	Df(3L)vin4, ru[1] h[1] gl[2] e[4] ca[1]/TM3, ry[*] Sb[1] Ser[1]	068B01-03;068F03-06

Kit-Nr.	Genotyp	Bruchpunkte
2609	Df(3L)vin3, ru[1] h[1] gl[2] e[4] ca[1]/TM3, ry[*] Sb[1] Ser[1]	068C05-06;068E03-04
2553	Df(3L)vin6, ru[1] h[1] gl[2] e[4] ca[1]/TM3, Sb[1] Ser[1]	068C08-11;069A04-05
2612	Df(3L)vin7, ru[1] h[1] gl[2] e[4] ca[1]/TM3, Sb[1] Ser[1]	068C08-11;069B04-05
2991	Df(3L)BK9, ru[1] red[1] cv-c[1] Sb[sbd-1] sr[1] e[1]/TM3, Sb[1]	068E;069A01
4507	Df(3L)iro-2, Sb[sbd-2]/TM3, Sb[1]	069B01-05;069D01-06
3343	Df(3L)Ly, mwh[1] Ly[1]/TM1, jv[*]	070A02-03;070A05-06
3124	Df(3L)fz-GF3b, P{w[+tAR] ry[+t7.2AR]=wA[R]}66E/TM6B, Tb[1]	070C01-02;070D04-05
3125	Df(3L)fz-GS1a, P{w[+tAR] ry[+t7.2AR]=wA[R]}66E/TM3, Sb[1]	070C06-15;070E04-05
3123	Df(3L)fz-D21, th[1] st[1]/TM6B, Tb[1]	070D01-02;070E07
3126	Df(3L)fz-M21, th[1] st[1]/TM6	070D02-03;071E04-05
2992	Df(3L)BK10, ru[1] Ly[1] red[1] cv-c[1] Sb[sbd-1] sr[1] e[1]/TM3, Sb[1]	071C;071F
3640	Df(3L)brm11/TM6C, cu[1] Sb[1] ca[1]	071F01-04;072D01-10
3641	Df(3L)th102, h[1] kni[ri-1] e[s]/TM6C, cu[1] Sb[1] ca[1]	071F03-05;072D12
2993	Df(3L)st-f13, Ki[1] roe[1] p[p]/TM6B, Tb[1]	072C01-D01;073A03-04
3201	Df(3L)st-g24, Ki[1] roe[1] p[p]/TM6B, Tb[1]	072D01-02;073A09-10
3342	Df(3L)th117, h[1] kni[ri-1] e[s]/TM1	072D01-05
197	Df(3L)st-b11, Ki[1] roe[1] p[p]/TM6B, Tb[1]	072D10-11;073D01-02
2424	Df(3L)st-g18, Ki[1] roe[1] p[p]/Dp(3;3)st[+]g18, Ki[1] roe[1] p[p]	072E01-02;074F04-075A01
2995	Df(3L)st8P, In(3L)P, ry[*]/TM6B, Tb[1]	072E04;073B04
2997	Df(3L)st7P, In(3L)P/TM3, Ser[1]	073A01;073A07
2998	Df(3L)81k19/TM6B, Tb[1]	073A03;074F
2608	Df(3L)W10, ru[1] h[1] Sb[sbd-2]/TM6B, Tb[1]	075A06-07;075C01-02
2990	Df(3L)Cat, kni[ri-1] Sb[sbd-1] e[*]/TM3	075B08;075F01
2607	Df(3L)W4, ru[1] h[1] e[1] ca[1]/TM6B, Tb[1]	075B10;075C01-02
1576	Df(3L)H99, kni[ri-1] p[p]/TM3, Sb[1]	075C01-02 (within)
3000	Df(3L)VW3/TM3, Sb[1]	076A03;076B02
3617	Df(3L)kto2/TM6B, Tb[1]	076B01-02;076D05
2052	Df(3L)rdgC-co2, th[1] st[1] in[1] kni[ri-1] p[p]/TM6C, cu[1] Sb[1]	077A01;077D01
3127	Df(3L)ri-79c/TM3, Sb[1]	077B-C;077F-78A
4429	Df(3L)ME107, mwh[1] red[1] e[1]/TM1, red[*]	077F03;078C08-09
3627	Df(3L)31A/Dp(3;3)C126, st[1] cp[1] in[1] kni[ri-1] p[p]	078A;078E, 078D;079B
4430	Df(3L)Pc-2q, ry[506]/TM2	078C05-06;078E03-079A01
4370	Df(3L)Delta1AK, ru[1] h[1] ry[506] sr[1] e[s] ca[1]/TM3, ry[RK] Sb[1] Ser[1]	079F;080A
1518	Df(3R)ME15, mwh[1] red[1] e[4]/MKRS	081F03-06;082F05-07
3688	Dp(3;1)2-2, w[1118]/?; Df(3R)2-2/TM3, Sb[1]	081F;082F10-11
339	w[1118]; Df(3R)6-7/TM3, Sb[1]	082D03-08;082F03-06
1990	Df(3R)Tpl10, Tp(3;3)Dfd[rv1], kni[ri-1] Dfd[rv1] p[p] Doa[10]/TM3, Sb[1]	083C01-02;084B01-02
1984	Df(3R)Tpl6, Tp(3;3)Dfd[rv1], kni[ri-1] Dfd[rv1] p[p] Doa[10]/TM6B, Tb[1]	083D01-02;084A04-05

Nr.	Genotyp	Bruchpunkte
1884	Df(3R)Scr, p[p] e[s]/TM3, Sb[1]	084A01-02;084B01-02
3514	Df(3R)BD5, e[1] ca[1]/TM6B, Tb[1]	084A01-02;084B01-02
2013	Df(3R)Antp-X1, Ki[1] red[1] e[1]/TM3, Sb[1]	084A04-05;084C02-03
2182	Df(3R)CP1/TM6B, Tb[1]	084A05;084B01
3354	Df(3R)roe/TM3, Sb[1]	084A06-B01;084D04-D09
1842	Df(3R)Antp17/TM3, Sb[1]	084B01-02;084D11-12 or A06,D14
1941	Df(3R)Antp2, Antp[2] e[1]/TM3, Sb[1]	084B02;084D03
2009	Df(3R)Scx4, Scr[Wrv4] red[1] e[1]/TM3, Sb[1]	084B03;084D01-02
1862	Df(3R)dsx2M/TM2	084C01-03;084E01
1869	Df(3R)dsx29/CxD	084C08-D01;084F06-07
1897	Df(3R)D6, Ubx[1] e[4]/TM1	084D02-03;084F13-16
1898	Df(3R)D7, Ubx[1] e[4]/TM1	084D03-05;084F01-02
1933	Df(3R)D8, Ubx[1] e[4]/TM1	084D03-05;085A02-04
1876	Df(3R)dsx10M/TM2	084D03;084F01-02
1968	Df(3R)p712, red[1] e[1]/TM3, Sb[1]	084D04-06;085B06
1873	Df(3R)dsx37/TM2	084D08;085B03-05
1868	Df(3R)dsx27/TM2	084D09;085A01-03
1847	Df(3R)dsx2D, Sb[1] e[s]/TM2	084D11;084F16
3053	Df(3R)CA1/TM3, Sb[1] Ser[1]	084E12-13;085A06-11
1516	Df(3R)CA3/TM3, Sb[1]	084F02;085A05-07
1943	Df(3R)p13, red[1] e[1]/TM3, Sb[1]	084F02;085B01
1962	Df(3R)p-XT103, ru[1] st[1] e[1] ca[1]/TM3, Ser[1]	085A02;085C01-02
1965	Df(3R)p25, Df(3R)P2/CxD	085A03;085B01, 089D09- E01;089E02-03
1931	Df(3R)by10, red[1] e[1]/TM3, Sb[1]	085D08-12;085E07-F01
1932	Df(3R)by416, red[1] e[1]/TM3, Sb[1]	085D10-12;085E01-03
1893	Df(3R)by62, red[1] e[1]/TM1	085D11-14;085F16
1937	Df(3R)GB104, red[1]/TM3, Sb[1]	085D12;085E10
771	Df(3R)cu, Sb[1] e[*]/TM6	086C01-02;086D08
3128	Df(3R)M-Kx1/TM3, Sb[1] Ser[1]	086C01;087B01-05
1694	Df(3R)M86D, Ki[1] red[1] e[1]/TM6	086D01-02;086D04
1714	Df(3R)M86D, Dfd[1] p[p]/TM3, Ser[1]	086D01-02;086D04
54600	Df(3R)karD3	086C01; 087B01-05
3003	Df(3R)T-32, (kni[ri-1]) cu[1] sr[1] e[s]/MRS	086E02-04;087C06-07
59750	Df(3R)T45	
U-A	Df(3R)T55	086F01;087A06
U-B	Df(3R)T47	086F01;087A09
55800	Df(3R)E79	086F01;087B09
3005	Df(3R)T-10, kni[ri-1]cu[1]sr[1] e[s]/TM3,Sb[1]Ser[1]	086F01-02;087C06-07
3359	Df(3R)E229/TM3 (Sb[+], Ser[+]) ! see comment	086F06-07;087B01-02
58100	Df(3R)P21	
56300	Df(3R)karD2	
55860	Df(3R)E307	
56330	Df(3R)karH5	087A01;087A09
X11	Df(3R)P58	
54500	Df(3R)KarD1	087A08;087D01
56700	Df(3R)kar-sz12	
3007	Df(3R)ry615/TM3, Sb[1] Ser[1]	087B11-13;087E08-11
3358	Df(3R)ry85/MKRS; Dp(3;2)ry[+]	087B15-C01;087F15-88A01
699	Df(3R)ry81/MKRS	087C01-03;087D14-E02
1534	Tp(3;Y)ry506-85C/MKRS	087D01-02;088E05-06;Y

Nr.	Genotyp	Bruchpunkte
3808	Df(3R)ry75, kar[2]/MKRS	087D02;087D14-E01
1726	Df(3R)Cbx[TwtL]Ubx[KM5R]/TM1	087E-F;088B
3009	Df(3R)l26c, kar[1]/MKRS	087E01-02;087F11-12
1917	Df(3R)red3l/TM6B, Tb[1]	087F12-14;088C01-03
3341	Df(3R)red1/TM1	088B01;088D03-04
383	Df(3R)ea, kni[ri-1] p[p]/TM3, Ser[1]	088E07-13;089A01
756	Df(3R)sbd105, p[p] Ubx[bx-1] sr[1] e[s]/LVM	088F09-89A01;089B09-10
3524	y[1]; Df(3R)Po2, cv-c[1]/TM2; sv[spa-pol]	089A01-02;089A11-13
3678	Df(3R)sbd45, mwh[1] e[1?]/TM6	089B04;089B10
1467	Df(3R)P115, e[11]/TM1; Dp(3;1)P115/+ != Tp(3;1)P115	089B07-08;089E07-08;020
1705	y[1]; Df(3R)sbd26, e[1]/TM2	089B09-10;089C07-D01
3483	Df(3R)P10, abd-A[P10]/TM1	089C01-02;089E01-02
1452	R(3)S1, Df(3R)P47, ca[1]/In(3R)C, Sb[1] sprd[1] cd[1] Tb[1] ca[1]	089D;092A02-14
4431	Df(3R)DG2/TM2	089E01-F04;091B01-B02
3071	Df(3R)C4, p[*]/Dp(3;3)P5, Sb[1]	089E03-04;090A01-07
3010	Df(3R)P14, sr[1]/T(2;3)ap[Xa], ap[Xa]	090C02-D01;091A01-02
3011	Df(3R)Cha7/TM6B, Tb[1]	090F01-F04;091F05
3012	Df(3R)DI-BX12, ss[1] e[4] ro[1]/TM6B, Tb[1]	091F01-02;092D03-06
3340	Df(3R)e-R1, Ki[1]/TM3, Sb[1]	093B03-05;093D02-04
2425	Df(3R)e-N19/TM2	093B;094
3013	Df(3R)e-BS2, rsd[1]/TM3, Sb[1]	093C03-06;093F14-094A01
1605	Df(3R)5C1, ry[506]/TM3, Sb[1]	093E-F;094C-D
2252	Df(3R)hh, st[1] e[1]/In(3R)C, Sb[1] sprd[1] e[1] l(3)e[1]	093F11-14;094D10-13
2585	cn[1]; Df(3R)mbc-R1, ry[506]/TM3, Sb[1] ry[*]	095A05-07;095D06-11
4432	Df(3R)crb-F89-4, st[1] e[1]/TM3, Ser[1]	095D07-D11;095F15
2362	Df(3R)crb87-4, st[1] e[1]/TM3, Ser[1]	095E08-F01;095F15
2363	Df(3R)crb87-5, st[1] e[1]/TM3, Ser[1]	095F07;096A17-18
1972	Df(3R)XS, Dp(3R)XS, asp[1] ats[1] p[p]/TM6B, Tb[1]; y[1]/Dp(1;Y)y[+]	096A01-07;096A21-25
2366	Df(3R)XTA1, th[1] st[1] kni[ri-1] roe[1] p[1]/Dp(3;3)M95A[+]13, st[1] e[1]	096B;096D
1910	Df(3R)Tl-P, e[1] ca[1]/TM3, Ser[1]	097A;098A01-02
1909	Df(3R)Tl-X, mwh[1] th[1] st[1] kni[ri-1] roe[1] p[p] sr[1] e[1] ca[1]/TM3, Ser[1]	097B;097D01-02
823	Df(3R)D605/TM3, Sb[1] Ser[1]	097E03;098A05
430	w[1118]; Df(3R)3450/TM6B, Tb[1]	098E03;099A06-08
669	w[*]; Df(3R)Dr-rv1, ry[506]/TM3, ry[RK] Sb[1] Ser[1]	099A01-02;099B06-11
3547	Df(3R)L127/TM6; Dp(3;1)B152	099B05-06;099E04-F01
3546	Df(3R)B81, P{ry[+t7.2]=RP49}F2-80A e[1]/TM3, Sb[1]; Dp(3;1)67A	099C08;100F05
2352	Df(3R)X3F, P{ry[+t7.2]=RP49}A3-84F e[1]/TM3, Sb[1]	099D01-02;099E01
2234	Df(3R)R133, B[S]/TM3, Sb[1]; Dp(3;1)124P	099E;100F
2599	Df(3R)tll-g, ca[1]/TM6B, Tb[1]	099F01-02;100B04-05
2155	Df(3R)A113/In(3R)C, Sb[1] sprd[1] cd[1] Tb[1] ca[1]; Dp(3;1)34	100A;100F
3369	Df(3R)awd-KRB, ca[1]/TM3, Sb[1] Ser[1]	100C;100D
1011	bw[1]; Df(3R)faf-BP, st[1]/TM6B, Tb[1]	100D;100F05

Tab. 8.5: Die Bruchpunkte, Genotypen und Bestellnummern der Defizinezenkollektion aus Bloomington, welche für den Modifier-Screen verwendet wurde.

Tabellarischer Lebenslauf

Nicola Andrea Grzeschik

Max-Born Strasse 24

40591 Düsseldorf

Geburtsdatum	04. 01. 1973
Geburtsort	Münster (Westf.)
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1979 – 1983	Grundschule St. Michael, Münster/Gievenbeck
1983 – 1988	Gymnasium Paulinum, Münster
1988 – 1992	Gymnasium Philippinum, Marburg; Abitur: 27.05.1992

Hochschulstudium

10/1992-05/1998	Studium der Biologie an der Philipps-Universität, Marburg
11/1994	Vordiplom
1997/1998	Diplomarbeit am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg, „Molekulare und funktionelle Myogenese-relevante Charakterisierung des <i>inscuteable</i> ²² „loss of function“ Allels in <i>Drosophila melanogaster</i> “ Arbeitsgruppe Prof. Dr. Renkawitz-Pohl
06/1998	Diplom
10/1998	Start der Doktorarbeit am Institut für Genetik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Betreuung von Prof. Dr. Elisabeth Knust

Laborerfahrung/ Auslandsaufenthalt

Sommer 1995	zweieinhalb-monatiger Aufenthalt als Summer -Student am Hospital for Sick Children, Toronto (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Lap-Chee Tsui)
01/1995 – 06/1996	Arbeit als studentische Hilfskraft am Institut für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg, Forschungsprojekt EUROGEM
WS 1997/1998	Arbeit als studentische Hilfskraft am Fachbereich Biologie, Praktikumsbetreuung

Marburg, den 01.04.03

.....
(Nicola Andrea Grzeschik)

Danksagung

Diese Arbeit ist am Institut für Genetik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Anleitung von Prof. Dr. Elisabeth Knust angefertigt worden.

Ihr möchte ich für die Unterstützung und die Überlassung des Themas danken sowie die kontinuierliche Bereitschaft zu Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Hegemann danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich während dieser Arbeit immer unterstützt hat und ohne die mein Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Insbesondere gilt er meiner Mutter für die langen Telefonate während des Zusammenschreibens, die wohl sicherzustellen sollten, dass ich noch lebe, meiner Schwester Ricarda für das unermüdliche Korrekturlesen und ganz besonders meinem Vater, der sich mit mir beim Korrigieren so einige Nächte um die Ohren geschlagen hat und vermutlich gehofft hatte nicht zwei Dissertationen in einer so kurzen Zeit korrekturlesen zu müssen ;-)

Ebenso gilt mein Dank der derzeitigen Arbeitsgruppe für eine harmonische, freundliche Atmosphäre im Labor und ausserhalb.

Hierbei gilt mein besonderer Dank den Mitgliedern des Fliegenlädchens:

Wiebke für die ein oder andere lange Stargate-Nacht und fürs Korrekturlesen, Isa, die mich ständig auf Trab gehalten hat (und ja, beste Freundin, ich helfe Dir immer noch gerne vom Dach! ;-), Susan für die gute Verpflegung und meine erste Begegnung mit Radio-Multi-Kulti (der Schock sitzt noch immer tief!) und last but not least Kevin, unser Hahn im Korb, der es bislang irgendwie geschafft hat bei uns zu überleben (nachdem er seine weibliche Seite entdeckte war es wohl leichter zu ertragen). Euch gilt mein besonderer Dank und ihr seid sicherlich massgeblich daran beteiligt, dass mir die Zeit im Labor immer in guter Erinnerung bleiben wird!

Ausserdem gilt mein Dank Ferdi, für die unermüdliche Unterstützung beim Schneiden diverser Augen und Gesellschaft bei endlosen Sitzungen beim Rastern am ELMI; Andre für gute Ratschläge und eine unendliche Geduld, wenn mir zum x-ten mal die *stardust*-Duplikations-Linie eingegangen war (nein, der derzeitige Ansatz lebt noch!!); Olaf für die Hilfe bei diversen Computerfragen und alle übrigen Angehörigen des Institutes, die mir auf die ein oder andere Art das Laborleben oder das Schreiben dieser Arbeit erleichtert haben.