

Einfluß der kleinen GTPase Rap1 auf die Epithelentwicklung von *Drosophila*

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Wiebke Reinken

aus Iserlohn

Unser Kopierladen, Düsseldorf

2005

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

Referentin: Prof. Dr. E. Knust
Korreferent: Prof. Dr. H. J. Hegemann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2004

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
1.1 Epithelien	1
1.1.1 Die Zellpolarität der Epithelzelle umfaßt verschiedene Aspekte	2
1.1.2 Zell-Verbindungsstrukturen in Epithelien	5
1.2 Epithelien in <i>Drosophila</i>	6
1.2.1 Bildung von primären und sekundären Epithelien	6
1.2.2 Zell-Verbindungsstrukturen in <i>Drosophila</i>	7
1.2.3 Membranpolarität	8
1.2.4 An Bildung und Aufrechterhaltung der epithelialen Integrität sind verschiedene Gene beteiligt	9
1.3 Maternale Komponenten	12
1.4 Themenstellung	13
II. Material und Methoden	14
2.1 Chemikalien und andere Materialien	14
2.2 Arbeiten mit Fliegen	15
2.2.1 Fliegenzucht	15
2.2.2 Benutzte Fliegenstämme	15
2.2.3 Erzeugung von Keimbahnklonen (KBK)	19
2.2.3.1 Das Flp-DFS-System	20
2.2.4 EMS-Mutagenese	22
2.2.5 Komplementationstest	25
2.2.6 Zellbiologische und Histologische Techniken	26
2.3 Molekularbiologische Methoden	34
2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (,PCR‘)	34
2.3.2 Lokalisation von P-Elementen mittels Inverser PCR	36
2.3.4 Isolierung genomischer <i>Drosophila</i> -DNA	37
2.3.5 Restriktionsverdau der isolierten genomischen DNA	37
2.3.6 Religation der DNA-Fragmente	38
2.3.7 Fällung der religierten genomischen DNA	39
2.3.8 Inverse PCR	39
2.3.9 Oligonukleotide	41
2.3.10 Sequenzierungen	41
2.3.11 Stammhaltung und Kultivierung von Bakterien	42
2.3.12 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	43
2.3.12.1 ,Mini‘-Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	43
2.3.12.2 ,Midi‘-Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	44
2.3.13 Transformation elektrokompetenter Bakterien	46
III. Ergebnis	47
3.1 Maternaler und zygotischer Kutikulaphänotyp der Linie <i>Rap1</i> ⁵⁷⁰³	49
3.2 Ergebnisse der Komplementationstests durch die <i>Rap1</i> als das betroffene Gen identifiziert werden konnte	53
3.3 Analyse der Morphologie anhand von Raster-Elektronen-Mikroskopie (REM)	56
3.4 Phänotypische Analyse mittels Antikörperfärbungen	62
3.5 In <i>Rap1</i> ⁵⁷⁰³ KBK Embryonen findet vermehrt Zelltod statt	74
3.6 Herstellung weitere <i>Rap1</i> -Allele mittels EMS-Mutagenese	75
IV. Diskussion	84
4.1 Identifizierung von <i>l(3)5703</i> als <i>Rap1</i> -Allel	84
4.2 Der Kutikulaphänotyp der Linie <i>Rap1</i> ⁵⁷⁰³ deutet auf eine Störung der epithelialen Integrität hin	87
4.3 Der Verlust der maternalen Komponente von <i>Rap1</i> ⁵⁷⁰³ führt zu erhöhtem Zelltod im Embryo	88
4.4 <i>Rap1</i> ⁵⁷⁰³ spielt eine Rolle in der Morphogenese und bei der Aufrechterhaltung von Zellpolarität	89
4.5 <i>Rap1</i> ist in verschiedenen Spezies an unterschiedlichen Prozessen beteiligt, die zum Aufbau und	

	zur Aufrechterhaltung von Zellpolarität führen	94
4.6	Ausblick	97
V.	Zusammenfassung	98
VI.	Literatur	99
VII.	Anhang	107
5.1.	Abkürzungen	107
5.2	5'- und 3'- Bereich des PlacW Elements	108
5.3	Defizienzenkollektion des III. Chromosoms	109

I. Einleitung

1.1 Epithelien

Epithelien sind Gewebe, die Körper- und Organoberflächen darstellen und den Austausch von Substanzen zwischen äußerer Umgebung und umschlossenem Lumen regulieren. Für ihre Funktion als Grenze zwischen verschiedenen Umgebungen ist die Ausprägung zweier Eigenschaften besonders wichtig. Zum einen weisen epitheliale Zellen einen polaren Aufbau auf. Diese Polarität manifestiert sich in polarer Organisation der Membran, des damit assoziierten Zytoskeletts, sowie der asymmetrischen Lokalisation zellulärer Komponenten und Organellen innerhalb der einzelnen Epithelzellen. Der zweite charakteristische Aspekt ist die Ausprägung von Zellkontakten. Diese ermöglichen einen engen Zusammenhalt der einzelnen Epithelzellen untereinander. Hierbei sind einige Zell-Zell-Kontakte so eng, daß sie selbst für kleine Moleküle eine Diffusionsbarriere darstellen und Epithelien hierdurch eine molekulare Grenze zwischen einzelnen Kompartimenten bilden. Gleichzeitig garantiert der enge Zusammenhalt auch die mechanische Festigkeit von Zellverbänden und Geweben.

Zellpolarität und die Ausbildung von Zellkontaktstrukturen sind somit Hauptmerkmale der Epithelien und Voraussetzung für ihre Funktion. In Abhängigkeit von ihrer differenzierten Funktion bei Sekretion (z.B. Drüsenepithel), Resorption (z.B. Darmepithel), oder Sinneswahrnehmung (z.B. Riechepithel) weisen die Epithelzellen besondere Spezialisierungen auf. (Alberts et al., 1989; Nelson, 1992; Drubin und Nelson, 1996)

Die Suche nach Faktoren und Mechanismen, die zur Etablierung und Aufrechterhaltung von Zellpolarität und Adhäsion in epithelialen Geweben beitragen, steht im Mittelpunkt vieler Untersuchungen. Im Interesse stehen hier vor allem die Regulation der asymmetrischen Verteilung von Organellen, der Aufbau der Plasmamembran und die Organisation des Zytoskeletts. Des weitern stellt sich die Frage nach der zeitlichen und räumlichen Reihenfolge, in der die Aspekte der Polarität und Adhäsion in der Zelle realisiert werden. Ein geeignetes System, in welchem diese Vorgänge untersucht werden können, stellen epitheliale Gewebe von *Drosophila* dar, in denen bereits eine Reihe Komponenten und Mechanismen bekannt sind, die am Zusammenspiel von Polarität und Adhäsion beteiligt sind.

1.1.1 Die Zellpolarität der Epithelzelle umfaßt verschiedene Aspekte

Zur Polarität einer Zelle tragen neben einem polaren Aufbau ihrer Plasmamembran, eine asymmetrische Verteilung zytoplasmatischer Komponenten sowie eine polare Organisation des Zytoskeletts bei.

Epithelzellen weisen verschiedene Regionen auf, eine dem Lumen zugewandte apikale Region, eine laterale, den Nachbarzellen zugewandte Region und die basale Region, mit welcher die Zellen mit unterliegendem Gewebe in Kontakt stehen.

Die verschiedenen Domänen der Plasmamembran epithelialer Zellen kann anhand ihrer Zusammensetzung und der mit ihr assoziierten Komponenten unterschieden werden. Zum Aufbau dieser Polarität nutzen Epithelzellen zwei unterschiedliche Mechanismen, um die richtige Lokalisation der Membranproteine zu gewährleisten: selektiver Transport und selektive Stabilisierung. Diese Proteinverteilung erfordert das Vorhandensein verschiedener Moleküle, die das zu transportierende Protein und das Ziel erkennen. Zur Verstärkung und Aufrechterhaltung der polaren Verteilung von Proteinen der Epithelzellen werden neu synthetisierte Proteine im TGN (Trans-Golgi-Netzwerk) sortiert und zur apikalen oder baso-lateralen Membrandomäne transportiert (Drubin und Nelson, 1996).

Die verschiedenen Membrandomänen einer Epithelzelle weisen auch eine unterschiedliche Lipidzusammensetzung auf. Die Lipiddoppelschicht im apikalen Bereich wird mit Glycosphingolipiden angereichert, während Phosphatidylcholin eher in dem basolateralen Bereich zu finden ist (Simons, 1995).

Auch die Verteilung der Ionenkanäle kann zum polaren Aufbau der Membran beitragen. In der apikalen Membran von MDCK- Zellen (Madin-Darby canine kidney; Zell-Linie, die von polarisiertem Nierenepithel stammt) befinden sich z.B. überwiegend Na^+ -Kanäle, wohingegen in der basolateralen Domäne vorwiegend Na^+/K^+ -ATPasen lokalisiert sind. Durch diese unterschiedliche Verteilung der Membrankomponenten ist es möglich, einen transepithelialen Natrium-Gradienten aufzubauen, der den gerichteten Transport von Ionen und löslichen Substanzen erleichtert (Rodriguez-Boulau und Nelson, 1989).

Neben den Komponenten der Plasmamembran sind auch die Bestandteile des Zytoskeletts asymmetrisch in der Epithelzelle verteilt und tragen so zur Manifestierung der Polarität bei.

Mikrotubuli z.B. spielen eine Rolle beim Transport von Vesikeln zwischen dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und der apikalen Zellmembran. In den Epithelzellen sind die Mikrotubuli entlang der apiko-basalen Achse der Zelle ausgerichtet. Sie laufen parallel zur lateralen Membran, das Plus-Ende im basalen Zytoplasma, das Minus-Ende apikal ausgerichtet. Neben den langen, apiko-basal ausgerichteten, Mikrotubuli befindet sich unterhalb der apikalen Membran ein Netzwerk aus kurzen Mikrotubuli-Filamenten (Drubin und Nelson, 1996).

Ein weiterer wichtiger Zytoskelettbestandteil sind die Mikrofilamente. Aktinfilamentbündel, die im Zytoplasma vernetzt sind und zusammen mit Mikrotubuli und anderen Zytoskelettproteinen das so genannte terminale Netz (*“terminal web“*) unterhalb der apikalen Membran bilden, sind an der Formierung der apikalen Mikrovilli beteiligt (Drubin und Nelson, 1996).

Unterhalb der apikalen Plasmamembran befindet sich ein Ring aus Aktinfilamenten, der mit dem terminalen Netz in Verbindung steht und ein Bestandteil der apikalen Zell-Zell-Kontaktstruktur, *zonula adherens* (ZA), darstellt (Gumbiner, 1996).

Als weiterer Bestandteil des Zytoskeletts sei das kortikale Zytoskelett (auch Membran-Zytoskelett) erwähnt. Hauptkomponente ist Spektrin, das in Epithelzellen an der lateralen Membran lokalisiert ist. In *Drosophila* ist das β -_{Heavy}-Spektrin (Fodrin) apiko-lateral in der Nähe der ZA lokalisiert (Thomas und Kiehart, 1994; Mc Keown et al, 1998). Es wird vermutet, daß die Interaktion von differentiell sortierten Proteinen mit unterliegendem kortikalem Zytoskelett bei der Etablierung und Aufrechterhaltung der Membranpolarität eine wesentliche Rolle spielt (Drubin und Nelson, 1996).

Eine Gruppe von Proteinen, die bei der Regulation des Zytoskeletts und vor allem bei der Steuerung der Aktinfilamente, des Vesikeltransports, epithelialer Morphogenese und Zell-Substrat und Zell-Zell-Adhäsion eine Rolle spielen, sind kleine GTPasen. Induziert durch äußere Signale, wie Wachstumsfaktoren, Cytokine und Adhäsionsmoleküle, wechseln diese kleinen Proteine zyklisch zwischen zwei Aktivitätszuständen, einer inaktiven (GDP gebunden) und einer aktiven (GTP gebunden) Form. Hierbei induzieren so genannte GEFs (Guanine nucleotide exchange factors) die Dissoziation von GDP, was die Assoziation von GTP ermöglicht und so die GTPase aktiviert. Das gebundene GTP wiederum wird durch die intrinsische GTPase Aktivität in Kombination mit GTPase aktivierenden Proteinen (GAPs) hydrolysiert, was zu Inaktivierung der GTPase führt (Boriack-Sjodin, 1998; Scheffzek, 1997) (s. Abb.1.1).

Kleine GTPasen lassen sich in fünf Subfamilien strukturell und funktionell verwandter Proteine unterteilen, die nach ihrem prototypischen Mitglied benannt sind: Ras-, Rho-, Ran-, Rab- und Arf- Familien (Caron, 2003). Die Beteiligung an der Organisation des Aktinzytoskeletts wird hier vor allem den Gruppen der Ras- und Rho- Subfamilien zugesprochen (Hall, 1998).

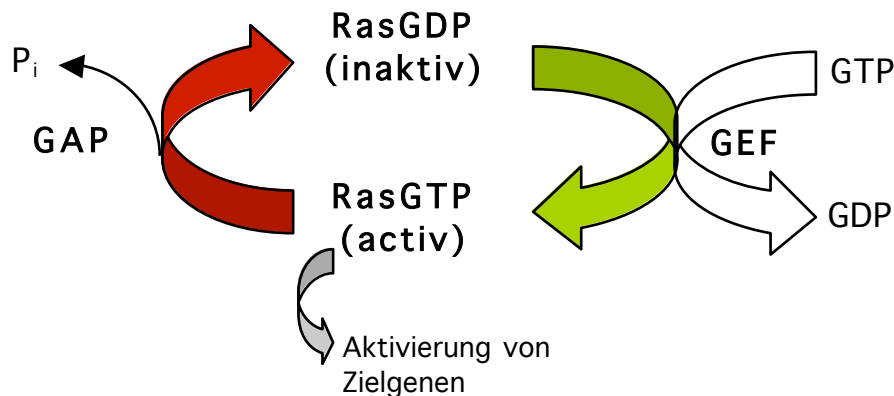


Abb.1.1: Kleine GTPasen wechseln zyklisch zwischen zwei Aktivitätszuständen.

Wechsel zwischen der aktiven (GTP-gebundenen) Form und der inaktiven (GDP-gebundenen) Form am Beispiel einer Ras GTPase. Aktiviert werden die kleinen GTPasen durch GEFs (Guanine nucleotide exchange factors), die die Dissoziation von GDP und die Assoziation von GTP ermöglicht und so die GTPase aktiviert. Das gebundene GTP wiederum wird durch die intrinsische GTPase Aktivität in Kombination mit GTPase aktivierenden Proteinen (GAPs) hydrolysiert, was zu Inaktivierung der GTPase führt

Mitglieder der Ras Subfamilie kleiner GTPasen sind unter anderem die Proteine Ras, Rap1, Ral und Rheb, welche aufgrund ihrer Ähnlichkeiten in ihrer Effektor-domäne zu dieser Familie zusammengefaßt wurden (Bos, 1997). Eine Vielzahl zellulärer Prozesse wird durch die Mitglieder der Ras Subfamilie reguliert. Sie übertragen extra- oder intrazelluläre Signale, welche Signalnetzwerke aktivieren, die unter anderem das Fortschreiten des Zellzyklus, die Transkription, den Vesikel Transport, den nuklearen Transport, die Bewegung des Zytoskeletts und die Differenzierung beeinflussen (Prokopenko, 2000).

Die am besten charakterisierte Gruppe dieser Familie sind die Proteine, welche ursprünglich als dominant agierende Oncogene entdeckt wurden. Aktivierte Ras Oncogene wurden in einer Vielzahl verschiedener Krebszelllinien gefunden. Sowohl diese Krebszellen, als auch mit oncogenem Ras transformierte Zelllinien, zeigen neben der unregulierten Proliferation charakteristische Änderungen der Morphologie und Zell-Zell Adhäsion (Kinch, 1995; Potempa, 1998).

Über die Gruppe der Rap Gene, welche eine Sequenzübereinstimmung von etwa 50% mit den Ras Genen teilen, ist indes weniger bekannt.

1.1.2 Zell-Verbindungsstrukturen in Epithelien

Neben der Zellpolarität stellen Zellverbindungsstrukturen der Epithelzellen einen wichtigen Aspekt ihrer Funktionalität dar. Durch den starken Zusammenhalt der Zellen wird nicht nur ein unkontrollierter Austausch von Stoffen zwischen apikaler und basaler Seite des Epithels verhindert. Den Verbindungsstrukturen der Zellen kommt auch bei morphologischen Veränderungen von Geweben eine zentrale Rolle zu. Hierbei müssen die Verbindungen zum einen stabil sein, um den starken morphogenetischen Bewegungen zu widerstehen, und gleichzeitig Flexibilität besitzen, die Formveränderung zuläßt, ohne daß die Integrität des Gewebes verloren geht.

Epithelzellen bilden verschiedene Arten von Verbindungsstrukturen aus, die an Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Adhäsion beteiligt sind. Es lassen sich verschiedene Zellverbindungen unterscheiden: Haftverbindungen (*adherens junction* und Desmosomen), undurchlässige Verbindungen (*tight junctions*, *septate junctions*) und kommunizierende Verbindungen (*gap junctions*).

Unter Haftverbindungen sind Zellkontakte zu verstehen, die Zytoskelettbestandteile zweier Zellen oder einer Zelle mit der ECM (extrazelluläre Matrix) verbinden. Dabei sind Verbindungen zu unterscheiden, die zu Aktinfilamenten und andere, die zu Intermediärfilamenten eine Verbindung herstellen.

Bei der Vermittlung von Adhäsion zu benachbarten Zellen spielen die *adherens junction*, die als punktförmige Struktur (*spot adherens junction*) oder als Gürtel unterhalb der apikalen Membran (*zonula adherens*, ZA) auftreten können, eine wichtige Rolle. Organisiert werden diese Multiproteinkomplexe durch homophile Interaktion von E-Cadherin Molekülen benachbarter Zellen. E-Cadherin ist ein Calcium²⁺-abhängiges Zelladhäsionsmolekül, das in der Plasmamembran verankert ist. Es geht mit seinem extrazellulären Anteil die homophilen Interaktionen ein und ist über die zytoplasmatischen Domäne mit einer Vielzahl zytoplasmatischer Proteine direkt oder indirekt assoziiert. Dieser Proteinkomplex stellt dabei auch eine Verbindung zum Aktin-Zytoskelett her, wodurch eine Kopplung zwischen Zell-Adhäsion und zytoskelettvermittelter Zellformveränderung stattfindet (Übersichtartikel s. Gumbiner, 1996).

Im basalen Bereich der Zelle vermitteln Integrine die Adhäsion zwischen Zelle und ECM.

Sie stellen mit ihrem extrazellulären Anteil Verbindungen zu Komponenten der unterliegenden ECM (wie Fibronectin und Laminin) her und sind zytoplasmatisch mit dem Aktinzytoskelett verbunden (Hynes, 1992).

Desmosomen und Hemidesmosomen stellen eine Verbindung zu den Intermediärfilamenten her. Als „Desmosomen“ werden die Zell-Zell-Haftverbindungen, als „Hemidesmosomen“ die Zell-ECM-Verbindungen bezeichnet. Als transmembrane Verbindungsmoleküle sind dabei Cadherin (Desmosomen) und Integrine (Hemidesmosomen) beteiligt.

Zur Gruppe der undurchlässigen Zellverbindungen zählen die *tight junctions* (zonula occludens), welche apikal der ZA lokalisiert sind. Sie stellen zum einen die Diffusionsbarriere in der Plasmamembran dar, was zur klaren Abgrenzung der apikalen von der basolateralen Domäne führt, zum anderen verhindern diese engen Kontakte eine unkontrollierte Diffusion über das Epithel zwischen den Nachbarzellen (Übersichtsartikel s. Eaton und Simons, 1995; Gumbiner, 1996; Nelson, 1992).

Zur Gruppe der kommunizierenden Verbindungen gehören die lateral lokalisierten *gap junctions*, welche die chemische und elektrische Kopplung zweier Zellen durch Austausch von kleinen Molekülen ermöglichen. Gap junctions bestehen hauptsächlich aus dem Protein Connexin, das hydrophile Kanäle in der Plasmamembran bildet.

1.2 Epithelien in *Drosophila*

1.2.1 Bildung von primären und sekundären Epithelien

Das erste Epithel, das während der *Drosophila*-Entwicklung gebildet wird, ist das zelluläre Blastoderm. Es entsteht kurz vor der Gastrulation bei der Zellularisierung des syncytialen Blastoderms durch Einzug der Plasmamembran zwischen die einzelnen Kerne.

Im weiteren Verlauf der Entwicklung lassen sich zwei Typen von Epithelien unterscheiden: primäre und sekundäre.

Primäre Epithelien entstehen im weiteren Verlauf der Embryogenese durch Invagination des Ursprungepithels. Während dieser Bewegungen halten sie ihre epitheliale Polarität aufrecht.

Zu ihnen gehören Epithelien ektodermalen Ursprungs, wie Epidermis, Tracheen, Speicheldrüsen, Malpighische Gefäße und Vorder- und Hinterdarm.

Als sekundäre Epithelien werden hingegen solche bezeichnet, die aus Zellen hervorgehen, die im Laufe der Entwicklung ihren Epithelcharakter verloren und mesenchymatische Struktur angenommen haben, wie z.B. Endo- und Mesoderm. Einige dieser Zellen nehmen später wieder Epithelcharakter an und bilden sekundäre Epithelien, z.B. Mitteldarm (Übersichtsartikel s. Tepass, 1997).

1.2.2 Zell-Verbindungsstrukturen in *Drosophila*

Drosophila unterscheidet sich in der Zusammensetzung der Zell-Verbindungsstrukturen von der der Vertebraten (s. Abb.1.2). In *Drosophila* kommen *adherens junction* (AJ) und *gap junction* (GJ) vor, wohingegen Desmosomen und *tight junction* nicht zu finden sind. Das Fehlen der Desmosomen läßt sich dadurch erklären, daß es in Arthropoden keine Intermediärfilamente gibt (Übersichtsartikel Tepass, 1997; Müller, 2000).

Die Aufgabe der *tight junction* (TJ) als Diffusionsbarriere übernehmen bei Invertebraten vermutlich die *septate junctions* (septierte Desmosomen) (SJ), in denen sich zu TJ homologe Proteinkomplexe finden. Im Gegensatz zu den apikal der ZA lokalisierten TJ in Vertebraten sind die SJ unterhalb der ZA über einen größeren Abschnitt der lateralen Membran zu finden. Als Komponente der SJ wurde zuerst das Discs large Protein, ein an Protein-Protein-Interaktion beteiligtes MAGUK (membrane-associated guanylate kinase) Protein, identifiziert (Woods und Brynat, 1991). Weitere Komponenten sind unter anderem Coracle und die Transmembranproteine Fasciclin III und Neurexin IV (Bryant, 1997) (s. Abb.1.3). Gliotactin und die α und β Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase sind für die Barrierefunktion der SJ notwendig (Genova und Fehon, 2003), während die Organisation der SJ durch Interaktion zwischen Contactin, Neuroglian und Neurexin IV gesteuert wird (Faivre-Sarrailh, 2004).

Während GJs schon früh in der Entwicklung gebildet werden (ab Stadium 5/6), entwickeln sich ab Stadium 14 in vielen Epithelien lateral, basal der ZA, *septate junctions*. SJs kommen in zwei Formen vor, die sich in der Anordnung ihrer Septen unterscheiden. In Epithelien ektodermalen Ursprungs finden sich *pleated* SJs, während in endodermalen Epithelien *smooth* SJs auftreten.

Im Verlauf der frühen Embryonalentwicklung stellen *spot adherens junctions* (SAJs) und ZA die einzigen Zell-Adhäsionsverbindungen dar. Erst ab Stadium 14/15, treten Zell-ECM-Verbindungen auf (Tepass und Hartenstein, 1993).

SAJs und ZA spielen damit eine zentrale Rolle bei Bildung der epithelialen Polarität primärer Epithelien.

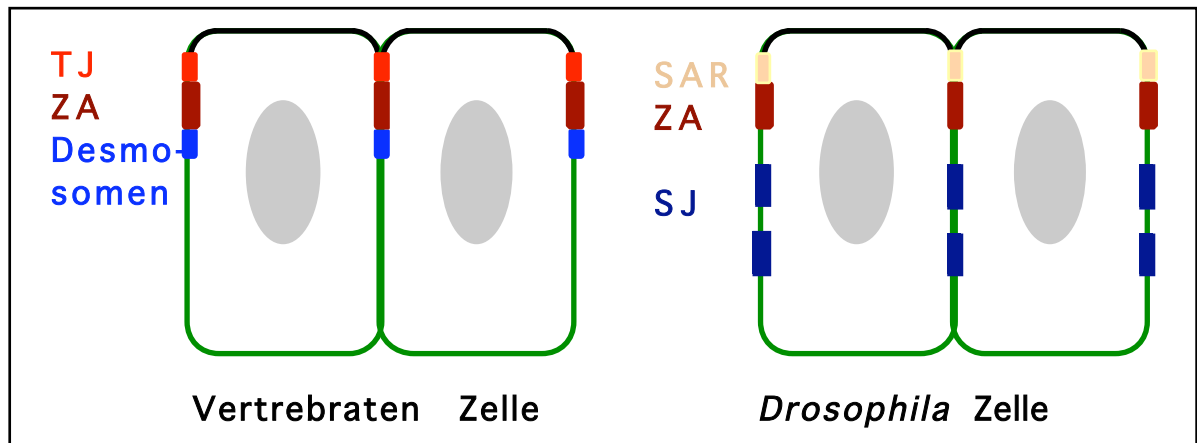


Abb.1.2: Vergleich der Zellkontaktstrukturen in Vertebraten und *Drosophila* Zelle (verändert nach Müller, 2000).

In der Abb. ist links das Schema einer Vertebraten Zelle dargestellt. Als Zellkontaktstrukturen finden sich hier *tight junctions* (TJ), *zonula adherens* (ZA) und Desmosomen. Im Gegensatz dazu finden sich in der rechts gezeigten *Drosophila* Zellen nur die *zonula adherens* (ZA) und *septate junctions* (SJ). Die subapikale Region (SAR), apikal der ZA, ist keine Zellkontaktstruktur im engeren Sinne, dort sind Proteinkomplexe (Crb- und Baz-Komplex) lokalisiert, die an Bildung und Aufrechterhaltung der ZA beteiligt sind.

1.2.3 Membranpolarität

Die drei Plasmamembrandomänen epithelialer Zellen in *Drosophila* (apikal, der Bereich der ZA und lateral) zeichnen sich durch hiermit assoziierten Proteinen aus (Übersichtsartikel s. Müller, 2000; Wodarz et al., 1995) (s.Abb.1.3).

Die apikale Domäne wird in die zwei Bereiche apikal und subapikal unterteilt. Die apikale Region wird durch die Expression des Membranproteins Sas (Stranded at second) und der Sekretion des Yellow Proteins markiert. In einer sehr klar begrenzten Domäne direkt apikal der ZA (subapikal) sind Membran- und membranassoziierte Proteine wie Crumbs (Crb) (Tepass et al. 1990) und Stardust (Sdt) (Bachmann et al, 2001; Hong et al, 2001) lokalisiert, welche auch funktionell mit der direkt anschließenden ZA assoziiert sind.

Im Bereich der ZA, welcher die apikale Domäne von der lateralen trennt, sind die Proteine DE-Cadherin (Tepass et al, 1996), β -Heavy-Spectrin (Thomas und Kiehart, 1994), Armadillo (Arm) (Müller und Wieschaus, 1996) und Phosphotyrosin-haltige Epitope lokalisiert (Daniel und Reynolds, 1997; Grawe et al, 1996; Tsukita et al, 1991).

Die basolaterale Membran wird unter anderem durch Discs large (Dlg), Scribble (Scrib) (Bilder und Perrimon, 2000) und Neurotactin (Nrt) markiert.



Abb.1.3: Schematische Darstellung einer Epithelzelle nach Abschluß der Zellularisierung

Nach Abschluß der Zellularisierung können Bereiche, wie apikal (schwarz markiert), subapikal, *Zonula adherens* (ZA) und lateral (grün markiert) durch unterschiedliche Expression von Markerproteinen unterschieden werden.

1.2.4 An Bildung und Aufrechterhaltung der epithelialen Integrität sind verschiedene Gene beteiligt

Der erste Hinweis auf Ausbildung von Epithelpolarität im *Drosophila* Embryo zeigt sich während der Zellularisierung im Blastodermstadium (Stadium 4).

Bei der Zellularisierung wird die Plasmamembran um die an der Peripherie liegenden Kerne gebildet. Diese Stellen, an denen die Membranen synthetisiert werden, haben einen hohen Anteil an Aktin, Myosin und anderen Motorproteinen und werden Furchungskanäle (*furrow canals*) genannt. Diese bilden eine Art kontraktiven Ring, der vermutlich die Invagination der Furchen und das komplette Umschließen der Kerne vorantreibt (Lecuit und Wieschaus, 2000). Haben sie eine gewisse Länge erreicht, expandieren die Furchungskanäle lateral und trennen die Zelle vom unterliegenden Dotter (s. Abb.1.4).

In der frühen Phase der Zellularisierung bildet sich an der Spitze der Teilungsfurche eine vorübergehende adhäsive Zone (basale junction) (Hunter und Wieschaus, 2000). Später sind *spot-adherens junction* (SAJ) entlang der apikolateralen Membran zu finden.

Diese konzentrieren sich während der Gastrulation (Stadium 5-10) in Epithelien ektodermalen Ursprungs am apikalen Pol und gehen in die Bildung einer durchgehenden zonula adherens (ZA) ein (Stadium 11). In apikalen und basalen Zellkontaktstrukturen sind Arm, DE-Cadherin und D β -Catenin (Moleküle, die homophile Interaktion und Kontakt zu den Aktinfilamenten vermitteln) lokalisiert.

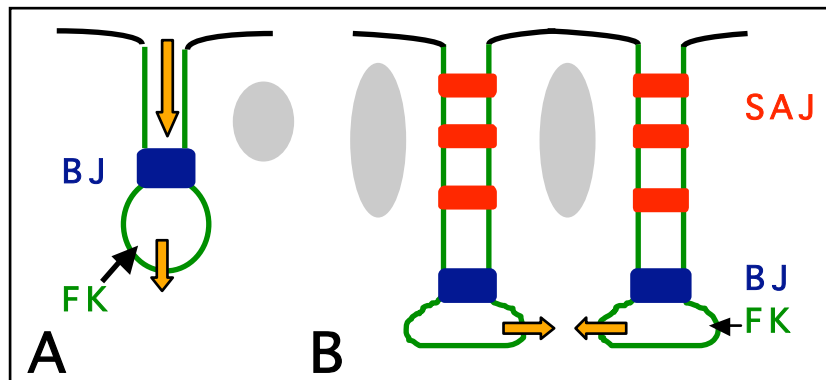


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Zellkontaktstrukturen während der Zellularisierung (verändert nach Müller, 2000)

(A) zu Beginn der Zellularisierung bilden sich an den Stellen, an welchen die Membran eingezogen wird Furchungskanäle (FK). Apikal der FK bilden sich erste Zellkontaktstrukturen, die *basal junction* (BJ). (B) in der folgenden Phase, die von schnellem Membranwachstum gezeichnet ist, bilden sich apikal der BJ punktförmige adhäsive Stellen (*spot adherens junction*/SAJ), die sich nach Abschluß der Zellularisierung zu dem adhäsiven Gürtel (*adherens junction*) zusammenschließen. Die BJ lösen sich nach Abschluß der Zellularisierung auf. Die Richtung des Membranwachstums ist mit orangefarbenen Pfeilen gekennzeichnet.

Durch eine Vielzahl systematischer, genetischer Suchen konnten Gene identifiziert werden, die an der Bildung der embryonalen Epithelien beteiligt sind. Die gefundenen Mutanten zeigen einen starken Defekt in der Bildung ektodermaler Epithelien, was sich in einem charakteristischen Kutikulaphänotyp äußert. Die larvale Kutikula wird gegen Ende der Embryogenese von ektodermalen Epithelien (wie z.B. Epidermis) sekretiert. Daher kann die Untersuchung der veränderten Kutikula Aufschluß über den Zustand der kutikulasekretierenden Gewebe geben.

Einige Gene, die spezifisch an Bildung und Aufrechterhaltung der epithelialen Struktur beteiligt sind, sind in drei Proteinkomplexen organisiert, die im folgenden kurz vorgestellt werden.

Hauptbestandteile des ersten Proteinkomplexes stellen das Transmembranprotein Crumbs (Crb) und das MAGUK Protein Stardust (Sdt) dar (Tepass et al., 1990; Tepass und Knust, 1993; Hong et al, 2001; Bachmann et al., 2001).

An Sdt wiederum binden die PDZ- (Postsynaptic density protein/ Discs Large/ Zonula Occludens Protein) Proteine Dlin-7 und DPatj (Bachmann et al, 2004). Dieser Komplex ist subapikal, d.h. apikal der ZA, lokalisiert und an der Formation der apikalen Domäne beteiligt. Einen weiteren Komplex stellt der Bazooka-Komplex dar. Er besteht aus dem PDZ-Protein Bazooka (Baz), DmPar6 und der atypischen Proteinkinase DaPKC. Die Proteine dieses Komplexes sind sowohl subapikal, als auch in der Region der ZA lokalisiert. Diese starke Co-Lokalisation der Crb- und Baz-Komplexe deutet schon auf eine sich gegenseitig regulierenden Eigenschaften dieser Komplexe hin. Während bei dem Vorgang der Zellularisierung und Zellkontaktbildung die apikale Crb Lokalisation abhängig von Baz ist, sorgt Crb im Gegenzug während der weiteren Entwicklung für Manifestierung der Baz-Lokalisation an der apikalen Membran. (Kuchinke et al, 1998; Wodarz et al., 2000; Petronczki und Knoblich, 2001; Bilder et al; 2002; Tanentzapf und Tepass, 2001)

Als dritter Proteinkomplex ist der Scrib-Komplex an Bildung der epithelialen Polarität beteiligt, bestehend aus dem PDZ-Protein Scribble (Scrib) (Bilder und Perrimon, 2000), Discs-large (Dlg) (Woods et al, 1991) und dem Protein Lethal giant larvae (Lgl) (Jacob et al, 1987; Bilder et al, 2000). Dieser Komplex ist im Gegensatz zu den anderen beiden Komplexen nicht apikal, sondern basal der ZA lokalisiert. Diese distinkte, basale Lokalisation deutet auf die antagonistische Funktion dieses Komplexes zu Crb- und Baz-Komplex hin. Der Scrib-Komplex reprimiert die apikale Identität entlang der basolateralen Oberfläche, indem es der - durch Baz initiierten - apikalen Polarität entgegenwirkt. Genetisch konnte gezeigt werden, daß der Crb-Komplex ebenfalls durch den Baz-Komplex nach apikal rekrutiert wird und dort der antagonistischen Scrib-Aktivität entgegen wirkt. Die Balance zwischen Scrib- und Crb-Komplex Aktivität setzt die Grenze der apikalen und basolateralen Membrandomänen und positioniert die Zellkontaktstrukturen. (Bilder, et al., 2003; Tanentzapf und Tepass, 2003)

Bei Verlust der zygotischen Komponente der vorgestellten Gene treten keine Defekte in den frühen Prozessen auf. Obwohl die Etablierung der Zellpolarität und der ZA schon während der Zellularisierung beginnen, sind epitheliale Gewebe erst ab einsetzender Organogenese betroffen. Trotzdem scheint diese zygotische Genexpression auch in der frühen Entwicklungsphase benötigt zu werden, denn z.B. in Doppelmutanten für *baz* und *sdt* können schon frühe Defekte bei der Gastrulation beobachtet werden (Müller und Wieschaus, 1996).

Zygotische Loci, die spezifisch bei der Etablierung der epithelialen Zellpolarität während der Zellularisierung benötigt werden, konnten noch nicht identifiziert werden. Dabei stellt sich die Frage, ob hierbei die entscheidenden Genprodukte als maternale mRNA oder Proteine bereitgestellt werden, da Embryonen, denen das maternale Genprodukt fehlt, da sie aus Keimbahnklonen hervorgegangen sind, und z.B. kein maternales *baz*, *arm* oder *shg* Genprodukt besitzen, schon früh Defekte zeigen.

Bei den Analysen besteht jedoch die Schwierigkeit, zwischen Genen zu unterscheiden, die die Zellularisierung beeinflussen, und solchen, die für die Etablierung der Polarität in dem frühen Entwicklungsstadium verantwortlich sind, da diese Prozesse eng miteinander verknüpft sind. Hierbei scheint die Formation der Zell-Kontaktstrukturen für Wachstum und Polarisierung der Plasmamembran notwendig zu sein (Lecuit und Wieschaus, 2000).

1.3 Maternale Komponenten

Ein Gen kann sowohl maternal (während der Oogenese) als auch zygotisch exprimiert werden. Während der Eientwicklung werden viele für die frühe embryonale Entwicklung notwendige Komponenten von der Mutter in Form von mRNA oder Protein in der Eizelle deponiert, wodurch der Genotyp der Mutter für die Ausprägung des Phänotyps des Embryos entscheidend ist und die Mutationen in entsprechenden Genen daher als "maternal" bezeichnet werden. Zygotische Gene hingegen werden erst später während der Embryogenese vom Genom des Embryos bereitgestellt. Zygotische Transkription beginnt vor Mitose-Zyklus 14 (Ende Stadium 4), vor einsetzender Zellularisierung.

Mutationen in rein maternal wirkenden Genen können unabhängig vom zygotischen Genotyp embryonale Letalität verursachen, da diese Komponenten essentiell für die frühen Entwicklungsschritte sind. Homozygot mutante Weibchen solcher Mutationen, die aus Kreuzung heterozygoter Eltern hervorgehen, sind lebensfähig, da die zygotische Komponente dieser Gene nicht essentiell für ihre Entwicklung ist. Die Eier dieser Tiere können sich jedoch, unabhängig vom Genotyp des Vaters (paternale Komponente), nicht weiterentwickeln, da diese Gene für die ersten Entwicklungsprozesse benötigt werden.

Viele Gene führen, wenn sie homozygot mutant vorliegen, zur embryonalen Letalität. Dies bedeutet, daß die zygotische Komponente eine wichtige Rolle bei der Entwicklung spielt.

Der Nachweis, daß ein Gen auch eine maternal aktive Komponente besitzt, ist erfolgt, wenn die Entfernung des maternalen Genprodukts zur Verstärkung des zygotischen Phänotyps führt.

Um Eier zu erhalten, die kein Produkt des zu untersuchenden Gens enthalten, müssen weibliche Keimzelle und Nährzelle mutant für das entsprechende Gen sein. Diese homozygot mutanten Keimzellen (Stammzellen) können mittels mitotischer Rekombination in heterozygoten Weibchen hergestellt werden. Mit Hilfe des FRT-FLP-Systems (Flipase recombination targets- Flipase-System) können früh in sich noch teilenden Oogonien homozygote Keimzellen (Keimbahnklone) erzeugt werden. (Wieschaus und Noell, 1986; Chou und Perrimon, 1992)

1.4 Themenstellung

Viele Gene, deren Produkte an der Etablierung und Aufrechterhaltung epithelialer Polarität und Integrität beteiligt sind, konnten im Laufe der vergangenen Jahre bereits identifiziert werden. Jedoch ist das exakte räumliche und zeitliche Zusammenspiel dieser Komponenten bislang nur teilweise verstanden, da bislang nicht alle möglichen Interaktionspartner identifiziert werden konnten. Für das Verständnis des gesamten Prozesses sind diese Informationen essentiell.

Da frühere Suchen nach weiteren zygotischen Komponenten erfolglos blieben und angenommen wird, daß entscheidende Genprodukte als maternale mRNA oder Protein bereit gestellt werden, wurden systematische Suchen nach maternalen Faktoren (Perrimon et al, 1989) durchgeführt. Auf dieser Grundlage wurde auch im hiesigen Labor von H.-Arno J. Müller und A. Wodarz (unveröffentlichte Daten) eine Suche nach Genen, welche eine maternalen Komponente besitzen, durchgeführt. Während meiner Diplomarbeit (Gödde, W., 2001) konnte eine Vielzahl von Mutanten isoliert werden, deren Kutikulaphänotyp vergleichbar ist mit dem von Mutanten, welche an der Etablierung und Aufrechterhaltung der epithelialen Integrität beteiligt sind. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun eine dieser Mutanten molekular und genetisch analysiert und phänotypisch durch immunohistochemischen Untersuchungen charakterisiert werden.

II. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und andere Materialien

Alle Verbrauchskemikalien wurden in der Qualität *pro analysis* 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.

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.

Reagenziensätze:

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

Photoarbeiten und Bildverarbeitung:

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

2.2 Arbeiten mit Fliegen

2.2.1 Fliegenzucht

Die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen erfolgten an der Taufliege, *Drosophila melanogaster*. Der Generationszyklus von *D. melanogaster* beginnt mit einem etwa 24-stündigen (bei 25°C) Embryonalstadium, welches in 17 Entwicklungsstadien unterteilt wurde (Campos-Ortega und Hartenstein, 1997). Dem Embryonalstadium folgen 3 larvale Stadien, der sich die Bildung der Puppe anschließt, aus welcher schließlich die Imago schlüpft.

Die Haltung der Fliegen erfolgt wie in Ashburner (1989) beschrieben auf Maisstandardmedium. Stämme wurden im wesentlichen bei 18°C gehalten, Kreuzungen bei 25°C oder Raumtemperatur. Eiablagen wurden auf Apfelsaftagarplatten angesetzt, die mit etwas Hefe zur Stimulation der Fliegen bestrichen wurden.

2.2.2 Benutzte Fliegenstämme

Tab.2.1 : Fliegenstämme zur Erzeugung von KBK auf dem III. Chromosom

Bezeichnung	Bemerkung	Herkunft
P ^{ry+t7.2=hsFLP} 22,y1w*; TM3, Sb1/CxD	FLP-Stamm	Stock#1970 , Bloomington stock center
w*; P ^{w+mC=ovoD1-18} 3L1 P ^{w+mC=ovoD1-18} 3L2 P ^{w+mW.hs=whs} /st1betaTub DD ss1 es/TM3, Sb1	Ovo ^D -Stamm für KBK auf dem linken Chromosomenarm	Stock#2139 , Bloomington stock center
w*; P ^{ry+t7.2=neoFRT} 82B P ^{w+mC=ovoD1-18} 3R/ st1 betaTub85DD ss1 es/ TM3, Sb1	Ovo ^D -Stamm für KBK auf dem rechten Arm	Stock#2149 , Bloomington stock center

Tab.2.2: Zur EMS-Mutagenese eingesetzte Fliegen-Stämme

Stamm Name	Genotyp	Herkunft
FRT300	FRT ^{2A-3L} FRT ^{82B-3R} / FRT ^{2A-3L} FRT ^{82B-3R}	Chou, Perrimon, (1996)
#1558	yw; Pr Dr /TM3,P{w ^{+mc} =hs-hid}14,Sb	Bloomington Stock Center
#57	Df(3L)R/TM6 C	Bloomington Stock Center

Tab.2.3: Verwendete Fliegenstämme zur Kartierung der untersuchten Region

Stamm Nr./Name	Genotyp	Region	Herkunft
#57	Df(3L)R/TM6 C	62B7-62B12	Bloomington Stock Center
#600	Df(3L)Aprt-1, ru h/TM3, Sb, Ser	62A10-B1; 62D2-5	Bloomington Stock Center
#2400	Df(3L)R-G7, ve/TM6 B, Tb	62B8-9; 62F2-5	Bloomington Stock Center
#5411	Df(3L)Aprt-32/TM6	62B1; 62E3	Bloomington Stock Center
#439	Df(3L)Ar14-8/TM2	61C5-8; 62A8	Bloomington Stock Center
#3650	Df(3L)M21/In(3LR)	62F; 63D	Bloomington Stock Center
#1220	mu2 st/TM6 C, ca	62B11	Bloomington Stock Center
Aprt-123	Aprt-123/TM6, Ubx	62B8-10;62B11-C	Dr. Mason
Aprt-102	Aprt-102/TM6, Ubx	62B5-7; 62E6-F1	Dr. Mason
Aprt-27	Aprt-27/TM6, Ubx	62B5-7; 62D6-E9	Dr. Mason
Aprt-24	Aprt-24/TM6, Ubx	62B8-9; 62D2-5	Dr. Mason
Rap1 ^{B1}	Rap1 ^{rv(R)B1} /TM6 B	62B7	Hariharan, 1991
Rap1 ^{B3}	Rap1 ^{rv(R)B3} /TM6 B	62B7	Hariharan, 1991

2.2.2.1 ‚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 Balancer-Chromosomen handelt es sich um wildtypische Chromosomen, 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. *Stubble* (kurze Borsten), die sich in Kreuzungen leicht verfolgen lassen und die Balancer eindeutig von den zumeist unmarkierten mutanten Chromosomen unterscheiden. Zudem führen die dominanten Mutationen, welche die Balancer tragen, in Homozygose zu Letalität, so daß in Kreuzungen diese Klasse nicht gefunden wird.

Tab. 2.4: Verwendete Balancer-Chromosomen

Stämme	Bemerkung	Referenz
3. Chromosom		
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

2.2.2.2 ‚Blue-Balancer‘

In immunhistologischen Präparaten ist es in manchen Fällen schwierig, homozygot mutante Embryonen von der Morphologie her von Heterozygoten zu unterscheiden. Aus diesem Grund werden zum Balancieren der P-Element-Linien spezifische „Blue-Balancer“ verwendet.

Diese Art von Balancer trägt neben einem dominanten Marker, wie z.B. TM3 mit der Mutation *Stubble* (*Sb*), ein *lacZ*-Gen, welches unter der Kontrolle des *ftz* (*fushi-tarazu*)-Promotors steht. In den Embryonen dieses Stammes finden sich folgende Genotypen (in Bezug auf das III. Chromosom):

$P\{\text{lac}W, w^+\}$	$P\{\text{lac}W, w^+\}$	$TM3, Sb[ftz::lacZ]$
$P\{\text{lac}W, w^+\}$	$TM3, Sb[ftz::lacZ]$	$TM3, SB[ftz::lacZ]$
homozygot mutant	heterozygot	homozygot für den „Blue Balancer“ (letal)

Mit Hilfe einer lacZ Färbung können Embryonen, die den “Blue Balancer“ homo- oder heterozygot tragen von den homozygoten Mutanten unterschieden werden. Das lacZ-Gen wird unter der Kontrolle des *ftz*-Promotors in folgendem zeitlichen und räumlichen Muster exprimiert (s.Abb.2.1).

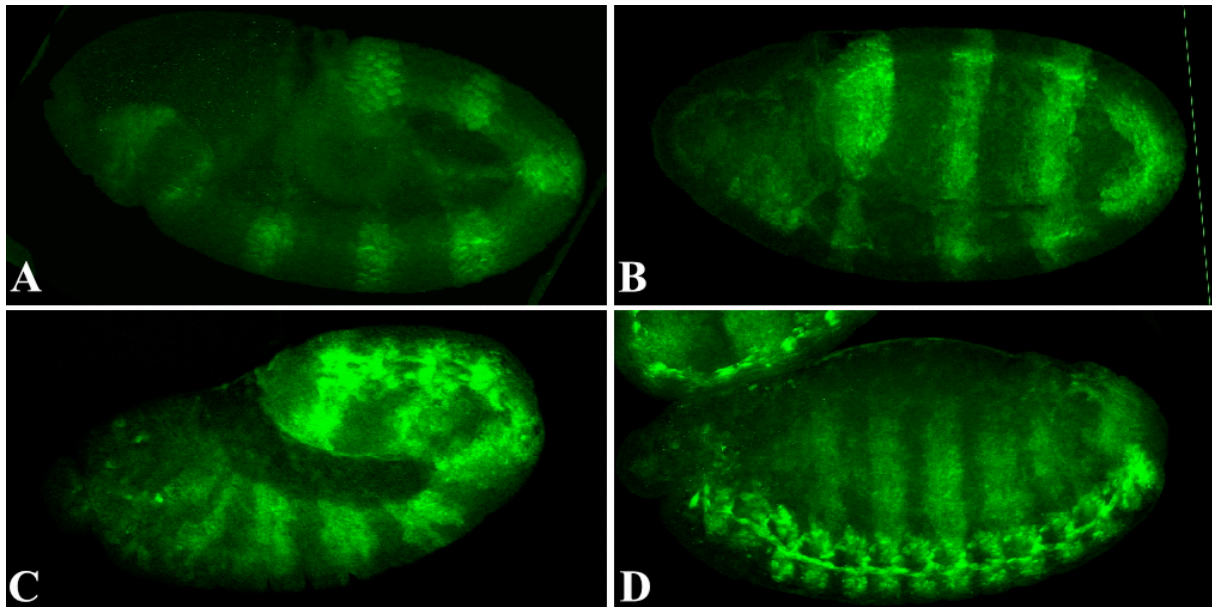


Abb.2.1 : *ftz*-Expressionsmuster

(A)-(D) Gal-Färbung an “Blue-Balancer“-Embryonen mit Fluoreszenzmarkierung. In allen Embryonen, (A) Stadium 7/8, (B) Stadium 9, (C) Stadium 12 und (D) Stadium 13, ist das für *ftz* charakteristische 7-Streifen Muster zu erkennen. In Stadium 13 (F) ist zusätzlich die Markierung des ZNS zu sehen.

2.2.2.3 P-Elemente

Die im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Untersuchungen wurden hauptsächlich an dem Stamm $w^-/w^-; +/+; P\{\text{lacW}\}1(3)5703\text{FRT}3\text{L}3\text{R}/\text{TM}3, \text{Sb}$ (zur Verfügung gestellt von H.-J. A. Müller und A. Wodarz; HHU Düsseldorf) durchgeführt.

Diese Linie trägt ein P-Element. P-Elemente, die in das *Drosophila* Genom inserieren, können zu Mutationen führen, die in Homozygose embryonale Letalität verursachen. P-Elemente sind etwa 4kb große mobile DNA-Elemente, die an ihren Enden ‘inverted-repeat‘-Sequenzen (IR) und im Innern ein Transposasegen tragen. Die Transposase kann an den IR angreifen und damit eine Transposition einleiten.

Die in dieser Arbeit maßgeblich verwendete und analysierte Linie trägt das $P\{\text{lacW}\}$ -Element (s.Abb.2.2). Hierbei handelt es sich um ein modifiziertes *Drosophila* P-Element (Bier et al., 1989).

Um diese Eier von solchen zu unterscheiden, die aus heterozygoten Eikammern entstanden sind, wird eine Sterilmutation (ovo^D) eingesetzt, die in heterozygoten Weibchen die Oogenese blockiert. Da dieser Effekt zellautonom und dominant ist, gehen nur aus Ovarien, die homozygot wildtypisch für die Sterilmutation und homozygot mutant für das untersuchte Gen sind, Eier hervor, denen das maternale Genprodukt fehlt. Werden die Weibchen, in denen Ovarien vorliegen, die für das untersuchte Gen durch Rekombination homozygot mutant sind, mit heterozygoten Männchen gekreuzt, entstehen genotypisch zwei Embryo-Klassen: Solche, die weder maternales noch zygotisches Genprodukt besitzen und die, die vom Vater eine Wildtyp-Kopie des Gens erhalten haben. Ist der Phänotyp der Keimbahnklon-Embryonen gegenüber dem zygotischen Phänotyp verstärkt, hat das Gen eine maternal aktive Komponente. Anhand der entstehenden zwei Embryo-Klassen läßt sich dann noch die Frage beantworten, ob und inwiefern das vom Vater eingebrachte Wildtyp-Gen den maternalen Phänotyp retten kann (paternale Rettung).

2.2.3.1 Das Flp-DFS-System

Bei dem Flp-DFS-System (Flipase-dominant female sterile [ovo^{D1}]) wird das Flipase-Rekombinationssystem der Hefe genutzt, um sequenzspezifische Rekombination in *Drosophila* zu erzeugen. Durch P-Element vermittelte Keimbahntransformation wurden die Flipase und ihre Zielsequenzen, sogenannte FRT-Sequenzen, die aus 599 bp langen invertierten Sequenzwiederholungen bestehen, vom 2 μ m Plasmid der Hefe auf *Drosophila* übertragen. Die Flipase wurde hinter einen Hitzeschockpromotor in einen P-Elementvektor, der das *rosy*⁺-Gen als Marker trägt kloniert. Das sogenannte FRT-Element besteht aus einem P-Element-Vektor, der ein *white*⁺-Minigen enthält, flankiert von zwei FRT-Sequenzen. Durch einen Hitzeschock kann die Flipase aktiviert werden und Rekombination zwischen zwei FRT-Sequenzen verschiedener FRT-Elemente im *Drosophila*-Genom katalysieren (Golic & Lindquist, 1989). Von Chou & Perrimon (1992) wurde dieses System erstmals zur Erzeugung von Keimbahnklonen genutzt. Hierzu wurden Chromosomen erzeugt, die $fs(1)ovo^{D1}$ und FRT-Elemente tragen.

Damit eine Rekombination zwischen dem $fs(1)ovo^{D1}$ tragenden Chromosom und dem zu untersuchenden Allel stattfinden kann, muß dieses Allel mit demselben FRT-Element rekombiniert werden. Eine schematische Darstellung des Rekombinationsvorgangs findet sich in Abb. 2.3.

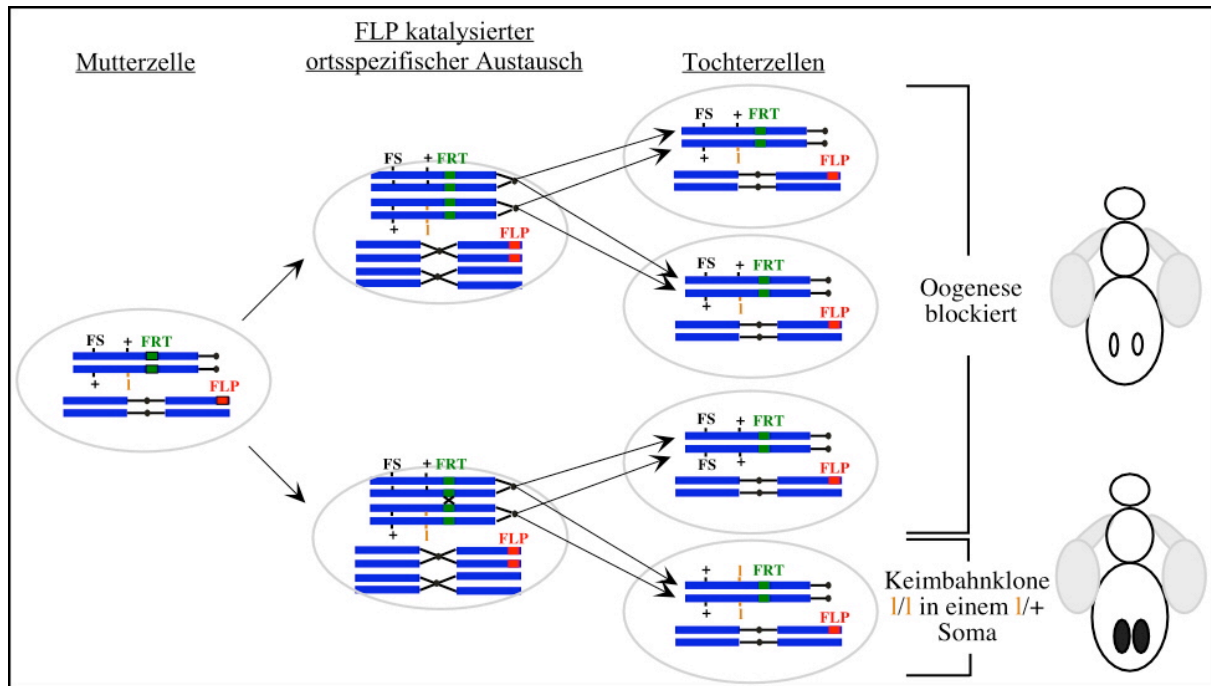


Abb.2.3: Schematische Darstellung der „Flp-DSF“-Technik (verändert nach Chou & Perrimon, 1992).

Die *FLP*-Rekombinase induziert ortsspezifischen Austausch: hier ist ein chromosomaler Austausch gezeigt, der im Euchromatin einer Fliege des Genotyps *Fs + FRT/ + 1 FRT; FLP/ +* auftritt. In diesem Schema ist die *FRT*-Insertion auf dem X-Chromosom proximal zu beiden *Fs* und *l* dargestellt. Der autosomal lokalisierte *hsp70-FLP* kann durch Hitzeschock ausreichend Rekombinaseaktivität erzeugen, um ortsspezifischen chromosomalen Austausch an der Position der *FRT* Sequenzen zu katalysieren.

Nomenklatur: Atrophische Ovarien sind als leere Ovale markiert. *FLP*-Rekombinase Ziel-Sequenzen (*FRT*) sind als grüne Kästchen und *FLP* als rote Kästchen gezeigt. Dominant weiblich steril (*Fs*), rezessive, zygotisch letale Mutation (*l*), *hsp70-FLP* (*FLP*).

Folgende Kreuzungen wurden zur Erzeugung der KBK durchgeführt:

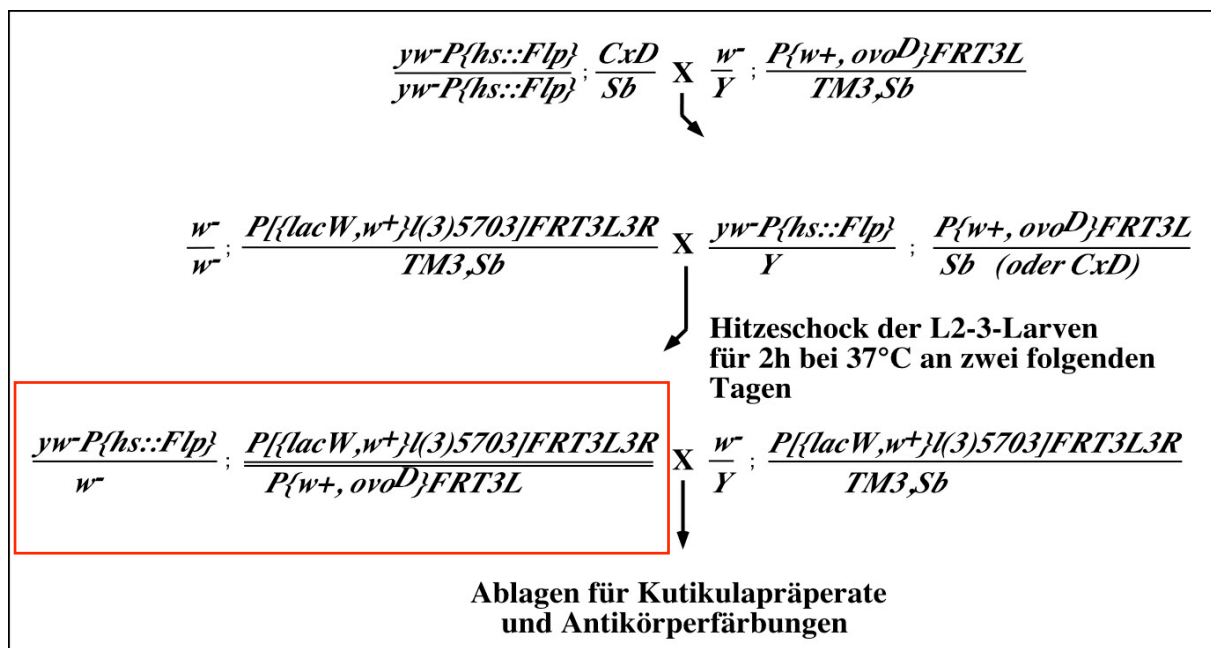


Abb. 2.4: Kreuzungsschema zur Erzeugung von KBK auf dem linken Arm des III. Chromosoms.

Die genauen Genotypen der verwendeten Linien sind in Tab. 2.1 aufgeführt. In den Fliegen, die von dem roten Kasten umrahmt sind, werden Keimbahnklone induziert.

2.2.4 EMS-Mutagenese

Mutationen sind ausgesprochen nützlich für die genetische Analyse, da sie zum Verständnis der Genfunktion beitragen. Der erste Schritt jeder Mutationsanalyse ist daher die Suche nach Mutanten z.B. durch Mutagenese.

Eine Möglichkeit, um Mutationen im Erbgut hervorzurufen, ist der Einsatz der Chemikalie Ethylmethansulfonat (EMS), der zu einem hohen Anteil zu Punktmutationen führt. Dieses Mutagen läßt sich sehr leicht verarbeiten. Für eine EMS-Mutagenese werden Fliegen auf Filterpapier gesetzt, welches mit einer Mischung aus EMS und Zucker getränkt ist.

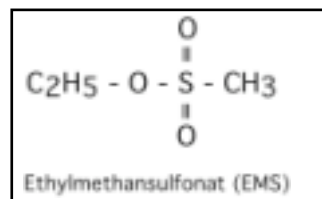


Abb.2.5: Strukturformel EMS

Die Mutagenese erfolgt in zwei Schritten. Zunächst werden genomübergreifend Mutationen erzeugt und im zweiten Schritt die, für die Arbeit interessanten Linien durch Kreuzung gegen Defizienzen oder bereits bekannte mutanten Allele der Region selektioniert.

Ablauf der Mutagenese:

Tag 1: 0-2 Tage alte Männchen sammeln (je 50 Tiere auf eine frische Futterbrei-Flasche)

Tag 2: Männchen für 6Std. in leerer Futterbrei-Flasche hungern lassen

„EMS-Flasche“ vorbereiten: In jede Flasche drei *kimwipes* Papiertücher stecken, und am Flaschenboden zusammendrücken, dann 5ml der EMS/Zucker-Lösung hinzufügen

50 Männchen in jede mit der EMS-Sucrose Lösung versetzten Flasche setzen und Flaschen über Nacht unter dem Abzug stehen lassen.

Arbeiten mit EMS sollten unter einem mit einseitig beschichtetem Filterpapier ausgelegten Abzug erfolgen, sowie Kittel und doppelte Handschuhe getragen werden. Alle Materialien, die mit EMS in Kontakt kommen, werden mit 1 M NaOH dekontaminiert!

Lösungen:

EMS/Zucker-Lösung: 4,5 ml ddH₂O

0,5 ml 10 x EMS (10% Sucrose, 100 mM Tris, sterilisiert)

13,2 µl EMS (µl Endkonzentration 25 mM)

Tag 3: Männchen in leere Futterflaschen überführen und für 30 Min dort belassen

Fliegen für 30 Min in neue mit Futter bestückte Flasche übertragen dann

Fliegen für 3 Std. in eine neue, mit Futter und frischer Hefe bestückte Flasche übertragen

Kreuzung ansetzen: 50 EMS-Mutagenisierte Männchen mit 50 Weibchen (s. Kreuzungsschema)

Tag 4-6: Überführung der Elterntiere auf neue Flaschen

Tag 7: Männchen aus den Kreuzungen entfernen, Weibchen auf frische Flaschen setzen

Tag 8 und folgende Tage: Weibchen auf neue Flaschen überführen, bis sie keine Eier mehr legen

Vorversuch:

Bevor die eigentliche Mutagenese durchgeführt wird, wird in einem Vorversuch die Effizienz der einzusetzenden EMS-Konzentration bestimmt (Xu and Rubin, 1993).

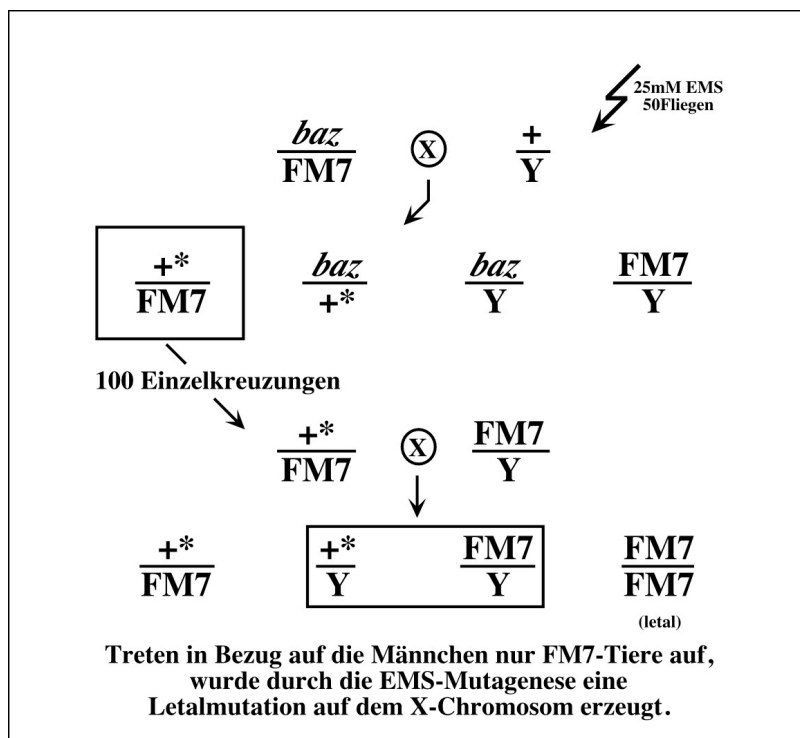


Abb.2.6: Kreuzungsschema für den Vorversuch für die EMS-Mutagenese
 Mutagenisierte Chromosomen sind durch * gekennzeichnet.

Hierzu werden 50 Wildtyp Männchen gesammelt und, wie im obigen Ablaufplan beschrieben, mit EMS behandelt. Anschließend werden diese Männchen mit Weibchen gekreuzt, die eine Letalmutation auf dem X-Chromosom tragen (hier wurden *baz*/FM7 Fliegen eingesetzt) (s.Abb.2.6). Aus der nachfolgenden Generation werden 100 Weibchen gesammelt, die ein mutagenisiertes X-Chromosom und das Balancer-Chromosom tragen, und in Einzelansätzen mit ‚Balancer-Männchen‘ gekreuzt.

Bei der Auswertung der Kreuzung werden nur die männlichen Nachkommen betrachtet. Treten nur balancierte FM7-Tiere auf, wurde durch die EMS-Mutagenese eine Letalmutation erzeugt.

Wurden in 30-50% der 100 Einzelkreuzungen Letalmutationen erzeugt, kann die eingesetzte EMS-Dosis als effizient betrachtet und für den eigentlichen Hauptversuch eingesetzt werden.

Hauptversuch (s.Abb.2.7):

Mutagenese:

Für die eigentliche Mutagenese werden je 500 Männchen wie oben beschrieben mit EMS behandelt. In dieser Arbeit wurden für die Mutagenese Männchen eingesetzt, die auf dem III. Chromosom FRT-Elemente tragen, da dies die nachfolgende klonale Analyse erleichtert.

Zur zusätzlichen Erleichterung der Komplementationskreuzungen nach der Mutagenese wurden die mutagenisierten FRT-Fliegen mit Weibchen des Stamms *Pr,Dr/hs-hid, TM3, Sb* (für genauen Genotyp s. Tab.2.2:) gekreuzt. *Pr,Dr* sind dominante Markergene, anhand derer sich dieses Chromosom verfolgen läßt. Bei dem *hs::hid*-Konstrukt, handelt es sich um eine Zelltod induzierende Mutation, die unter der Kontrolle eines Hitzeschockpromotors steht. D.h. bei einer Hitzeschock von 37°C wird der Promotor aktiviert und das *hid* Gen exprimiert, welches dann zu erhöhtem Zelltod und hierdurch zum Tod des Individuums führt, das dieses Konstrukt trägt.

Selektion:

Aus den Nachkommen der Kreuzung werden Tiere mit mutagenisiertem FRT-Chromosom und dem *hs:hid*-Balancer-Chromosom in möglichst vielen Einzelkreuzungen mit dem Stamm gekreuzt, der eine Mutation in dem Gen trägt, zu welchem neue Allele durch den Screen gefunden werden sollen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierzu der Stamm *Df(3L)R/TM6* (s.Tab.2.2) eingesetzt.

Nachkommen dieser Kreuzung werden im 2.-3.Larvenstadium an zwei aufeinanderfolgenden Tagen für je 2 Stunden in einem 37°C Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt. Hierdurch werden von den vier möglichen Genotypen zwei, die *hs::hid* tragen, eliminiert (s.auch Abb.2.7).

Wenn es sich bei den übrigen Nachkommen nur um TM6-balancierte Tiere handelt, ist durch die Mutagenese eine Mutation in dem gewünschten Bereich induziert worden. Mit diesen Tieren kann dann direkt ein Stamm etabliert werden. In allen anderen findet Komplementation statt, es treten Tiere ohne Balancer auf. Diese Linien können direkt verworfen werden.

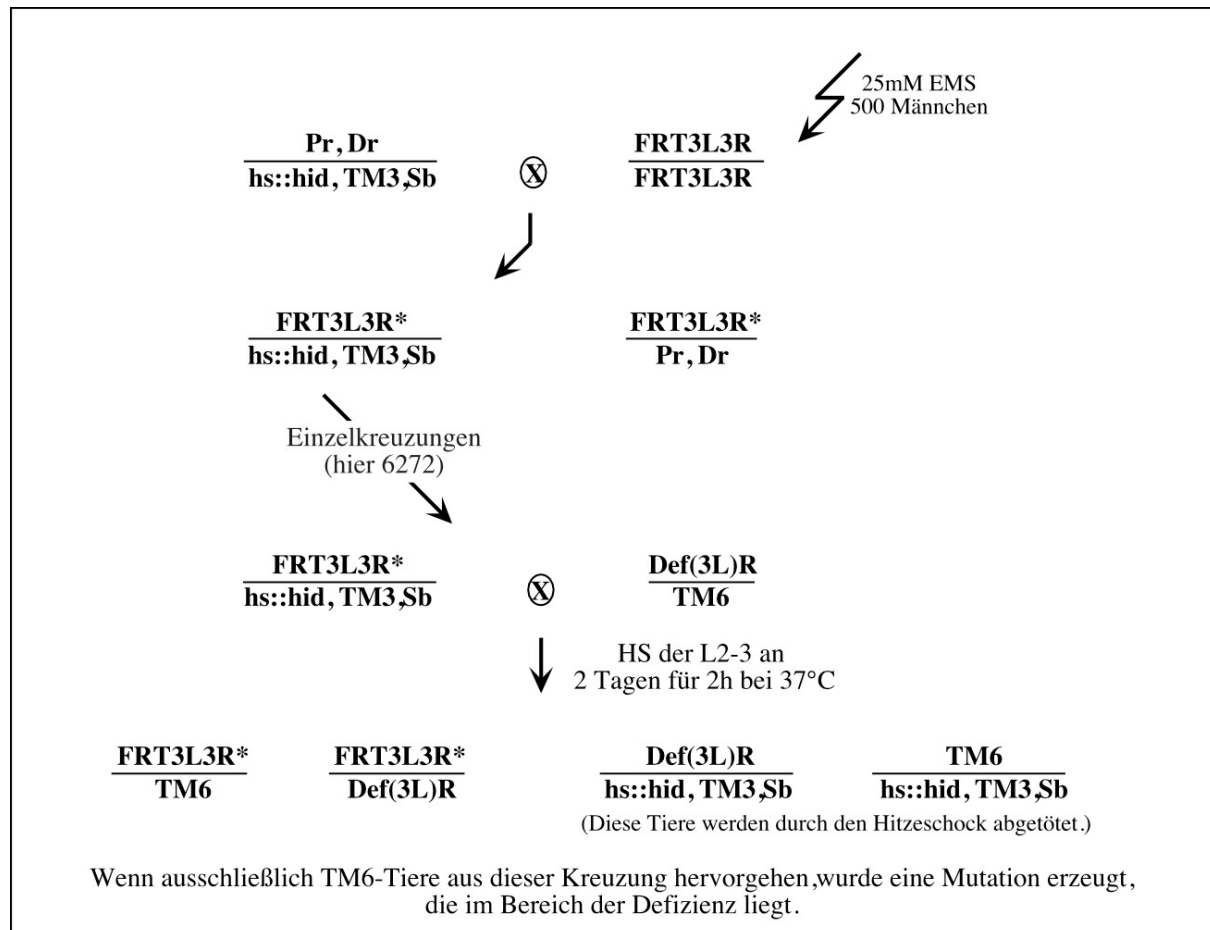


Abb.2.7: Schematische Darstellung des Kreuzungsschema zur EMS-Mutagenese.

2.2.5 Komplementationstest

Zur groben Kartierung der Letal-Mutationen in der untersuchten P-Elementlinie Linie *l(3)5703* wurde die einem Komplementationstest mit Linien einer Defizienzenkollektion („Defizienzen-Kit“), die 70-80% des II. und III. Chromosom von *Drosophila* abdecken, unterzogen (s. Anhang). Hierzu wurden Jungfrauen der P-Linie (P-Element/Balancer) mit Männchen der Defizienz-Linien gekreuzt. Die Nachkommen diese Kreuzung werden auf Tiere untersucht, die kein Balancerchromosom tragen.

Sind diese Tiere lebensfähig, konnte das defizienztragende Chromosom die Mutation komplementieren, d.h. die Mutation liegt nicht in dem Bereich, der in der Defizienz fehlt.

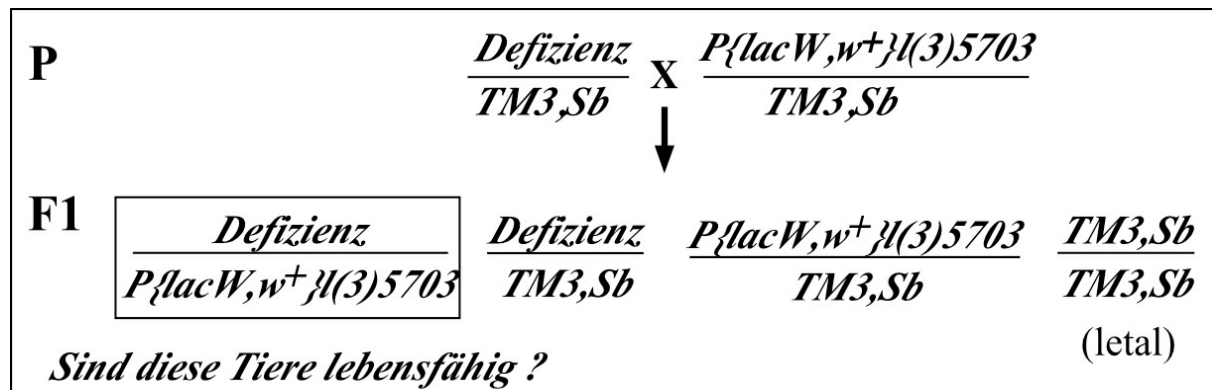


Abb.2.8: Schematische Darstellung einer Komplementationskreuzung.

Jungfrauen der P-Elementlinie werden mit Männchen des Defizienzenstamms gekreuzt. Die Nachkommen dieser Kreuzung werden auf Tiere untersucht, die kein Balancerchromosom tragen. Treten diese Tiere auf, konnte das defizienztragende Chromosom die Mutation komplementieren, d.h. die Mutation liegt nicht in dem Bereich, der in der Defizienz fehlt.

2.2.6 Zellbiologische und Histologische Techniken

2.2.6.1 Kutikulapräparation

Embryonen (Wildtyp älter als 24 h, Mutanten älter als 48 h) werden mit Natriumhypochlorid (ca. 5%) auf den Apfelsaftagarplatten dechorionisiert, in einer Waschflasche mehrfach mit H₂O gewaschen und durch Zugabe von etwas Heptan und Schwenken der Flasche zentriert. Das Heptan wird abgesaugt und die Embryonen mit einem Pinsel auf einen Objektträger in einen Tropfen Hoyers Medium/Lactat (1:1) überführt und mit einem Deckglas eingedeckelt. Die Klärung der Präparate erfolgt über Nacht bei 65° C im Wärmeschrank.

Hoyers Medium:

50 ml ddH₂O mit 30 g Gummi arabicum ü/N rühren
 200 g Chloralhydrat und 16 ml Glycerin zugeben, rühren
 mindestens 3 h bei 12000 g zentrifugieren und Überstand verwerfen
 vor Gebrauch 1:1 mit Lactat gemischt

2.2.6.2 Immunohistochemische Präparate

I. Standardprotokoll für Antikörperfärbungen an Embryonen

- Embryonen für ca. 4 Min in Natriumhypochlorid dechorionisieren, anschließend gut mit H₂O waschen
- Embryonen mit Pinsel in Eppendorfgesäß mit Fixierlösung überführen und 15-20 Min am Über-Kopf-Rotor fixieren
- zum Devitellinieren untere (wässrige) Phase abziehen, durch Methanol ersetzen und 30 Sec kräftig schütteln; Embryonen absinken lassen und Überstand abnehmen
- Embryonen zunächst 10 Min in Methanol inkubieren, dann 3 x 20 Min mit PBT waschen
- Embryonen 1 Std. mit 5-10% normalen Ziegenserum (NGS) (in PBT) "blocken", um unspezifische Antikörperbindungen zu reduzieren
- Primären Antikörper in Blockinglösung verdünnen und über Nacht bei 4°C oder für 2 Std. bei RT inkubieren
- Primären Antikörper abziehen, Embryonen 3 x 20 Min mit PBT waschen
- Sekundäre Antikörper in Blockinglösung verdünnen und für 2 Std. bei RT inkubieren
- Sekundäre Antikörper abziehen, Embryonen 3 x 20 Min mit PBT waschen
- Der Nachweis der Markierung erfolgt entweder durch eine enzymatische Farbreaktion (bei HRP- oder AP-gekoppelten sekundären Antikörpern) oder durch Fluoreszenzmikroskopie bei Fluoreszenz gekoppelten sekundären Antikörpern. Bei der Arbeit mit Fluoreszenzgekoppelten Antikörpern kann an dieser Stelle direkt in Glycerin/Propylgalat eingedeckelt werden.
- Enzymatische Farbreaktion:
Embryonen in Blockschälchen überführen, PBT durch Färbelösung ersetzen und Farbreaktion unter dem Binokular kontrollieren
- Färbelösung abziehen und Embryonen mehrfach mit PBT waschen
- Alkoholreihe zur Entwässerung der Embryonen: je 5 Min in 30%, 50%, 70%, 90%, 96% Ethanol, 2 x 10 Min in 100% Ethanol waschen
- Embryonen in Kanadabalsam (Roth, Karlsruhe) einbetten

Lösungen:

Fixierlösung :	268 μ l PBS 33 μ l Formaldehyd (37%) 300 μ l Heptan
PBT :	1 x PBS mit 0,1% Triton X-100
PBS (10 x):	1,3 M NaCl; 70mM NaHPO ₄ ; 30 mM NaH ₂ PO ₄
Färbelösung :	800 μ l PBT + 200 μ l DAB-Lösung (vorher mit 1-2 μ l 30% H ₂ O ₂ aktiviert)
DAB –Stammlsg.:	1 mg DAB (3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid)/ml in PBS, bei -20°C gelagert
Glycerin/Propylgalat:	75% Glycerin /in H ₂ O 50mg/ml Propylgalat

II. Modifizierungen des Standardprotokolls

Für einige Antikörper muß das oben beschriebene Standardprotokoll modifiziert werden, um das Resultat zu verbessern. Für den Crumbs-Antikörper (cq4) z.B. empfiehlt sich eine 11%ige Formaldehydfixierung (200 μ l PBS; 125 μ l 37%iges Formaldehyd; 300 μ l Heptan), bei anderen Antikörpern, z.B. dem Canoe- oder Bazooka-Antikörper, führt eine Hitzefixierung zur Ergebnisverbesserung.

Hitzefixierung (nach H.- A.J. Müller, 1996) :

- 1-2 ml Triton-Salz-Lösung (3 ml Triton X-100, 40 g NaCl ad 1 l) in einem Szintillationsgläschen im Wasserbad zum Kochen bringen
- restliche Triton-Salz-Lösung auf Eis kühlen
- Embryonen dechorionisieren
- Szintillationsgläschen aus dem Wasserbad nehmen und Embryonen in die heiße Lösung überführen, Gläschen verschließen und einmal schütteln
- schnell eiskalte Triton-Salz-Lösung zugeben, auf Eis stellen bis die Lösung abgekühlt ist (etwa 1 Min)
- Lösung abgießen und Embryonen mit gleichen Teilen Heptan und Methanol devitellenisieren
- weiteres Vorgehen nach Standard- Protokoll (s. 2.2.6.2-I)

Des weiteren wurde bei Färbungen mit dem Bazooka-Antikörper statt PBT Phosphatpuffer pH 7,4 (40,5 ml 0,2 M Na₂HPO₄ , 9,5 ml 0,2 M NaH₂PO₄) für die Waschschrte verwendet.

III. Eingesetzte Antikörper

Tab.2.5a : Verwendete Primärantikörper

Epitop	Organismus	Bezeichnung	Verdünnung	Hersteller/Zitat
βGal	Kaninchen	-	1:5000	Promega
Crumbs	Maus	Cq4	1:5	Tepaß und Knust, 1993
FAS III	Maus	7G10	1:5	Patel et al., 1987
Bazooka	Kaninchen	Baz-N-term	1:500	Wodarz et al., 1999
Neurotactin	Maus	-	1:10	Hartsch et al., 1990
Canoe	Kaninchen	-	1:500	Takahashi, K.
Spectrin	Maus	-	1:30	Branton, D.
Armadillo	Kaninchen	Arm-N-term	1:200	Riggleman et al., 1990

Tab.2.5b : Verwendete Sekundärantikörper

Name	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
Ziege-anti-Maus	HRP (Meerrettichperoxidase)	1:1000	Dianova
Ziege-Anti-Maus	Cy3	1:200	Dianova
Esel-Anti-Kaninchen	Cy2	1:200	Dianova
Esel-Anti-Kaninchen	Cy3	1:200	Dianova
Ziege-Anti-Maus	Cy5	1:200	Dianova

IV. DNA-Fluoreszenz-Markierung mit Yoyo-1

Zur Markierung von DNA in histologischen Präparaten, wurde der Fluoreszenzmarker Yoyo-1 (*Molecular Probes*, Eugene, OR) verwendet.

Während der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wird DNase-freie RNase (200 µg/ml) zu den Embryonen gegeben und diese anschließend mehrfach mit PBT gewaschen. Yoyo (1:10 000) wird für 15 Min hinzu gegeben und die Embryonen danach gründlich mit PBT gewaschen und in Glycerin/Propylgalat eingedeckelt.

VI. Aktin-Färbung mit FITC-Phalloidin

- Embryonen dechorionisieren und in 1:1 8%FA/PBS : Heptan
- In 95% Ethanol : Heptan devitellenisieren
- In PBT waschen
- Nachfixierung für 1,5 Std. in 4% FA in PBT
- Für 3x20 Min in PBT waschen
- FITC-Phalloidin 1:200 in PBT für 1 Std. (oder auch ü.N. bei 4° C)
- Für 3x20 Min in PBT waschen

VII. TAXOL- Behandlung zur Mikrotubulistabilisierung bei alpha-Tubulin-Färbung

- Embryonen dechorionisieren
- Für 30 Sek in der Fixierlösung +Taxol schütteln
- 200 µl 37% FA (bzw. 2 ml 37% FA für starke Fixierung) dazu geben und für 30 Min fixieren
- Embryonen per Hand devitellenisieren (Embryonen auf doppelseitigem Klebeband, auf Objektträger kleben und mit 1 x PBS überschichten; mit spitzer Nadel devitellenisieren)
- Mit PBT waschen; Antikörperfärbung s.o.

Lösungen: Fixierlösung: 2 ml PBS
2 ml Heptan
2 µl Taxol (10m M Taxol sol. in DMSO)

VIII. X-Gal Färbung an Embryonen

- Embryonen dechorionisieren
- 10 Min fixieren in einem Eppendorfgefäß, in 1:1 Formaldehyd (3,7%) : Heptan
- untere, wässrige Phase und Heptanphase abziehen
- 1:1 frisches Heptan : 80% Ethanol hinzu geben und für 30 Sek kräftig schütteln
- devitellenisierte Embryonen sinken auf den Boden. Tun sie dies nicht, 2-3 Tropfen 100% Ethanol hinzufügen und noch einmal kräftig schütteln
- Lösung abziehen und noch einmal 80% Ethanol und in gleichem Volumen PBT dazu geben
- mehrmals mit PBT waschen
- Embryonen in 1 ml Färbepuffer vorinkubieren
- Zur Farbreaktion Embryonen in 1ml Färbelösung für längere Zeit bei 37°C inkubieren.
- Färbung unter dem Binokular kontrollieren und gegebenenfalls Farbreaktion mit PBT abstoppen

Lösungen:

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°C vorwärmen, X-Gal DMSO zugeben und noch einige Min bei 50°C vorinkubieren)

X-Gal Puffer: 0,15 M NaCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM Na-Phosphatpuffer pH 7.2, 3.3 mM K₃Fe(CN)₆, 3,3 mM K₄Fe(CN)₆

2.2.6.3 Nachweis von Zelltod mit Acridin Orange

Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Acridin Orange lassen sich im Zelltod befindliche Zellen markieren.

- Embryonen dechorionisieren und gut mit H₂O waschen
- Einmal in PBS waschen
- Embryonen für 15 min in einer 0,5 µg/ml Acridin Orange in 1x PBS Lösung bei RT inkubieren
- Embryonen in PBS waschen und in Glycerin Propylgalat eindeckeln
- Analyse des Zelltods erfolgt direkt nach Färbung im Fluoreszenzmikroskop

2.2.6.4 Fixierung von Embryonen für die rasterelektronenmikroskopische Analyse (REM)

- Embryonen dechorionisieren
- Fixierung für 30 Min in 1:1 Heptan : 4% PFA in PBS
- Devitellenisierung in 1:1 Heptan : Methanol
- Waschen in 1 x PBS
- Nachfixierung in 2% Glutaraldehyd, 1% Osmium in PBS für 30 Min auf Eis
- Waschen in 1 x PBS
- Nachfixierung in 2% Osmium in PBS für 60 Min auf Eis
- Dehydrierung der Embryonen in einer aufsteigenden Alkoholreihe
- 2 x in 100% Aceton waschen
- Inkubation in 1:1 Aceton : Tetramethylsilane (TMS; Sigma) für 30 Min
- Inkubation in 1:2 Aceton : TMS für 30 Min
- Embryonen in reinem TMS für 30 Min inkubieren, danach ein wenig TMS abziehen und frisches TMS dazugeben (Achtung, Siedepunkt von TMS bei 26°C!)
- Die Proben über Nacht im geöffneten Eppendorfgefäß unter dem Abzug trocknen lassen
- Proben auf Probentellerchen kleben und im Sputter („sputtern“, *Balzer Union*, Balzers, Fürstentum Lichtenstein) mit Gold beschichten

2.2.6.5 Fixierung von Embryonen zur Anfertigung von Semi- oder Ultradünnschnitten für Elektronenmikroskopie

Tag 1:

- Embryonen dechorionisieren
- Fixierung in Fixierlösung 1 für 20 Min
- Embryonen aus Fixaktiv mit kleinem Netz herausfischen und auf doppelseitigem Klebeband auf Objektträger übertragen, kurz antrocknen lassen und mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,2 überschichten
- Embryonen mechanisch mit einer Nadel devitellenisieren
- devitellenisierte Embryonen mit einer Pasteurpipette in ein 3er Blockschälchen überführen

- 2 x mit 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,2 waschen
- Puffer abziehen und für 30 Min in Fixierlösung 2 auf Eis fixieren
- in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,2 waschen
- Nachfixierung in 2% Osmium für 1 Std. auf Eis im Dunkeln
- in H₂O waschen
- Embryonen in 2% Uranylacetat (in H₂O) für 30-60 Min bei RT im Dunkeln inkubieren
- dehydrieren durch die Alkohol-Reihe (50%, 70%, 90%, 96% Ethanol je 5 Min auf Eis, 100% Ethanol 2 x für 10 Min bei RT, Aceton 2 x je 10 Min bei RT)
- Araldit und Aceton (1:1) mischen und Embryonen darin ü. N. bei 4°C inkubieren

Tag 2:

- Aceton unter dem Abzug für ca. 1,5 Std. abdampfen lassen
- Embryonen mit Stecknadelkopf in frisches Araldit überführen und darin für 4 Std. belassen
- Embryonen mit frischem Araldit in Einbettungsform überführen
- Araldit für 48 Std. bei 65° C polymerisieren lassen

Werden nur Semidünnschnitte der Embryonen angefertigt, ist eine Fixierung in 4% Formaldehyd ausreichend. Danach kann direkt mit der Alkohol-Reihe eingesetzt werden.

Die Semi-Dünnschnitte werden mit einer Rasierklinge getrimmt, um möglichst viel Araldit von die Embryonen 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 gellatinisierte Objektträger überführt und durch Backen bei 80°C auf einem Heizblock gestreckt.

Lösungen:

Fixierlösung1: 250 µl 50% Glutaraldehyd
250 µl 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,2
2 ml Heptan

Fixierlösung2: 1% Osmium/ 2% Glutaraldehyd:

A: 500 µl 4% Osmium + 500 µl 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,2

B: 100 µl 50% Glutaraldehyd + 1,15 ml 0,1 M Phosphatpuffer

A+B kurz vor Gebrauch 1:1 mischen

0,1 M Phosphatpuffer pH7,2: 36 ml 0,2 M Na₂HPO₄ + 14 ml 0,2 M NaH₂PO₄ + 50 ml dH₂O

2.3 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 MWG, in Ebersberg durchgeführt.

2.3.1 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 50 µl, das sich aus folgenden Einzelkomponenten zusammensetzte:

X µl	Template DNA (10-100 ng)
5 µl	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
	5 Min	95° C	Denaturierung der DNA
20-35x	1 Min	95° C	Denaturierung der DNA
	1 Min	‚Primer‘-abhängig	Bindung der ‚Primer‘ and die ‚template‘-DNA („Annealing“)
	1-2 Min	72° C	DNA-Synthese („Elongation“)
	6 Min	72° C	finale DNA-Synthese („Elongation“)
	für immer	4° C	Reaktionsende
	Ende		

Neben der Standard-PCR wurde im Rahmen dieser Arbeit vor allem eine modifizierte Methode, die der „Inversen PCR“ (siehe Methoden 2.3.3/2.3.8) 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.

2.3.2 Lokalisation von P-Elementen mittels Inverser PCR

Die Integration von P-Elementen im *Drosophila* Genom kann Mutationen auslösen. Um genau bestimmen zu können, an welcher Stelle das P-Element ins Genom inseriert ist, ist es erforderlich, P-Element flankierende DNA zu amplifizieren und sequenzieren. Die Inverse PCR bietet hierbei einen einfachen Zugang zum betroffenen Genlocus ohne aufwendiges ‚chromosomales Wandern‘. Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR: polymerase chain reaction) (Saiki et al., 1988) ist es möglich, DNA-Sequenzen spezifisch zu amplifizieren. Voraussetzung dafür ist, daß wenigstens ein Teil der zu amplifizierenden Sequenz bekannt ist. Diese Bereiche werden benutzt, um zwei Oligonucleotidprimer zu generieren, die als Startpunkte für die Synthesereaktion dienen. Durch die Inverse PCR können P-Elemente lokalisiert werden, indem eine Restriktionsspaltung der genomischen DNA eines P-Element-tragenden *Drosophila*-Stammes mit einer geeigneten Restriktions-Endonuklease durchgeführt wird, 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 wird.

Die Amplifikation von genomischer DNA kann sowohl über das 5′, als auch über das 3′-Ende des P-Elements erfolgen und ist im folgenden Schema exemplarisch für das 3′-Ende aufgezeigt:

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

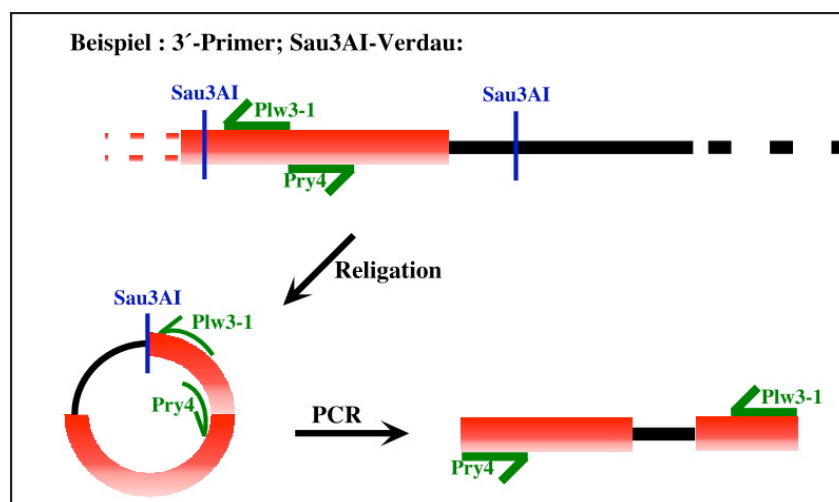


Abb.2.9 : Schematische Darstellung der iPCR mit 3′-Primern nach Sau3AI-Verdau. In Rot ist das P-Element, mit Schwarz genomische DNA markiert. Die Sau3AI-Schnittstellen sind in Blau eingezeichnet und Primerbindestellen mit grünen Pfeilen kenntlich gemacht.

Anmerkung: Eine genaue Karte des 3′-und 5′-Bereichs des P{lacW}-Elements mit allen Enzymschnittstellen und der genauen Primerbindungsstellen befindet sich im Anhang.

2.3.4 Isolierung genomischer *Drosophila*-DNA

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

- 30 Fliegen in Eppendorfreaktionsgefäß sammeln und in flüssigem Stickstoff schockgefrieren
- 200 μ l Puffer A hinzugeben und Fliegen mit Bio-Vortexer (*Biospec Products*, Barlesville, USA) zermahlen, weitere 200 μ l dazugeben und ebenfalls zermahlen
- für 30 Min bei 65°C inkubieren
- nach Zugabe von 800 μ l einer LiCl/Kac-Lsg. zur Fällung der Proteine, mindestens für 10 Min auf Eis inkubieren
- Zentrifugation für 15 Min bei RT und 13000 rpm
- 1 ml des Überstandes in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß übertragen und DNA durch Zugabe von 600 μ l Isopropanol und anschließender Zentrifugation für 15 Min bei RT und 13000 rpm fällen
- Pellet mit 70% EtOH waschen, trocknen und in 150 μ l TE aufnehmen

Lösungen:

Puffer A : 100 mM Tris-HCl, pH 7,5:
 100 mM EDTA
 100 mM NaCl
 0,5% SDS

LiCl/Kac-Lsg.: 1 Teil 5 M KAc: 2,5 Teilen 6 M LiCl

TE 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0

2.3.5 Restriktionsverdau der isolierten genomischen DNA

Zur Spaltung doppelsträngiger DNA werden Restriktionsendonukleasen verwendet. Die Erkennungssequenzen dieser Enzyme bestehen aus Palindromen, wobei jedes Restriktionsenzym eine eigene spezifische Erkennungssequenz besitzt. Wie oft ein Enzym in einem gegebenen DNA-Abschnitt spalten kann, ist von der Länge und Zusammensetzung der Erkennungssequenz abhängig. Im Rahmen dieser Arbeit kamen ausschließlich Restriktionsenzyme des Typ II zum Einsatz, bei denen Bindungs- und Spaltstelle am DNA-Doppelstrang identisch sind.

Folgender Standardansatz wurde für den Verdau gewählt:

10 μ l genomische DNA (das entspricht ca. 2 Fliegen)
2 μ l RNase (100 μ g/ml)
2,5 μ l 10x Puffer
10 units Enzym
ad 25 μ l mit ddH₂O

Dieser Ansatz wurde für 2.5 Std bei 37°C inkubiert und anschließend zur Inaktivierung der Enzyme für 20 Min auf 65°C belassen.

Enzyme und Puffer :

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 Verdaus 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.

Sau3AI (Boehringer, Mannheim); Puffer A

MspI (Boehringer, Mannheim); Puffer L

HinPI (Biolabs, Frankfurt); Puffer 2

2.3.6 Religation der DNA-Fragmente

Die ATP-abhängige T4-DNA-Ligase (Boehringer, Mannheim) ist in der Lage, kompatible DNA-Enden zu verknüpfen. Da hier eine Religation stattfinden soll, wird das Reaktionsvolumen möglichst groß gewählt, um eine Verknüpfung verschiedener Fragmente unwahrscheinlich zu machen.

Folgender Standardansatz wurde für die Ligation gewählt:

10 μ l verdaute genomische DNA
 40 μ l 10 x Ligationspuffer
 350 μ l ddH₂O
 2 μ l T4-DNA-Ligase

Die Inkubation erfolgt stets über Nacht bei 16°C im Wasserbad.

2.3.7 Fällung der religierten genomischen DNA

Zur Nucleinsäure-Fällung wird bevorzugt Ethanol in Anwesenheit von monovalenten Anionen genutzt. Ethanol entzieht der Lösung Wassermoleküle, was zur Aggregation von DNA-Molekülen führt, da keine Hydrathüllen gebildet werden können.

- Zugabe von 2.5 Vol kaltem 96% Ethanol sowie 1/10 Vol 3M Natriumacetat, pH 5,2
- Zentrifugation für 30 Min bei 13000 rpm und 4° C
- Überstand verwerfen, Pellet mit kaltem 70% Ethanol waschen und 10 Min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Pellet trocknen und in geeignetem Volumen TE (für inverse PCR: 150 μ l) aufnehmen

2.3.8 Inverse PCR

Standardansatz:

Die PCR Reaktionsansätze umfassen ein Gesamtvolumen von 50 μ l, das sich aus folgenden Einzelkomponenten zusammensetzt:

	template-Mix	Taq-Mix (je Reaktion)
10 μ l	'template'-DNA (ca. 10 ng)	1 μ l 'Primer' 1 (12.5 mM)
5 μ l	10 x Reaktionspuffer	1 μ l 'Primer' 2 (12.5 mM)
6 μ l	25 mM MgCl ₂	5 μ l dNTP-Mix (je 2 mM)
21 μ l	H ₂ O	1 μ l Taq-Polymerase (5 U/ μ l)

Der Ansatz wird auf Eis zusammenpipettiert, um ein frühzeitiges Starten der Reaktion zu vermeiden.

Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler PTC-200 der Firma *MJ Research*, Watertown, USA durchgeführt.

Tab.2.6 :Standard-Protokoll für die PCRs:

	Dauer	Temperatur	Reaktion
	5 Min	95° C	Erster Denaturierungsschritt
	30 Sec	95° C	Zweiter Denaturierungsschritt
30x wdh.	1 Min	'Primer'- abhängig	Bindung der 'Primer' an die 'template'- DNA ('Annealing')
	2 Min	68° C	DNA-Synthese ('Elongation')
	10 Min	72° C	finale DNA-Synthese ('Elongation')
	Für immer	4° C	Reaktionsende

Im Anschluß an die PCR-Reaktion erfolgte eine gelelektrophoretische Analyse der amplifizierten Fragmente zur Bestimmung ihrer Größe und bei Bedarf eine Aufreinigung mit dem PCR-Purification-Kit (*Genomed*, Bad Oeynhausen). 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 liegt die Größe der Fragmente zwischen 0.5 und 1.5 kb. Sie können 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 oder, wenn sie in genügend hoher Konzentration vorliegen, auch direkt sequenziert werden.

Die Sequenzierung der erhaltenen DNA-Fragmente wurde von der Firma SEQLAB, Göttingen durchgeführt. Mittels Blast-Search konnten die Sequenzen auf Bereiche des Fliegen-genoms zugeordnet werden. Bei Blast Search handelt es sich um ein Computerprogramm (auf der web-Seite des *Berkeley Drosophila Blast Service*: www.fruitfly.org/blast/index.html zu finden), mit Hilfe dessen es möglich ist, vorhandene Sequenzen im Fliegen-Genom zu lokalisieren.

2.3.9 Oligonukleotide

Die folgenden synthetischen Oligonukleotide (*BioTez*, Berlin-Buch) wurden im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt:

Tab.2.7 :Eingesetzte Oligonukleotide zur inversen PCR

Name	Sequenz	Verwendung	Annealing Temperatur
Pry4	-CAA TCA TAT CGC TGT CTC ACT CA	3'-Ende; forward	55° C
Plw3-1	-TGT CGG CGT CAT CAA CTC C	3'-Ende; reverse	55° C
Plac4	-ACT GTG CGT TAG GTC CTG TTC ATT GTT	5'-Ende; forward	60° C
Plac1	-CAC CCA AGG CTC TGC TCC CAC AAT	5'-Ende; reverse	60° C
Pry2	-CTT GCC GAC GGG ACC ACC TTA TGT TAT	3'-Ende; forward	60° C
Pry1	-CCT TAG CAT GTC CGT GGG GTT TGA AT	3'-Ende; reverse	60° C

2.3.10 Sequenzierungen

Zur Sequenzierung der verschiedenen Mutanten wurde zunächst DNA aus einzelnen, homozygot mutanten Embryonen isoliert. Anschließend erfolgt eine Standard-PCR-Reaktion (s. 2.3.1) mit spezifischen Oligonukleotiden, dann eine Aufreinigung der Amplifizierten DNA mit dem PCR-Purification-Kit (*Genomed*, Bad Oeynhausen) und eine Sequenzierung in einem Sequenzierlabor.

2.3.10.1 Isolierung von DNA aus einzelnen Embryonen

Zur Sequenzierung der verschiedenen Mutanten wurde DNA aus einzelnen, homozygot mutanten Embryonen isoliert. Da die Stämme über einen "Blue Balancer" (s. 2.2.2.2) gehalten werden, können homozygot mutante Embryonen über eine X-Gal-Färbung (s. 2.2.6.2 VIII) isoliert werden, da diese Embryonen keine Färbung zeigen.

Aus selektionierten Embryonen wird DNA mittels Chelexlösung (Walsh et al., 1991) isoliert:

- Selektierte Embryonen werden in individuelle Eppendorfgefäße überführt. Die Embryonen können dechorionisiert oder undechorionisiert verwendet werden.

- Embryonen vorsichtig bei 14 krpm zentrifugieren und in flüssigem Stickstoff schockgefrieren. (An dieser Stelle können Embryonen bei -20°C gelagert werden)
- Gefäße bei RT mit 50 μl Chelex-Lösung versetzen
- Gefäße für 10 Min im Wasserbad kochen und anschließend bei 14 krpm zentrifugieren und auf Eis aufbewahren.
- 5-10 μl des Überstands reichen für einen 25 μl PCR-Ansatz

2.3.10.2 Für die Sequenzierung eingesetzte Oligonukleotide

RapnU: 5'- TCT TCT CGG GCG ACT TCT TGT TGA - 3'

RapnL: 5'- CCT GCA TTT TGG GTC TCT TCC - 3'

Annealing Temp.: 59°C

Die Sequenzierungen wurden von der Firma SEQLAB, Göttingen durchgeführt.

2.3.11 Stammhaltung und Kultivierung von Bakterien

Die Anzucht der verschiedenen Bakterienstämme erfolgte in jeweils 3 ml LB-Medium (Luria-Bertani-Medium), das für eine frische Übernachtskultur mit einer Einzelkolonie bzw. 500 μl 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: 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Kanamycin: 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 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 3 ml 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 85.5 mM NaCl
LB-Agar:	LB-Medium 1.5% Bacto-Agar

2.3.12 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.

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

- 3 ml 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
- 1 ml der ü.N.-Kultur für 5 Min bei 5000 rpm abzentrifugieren
- Sediment in 250 µl P1-Lösung resuspendieren
- 250 µl P2 zusetzen, invertieren (Zellen werden aufgeschlossen, Proteine gehen in Lösung und DNA denaturiert)
- 5 Min bei RT inkubieren

- 250 µl P3 zusetzen, invertieren (Neutralisierung der Suspension, Renaturierung der Plasmid-DNA)
- 10 Min auf Eis inkubieren
- 30 Min bei 4° C bei 13000 rpm zentrifugieren, Überstand in frisches Eppendorf-Gefäß überführen und die Plasmid-DNA mit 0.8VT Isopropanol fällen
- 10-15 Min auf Eis inkubieren und 30 Min bei 13000 rpm und 4° C zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Sediment mit kaltem 70% Ethanol waschen und 10 Min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Sediment lufttrocknen und in 20-30 µl dH₂O oder TE aufnehmen

Lösungen:

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

2.3.12.2 „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.

- 50 ml LB-Medium (bei vorliegender Antibiotikaresistenz des Plasmids unter Zugabe des entsprechenden Antibiotikums) mit 50 µl einer ü. N. Kultur animpfen und ü. N. bei 37° C auf einem Schüttler inkubieren
- ü. N.-Kultur für 10 Min bei 4°C und bei 4000 rpm abzentrifugieren

- Sediment in 4 ml E1-Puffer resuspendieren
- 4 ml E2 zusetzen, invertieren (Zellen werden aufgeschlossen, Proteine gehen in Lösung, DNA wird denaturiert und RNA abgebaut)
- 5 Min bei RT inkubieren, leicht schwenken
- 4 ml E3 zusetzen, invertieren (Neutralisierung der Suspension, Renaturierung der Plasmid-DNA)
- 10 Min auf Eis inkubieren (chromosomale DNA und Proteine fallen aus)
- 40 Min bei 4°C bei 6000 rpm 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 5 ml Puffer E6
- Fällern der Plasmid-DNA mit 0.7VT 96% Isopropanol, für 30 Min auf Eis
- 30 Min bei 4°C und 13000rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Sediment mit kaltem 70% Ethanol waschen und 10 Min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Sediment lufttrocknen und in 50-100 µl dH₂O oder TE aufnehmen

Lösungen:

E1-Puffer:	50 mM Tris/HCl, pH 8.0 10 mM EDTA 100 µg Rnase A/ml
E2-Puffer:	200 mM NH 1% SDS
E3-Puffer:	3,2 mM KAc/Essigsäure, pH 5,5
E4-Puffer:	600 mM Na 100 mM NaAc/Essigsäure, pH 5,0 0,15% Triton X-100
E5-Puffer:	800 mM NaCl 100 mM NaAc/Essigsäure, pH 5,0
E6-Puffer:	1.25 M NaCl 100 mM Tris/HCl, pH 8.5

2.3.13 Transformation elektrokompeter Bakterien

Zur Transformation elektrokompeter 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 1 µl der DNA-Lösung zu 50 µl kompetenten Zellen geben, mischen und in vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettieren
- Elektroporation durchführen (bei 1,8 kV), die Bakteriensuspension mit 450 µl SOC auffüllen und in ein Eppendorf-Gefäß überführen
- 1 Std bei 37°C inkubieren
- eine geeignete Menge (50-200 µl) auf einer LB-Amp-Agarplatte (100 µg/ml Ampicillin) ausstreichen und ü.N. bei 37°C inkubieren.

Lösungen:

SOC: 2.0% Bactotrypton
 0.5% Bactoyeast
 10 mM NaCl
 2.5 mM KCl
 10 mM MgCl₂
 10 mM MgSO₄
 20 mM Glucose

LB-Medium: 1% Bactotrypton
 0.5% Bactoyeast
 1% NaCl

LB-Agar: 6.3g Agar / 300ml LB

Ampicillin 100 mg/ml Stammlösung in H₂O

III. Ergebnis

Viele Gene werden sowohl während der Oogenese (maternal) als auch bei der embryonalen Entwicklung (zygotisch) exprimiert. Der Einfluß der maternalen Komponente der Expression eines Gens kann mit Hilfe von Keimbahnklonen (KBK) untersucht werden. In für eine Mutation heterozygoten Weibchen werden durch mitotische Rekombination homozygote Keimzellen erzeugt (s. Material und Methoden). Aus diesen gehen Embryonen hervor, die von der Mutter weder das maternale Genprodukt des betroffenen Gens noch eine Wildtypkopie für die zygotische Expression erhalten. Durch Vergleiche mit dem zygotischen Phänotyp kann der Einfluß der maternalen Komponente untersucht werden.

Die in dem Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur maternalen Kontrolle der Epithelentwicklung von *Drosophila melanogaster* bauen auf Ergebnissen meiner Diplomarbeit (W. Gödde, 2001) auf, wobei auf Ergebnisse einer generellen Suche nach maternal exprimierten Genen von H.-Arno J. Müller und A. Wodarz (nicht veröffentlichte Daten) zurückgegriffen wurde. In diesem "Screen" wurden P-Elementinsertionslinien des II. und III. Chromosoms, deren Mutation in Homozygose zur Letalität führt, darauf untersucht, ob die von der Mutation betroffenen Gene eine maternale Komponente besitzen, die zu Defekten in der Epithelentwicklung führt.

Zu dem Zweck wurden bei den Linien auf jeweils beide Chromosomenarme des II. und III. Chromosoms FRT-Elemente (Flipase recombination targets) rekombiniert. Diese Elemente ermöglichen eine ortsspezifische Rekombination auf dem jeweils linken oder rechten Chromosomenarm. Diese Rekombination wird durch eine, durch Hitzeschock aktivierbare, Flipase (Flp) katalysiert. Der Ort der Rekombination (rechter oder linker Chromosomenarm) kann durch Einkreuzung eines FRT-Elements auf dem entsprechenden Chromosomenarm erfolgen.

Zur weiteren Analyse der P-Elementinsertionslinien wurden Kutikulapräparate von Embryonen, die aus Keimbahnklonen hervorgegangen sind, angefertigt und analysiert. Die Kutikula wird von einigen Epithelien ektodermalen Ursprungs (z.B. Epidermis, Tracheen) sezerniert, und somit reflektiert der Phänotyp der Kutikula die Organisation der Epithelien, die sie gebildet haben.

Für die Frage nach maternalen Komponenten, welche die Epithelentwicklung beeinflussen, wurden Linien ausgewählt, bei denen der untersuchte Kutikulaphänotyp auf eine Störung in der Epithelentwicklung deutet.

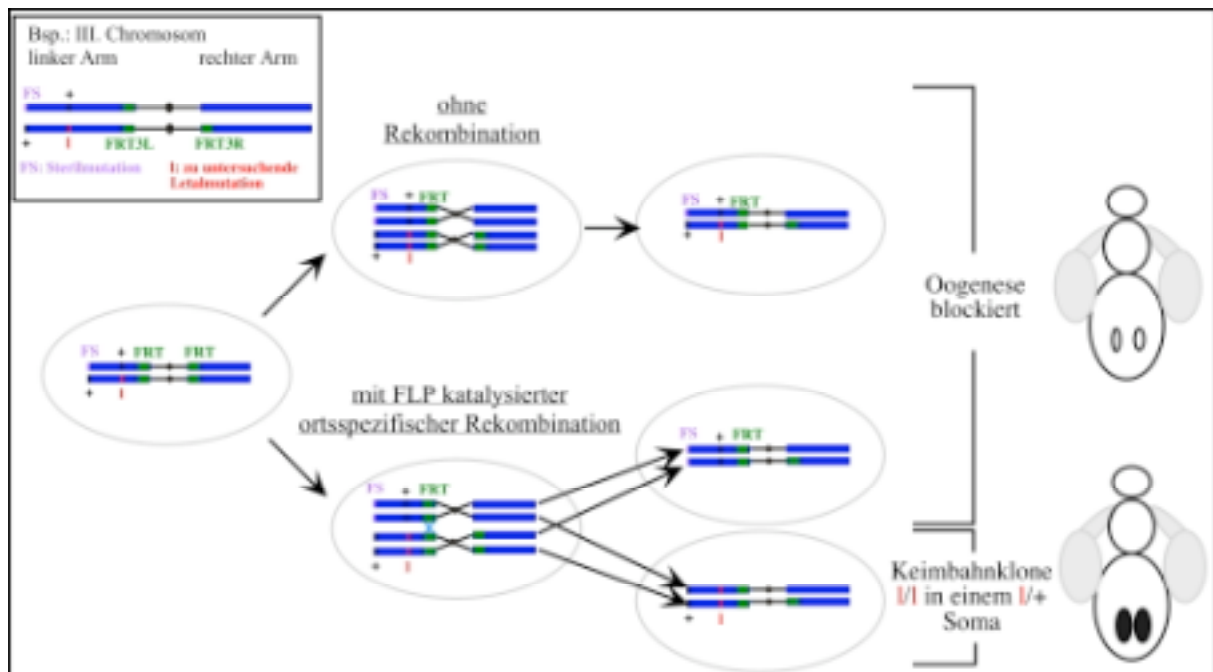


Abb.3.1: Vereinfachtes Schema zur Erzeugung von Keimbahnklonen (KBK) auf dem linken Arm des III.Chromosoms (nach Chou & Perrimon, 1992; genaueres Schema s. Material und Methoden).

Schematische Darstellung des III.Chromosoms, welches nach Kreuzung zum einen die zu untersuchende Letalmutation *I* und *FRT*-Elemente auf sowohl dem rechten als auch linken Chromosomenarm trägt, und zum anderen ein Gegenchromosom, welches die weibliche Sterilmutation *FS* und nur ein *FRT*-Element auf dem linken Chromosomenarm trägt. Somit kann hier nur eine Rekombination auf dem linken Arm des III.Chromosoms stattfinden. Findet keine Rekombination statt (oben), so erhalten alle Tochterzellen eine Kopie der Sterilmutation *FS*, was dazu führt, daß die Oogenese in sich bildenden Ovariolen blockiert ist. Findet durch Hitzeschock induziert und *FLP* katalysiert Rekombination statt, so entstehen zwei Tochterzellklassen (unten): Zum einen welche, die die Sterilmutation tragen und Ovariolen bilden, aus denen keine Eier hervorgehen, und solche, die die Letalmutation in Homozygotie tragen und Eier produzieren können.

Eine Störung in der epithelialen Integrität kann sich z.B. in kleinen Resten von Kutikula äußern. Dieser Phänotyp zeigt sich bei vielen Genen, deren Beteiligung an Aufrechterhaltung epithelialer Polarität bekannt ist, wie z.B. bei den Genen *crumbs* (*crb*) und *stardust* (*sdt*).

Ziel dieser Arbeit ist die genaue phänotypische Charakterisierung der Linien *l(3)5703*. Des weiteren soll das in dieser Linie betroffene Gen identifiziert werden und dessen mögliche Funktion in der Epithelentwicklung analysiert werden.

3.1 Maternaler und zygotischer Kutikulaphänotyp der Linie *Rap1*⁵⁷⁰³

Bei der im Rahmen dieser Arbeit analysierten Linie handelt es sich um die Ausgangslinie *l(3)P5703/TM3*. Da die Mutation, die diese Linie trägt, im Verlauf der Analysen als ein *Rap1*-Allel identifiziert werden konnte, wird diese Linie, diesen Ergebnissen vorgreifend, im weiteren als *Rap1*⁵⁷⁰³ bezeichnet.

Des Weiteren werden Embryonen, die von Weibchen stammen, in welchen *Rap1*⁵⁷⁰³ Keimbahnklone induziert wurden, als „*Rap1*⁵⁷⁰³ KBK“ oder „Keimbahnklon Embryonen“ bezeichnet.

Um entscheiden zu können, ob ein Gen eine maternale Komponente besitzt, muß der Phänotyp von Embryonen, die aus Keimbahnklonen hervorgegangen sind (maternaler Phänotyp), mit dem Phänotyp homozygot mutanter Embryonen (zygotischer Phänotyp) verglichen werden. Ist der maternale Phänotyp stärker als der zygotische, kann davon ausgegangen werden, daß das durch die Mutation betroffene Gen eine maternale Komponente besitzt.

Zur Analyse des zygotischen Phänotyps wurden von Embryonen des Ausgangsstammes *Rap1*⁵⁷⁰³/*TM3* Kutikulapräparate angefertigt und untersucht. Die Analyse des untersuchten Präparates zeigte Embryonen mit einem weitestgehend wildtypischen Kutikulaphänotyp (vgl. Abb.3.3 A und B).

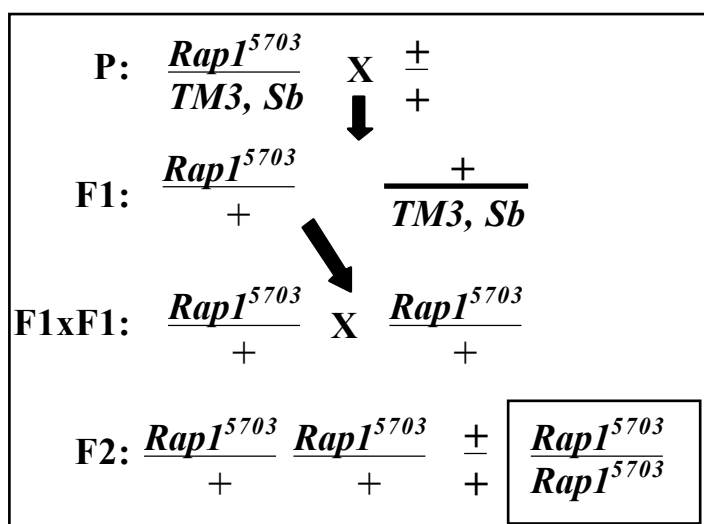


Abb.3.2 : Kreuzungsschema zum „Auskreuzen gegen Wildtyp“

Tiere des zu untersuchenden Stammes (hier: *Rap1*⁵⁷⁰³/*TM3*, *Sb*) wurden gegen Wildtypiere (+/+) gekreuzt (P). Aus der F1 Generation wurden Tiere, die keinen Balancer tragen (zu erkennen an der nicht vorhandenen dominanten Mutation *Sb*) untereinander gekreuzt. Die aus dieser Kreuzung hervorgehenden Embryonen wurden zur Analyse des Phänotyps genutzt.

Um zu klären, ob dieser Phänotyp dem der Mutation entspricht oder evt. auf den Einfluß des Balancers zurückzuführen ist, wurden Tiere des Ausgangsstammes gegen Wildtypen ausgekreuzt (s. Abb.3.2). Da nach Durchführung dieser Kreuzungen keine embryonale, sondern eine larvale Letalität zu beobachten ist, ist der in Abb.3.3 B gezeigte Phänotyp auf den Balancers zurückzuführen, die Mutation führt in Homozygose zur Letalität im Larvenstadium.

Im Gegensatz dazu ist der Phänotyp der Embryonen, die aus Keimbahnklonen (KBK) hervorgehen, als deutlich stärker zu bezeichnen (Abb.3.3 C und D). Die hier auftretenden Phänotypen lassen sich in zwei Klassen unterteilen. Die Hälfte der Embryonen weist einen starken Phänotyp auf, welches durch kleine Reste von Kutikula charakterisiert ist (Abb.3.3 D). Die andere Hälfte zeigt einen abgeschwächten, variablen Phänotyp, der durch Kopfdefekte und anteriore Löcher charakterisiert ist (Abb.3.3 C).

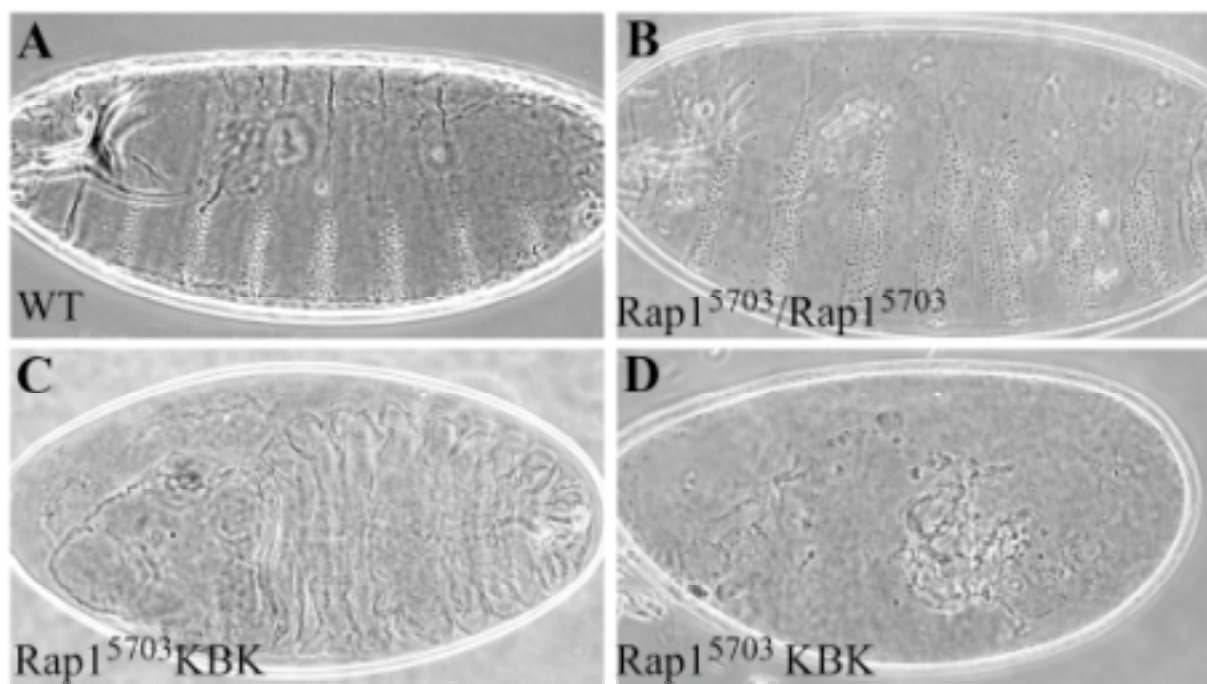


Abb.3.3: Maternaler und zygotischer Kutikulaphänotyp der Linie *Rap1*⁵⁷⁰³.

A zeigt eine wildtypische Kutikula, die durch charakteristische Zähnchenbänder ventral und das anterior gelegenen Kopfskelett gekennzeichnet ist. B zeigt die Kutikula homozygoter *Rap1*⁵⁷⁰³ Embryonen, die weitgehend der wildtypischen Situation gleichen. In C und D sind Vertreter der beiden Phänotypklassen dargestellt, die die Embryonen aufweisen, die von Keimbahnklonen stammen. Die stärkste Klasse (D) zeigt nur noch kleine Kutikularestes. Die abgeschwächte Form (C) zeichnet sich durch eine zusammenhängende Kutikula aus, die nur anterior große Löcher aufweist. Beide Phänotypklassen treten zu jeweils 50% auf.

Der starke Phänotyp ähnelt dem Kutikulaphänotyp, den für *crb* mutante Embryonen zeigen. Kleine Reste von Kutikula (engl. Crumbs) sind erkennbar, welche dem, an Aufrechterhaltung epithelialer Polarität beteiligtem, Gen auch den Namen gaben.

Die Aufteilung der beobachteten Phänotypen in zwei Klassen kann auf die unterschiedlichen Genotypen der Embryonen zurückgeführt werden. Da die Weibchen, in denen die Keimbahnklone induziert wurden, mit Männchen des Ausgangsstammes gekreuzt wurden, erhalten die resultierenden Embryonen vom Vater entweder ein die Mutation tragendes Chromosom oder aber die Wildtypkopie des betroffenen Gens.

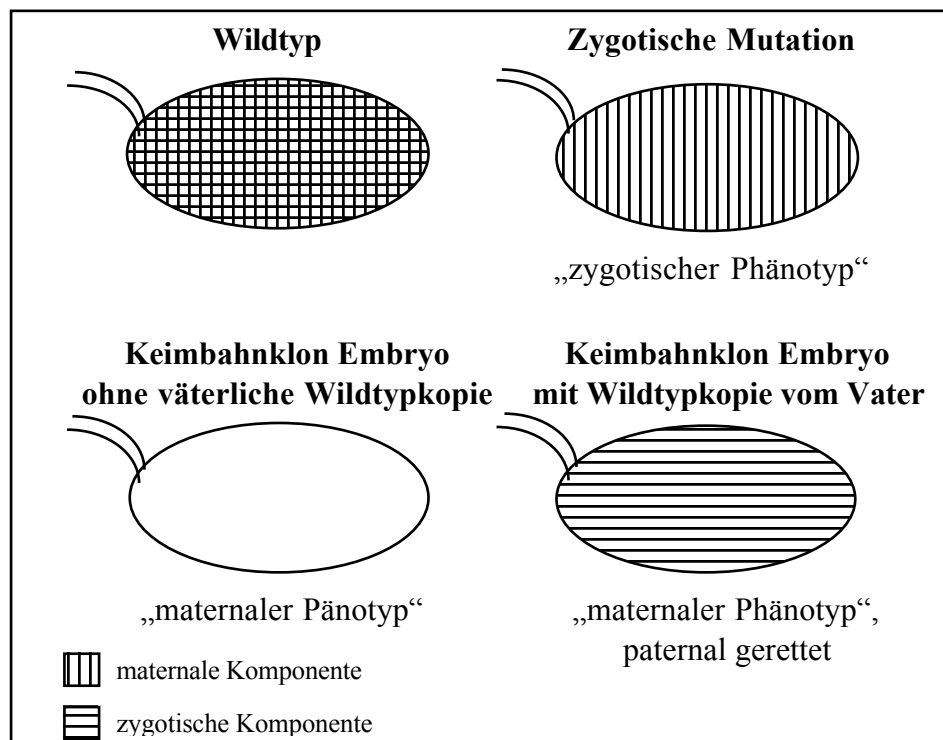


Abb.3.4: Schematische Darstellung der verschiedenen Embryoklassen

In diesem Schema sind die verschiedenen Embryoklassen in Bezug auf das Vorhandensein von maternaler und zygotischer Komponente (Genprodukt) dargestellt. In der obersten Reihe links ist ein Wildtyp Embryo dargestellt, der sowohl die maternale, als auch die zygotische Komponente des Gens X besitzt. Rechts oben ist ein Embryo abgebildet, der für das Gen X mutant ist und diese Mutation homozygot trägt. Dieser Embryo besitzt die maternale Komponente (die Mutter ist heterozygot), aber keine zygotische Komponente. Der beobachtete Phänotyp wird auch als zygotischer Phänotyp bezeichnet. In der unteren Reihe sind Embryonen skizziert, die aus Weibchen hervorgegangen sind, in denen Keimbahnklone erzeugt wurden, und die gegen heterozygot mutante Männchen gekreuzt wurden. Es sind zwei genotypische Klassen zu unterscheiden. Links unten ist ein Embryo gezeigt, der von dem Vater eine mutante Kopie des Gens erhalten hat und somit weder maternale noch zygotische Komponente des Gens besitzt, und somit den rein „maternalen Phänotyp“ ausprägt. Rechts unten ist ein Embryo gezeigt, welcher vom Vater eine Wildtypkopie des Gens erhalten hat und somit keine maternale, aber die zygotische Komponente besitzt. Ist phänotypisch bei diesen Embryonen eine Abschwächung des mutanten Phänotyps zu beobachten, wird von einer „Paternalen Rettung“ gesprochen.

Ist bei den beobachteten Phänotypen eine klare Abgrenzung zweier Klassen möglich, kann davon ausgegangen werden, daß es sich bei dem stärkeren Phänotyp um Embryonen handelt, die vom Vater die Mutation erhalten haben, die also weder das maternale noch das paternale Genprodukt besitzen. Im Gegensatz dazu tritt der abgeschwächte Phänotyp bei Embryonen auf, welche vom Vater eine wildtypische Kopie des betroffenen Gens erhalten haben (paternale Rettung) (s. auch Abb.3.4).

Um zu zeigen, daß es sich bei dem schwachen, variablen Phänotyp um paternal gerettete Embryonen handelt, d.h., daß diese eine wildtypische Kopie des Gens vom Vater erhalten haben, wurden die Weibchen, die KBK tragen, mit Wildtyp Männchen gekreuzt. So entstehen Embryonen, denen die maternale Komponente des Gens fehlt, die aber alle eine Wildtypkopie des Vaters tragen und daher nur den schwachen Kutikulaphänotyp ausbilden sollten.

Wie erwartet zeigen alle Embryonen einen variablen schwachen Kutikulaphänotyp (s. Abb. 3.5).

Die Embryonen zeichnen sich durch leichte (A) Kopfdefekte bis große anteriore Löcher (B) aus.

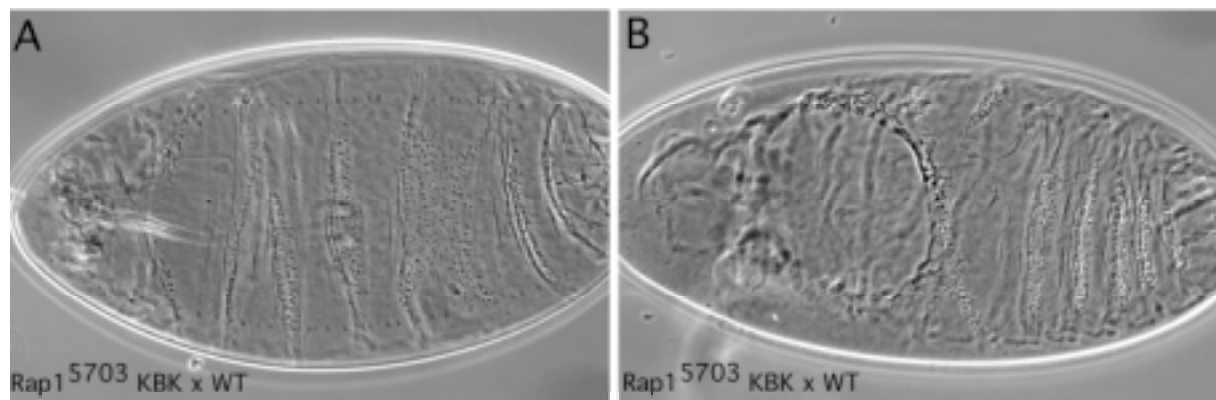


Abb. 3.5: *Rap1*⁵⁷⁰³ KBK Embryonen zeigen einen schwachen Kutikulaphänotyp, wenn sie eine wildtypische Kopie von *Rap1* tragen

Die Abbildung zeigt Embryonen, die aus KBK Weibchen hervorgegangen sind, welche mit Wildtypmännchen gekreuzt wurden. Die Embryonen tragen nur das zygotische, nicht aber das maternale Genprodukt des betroffenen Gens. Diese Situation führt zu einem schwachen Phänotyp, welcher sich durch leichte Kopfdefekte (A) oder auch anteriore Löcher (B) auszeichnet.

Demnach kann davon ausgegangen werden, daß es sich bei Embryonen, die den schwachen Phänotyp zeigen, um paternal “gerettete“ Embryonen handelt.

3.2 Ergebnisse der Komplementationstests durch die *Rap1* als das betroffene Gen identifiziert werden konnte

Die in dieser Arbeit analysierte Linie trägt ein so genanntes P-Element. P-Elemente sind Transposons, die in *Drosophila* zur Mutagenese eingesetzt werden. Ist ein P-Element im *Drosophila* Genom inseriert, kann es durch Mobilisierung (s. auch Material und Methoden) mit Transposase in andere Bereiche im Genom springen und an diesen Stellen Mutationen auslösen. Vorteile der P-Elemente ist, daß sie genetisch verfolgt werden können. Die Elemente tragen eine Kopie des *white* Gens, welches für die Ausprägung der roten Augenfarbe nötig ist. Da die Stämme, in die ein P-Element eingebracht wird, ein mutantes *white* Gen tragen, können Fliegen, die das P-Element tragen, an ihrer roten Augenfarbe erkannt werden. Des weiteren können der Insertionsort, und somit auch das betroffene Gen, durch „inverse PCR“ oder „Plasmid Rescue“ ermittelt werden (s. auch Material und Methoden).

Im Fall der hier untersuchten Linie *l(3)5703* konnte durch inverse PCR das P-Element an der Stelle 100C-100D auf dem rechten Arm des III. Chromosoms lokalisiert werden. Da jedoch der untersuchte Phänotyp durch Induzierung von Keimbahnklonen auf dem linken Arm des 3. Chromosoms erzeugt wurde, kann davon ausgegangen werden, daß das P-Element nicht mehr mit der Mutation assoziiert ist. Dies bedeutet, daß das P-Element bei seiner Mobilisierung durch die Transposase zweimal gesprungen ist.

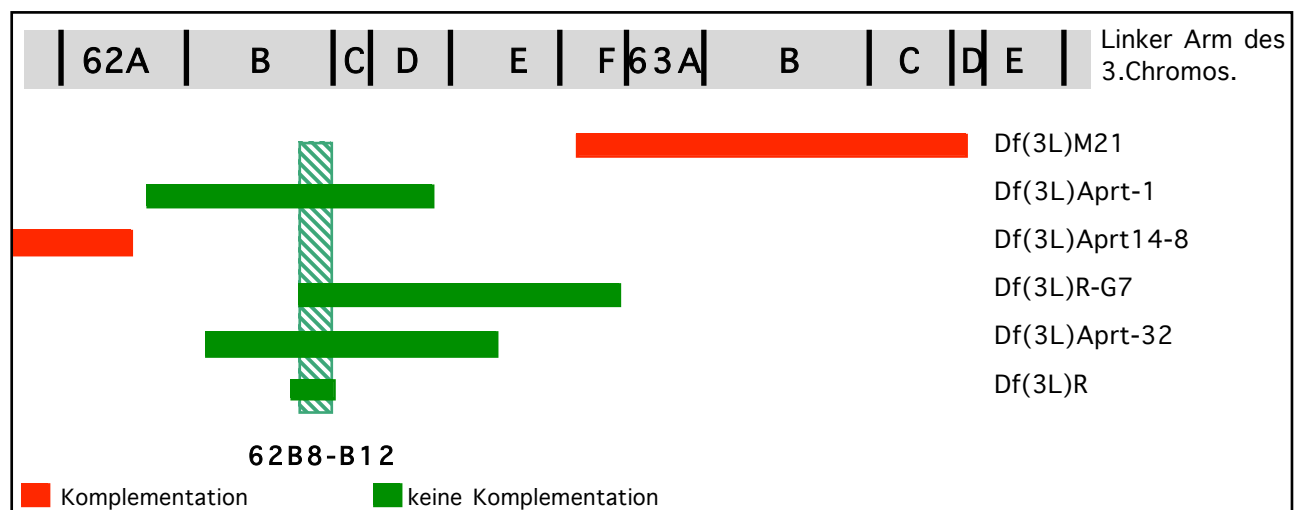


Abb.3.6 :Ergebnis der Komplementation mit Defizienzen des 3. Chromosoms.

Schematische Darstellung des Bereichs 62A-63E des linken Arms des III. Chromosoms. In grau sind die Chromosomenabschnitte markiert. Darunter in grünen und roten wagerechten Balken sind die Regionen markiert, die in den Defizienzen fehlen. Rote Balken stellen Defizienzen dar, die die Mutation der Linie *P5703* komplementieren, in Grün die, die nicht komplementieren. Der grüne senkrechte Balken kennzeichnet den Bereich, in dem laut der Komplementationsanalyse die Mutation liegt.

Um die Mutation zu lokalisieren wurden Komplementationstests mit Fliegenstämmen durchgeführt, die Defizienzen verschiedener Größen auf dem 3. Chromosom tragen, die etwa 80% des Chromosoms abdecken. Durch diese Untersuchungen konnte die Mutation auf die Region 62B8-B12 eingeschränkt werden (s. Abb.3.6).

Die identifizierte Region umfaßt (laut „Annotated Genome GBrowse“) 16 Gene, die durch die Defizienz Df(3L)R abgedeckt werden (s. Abb.3.7).

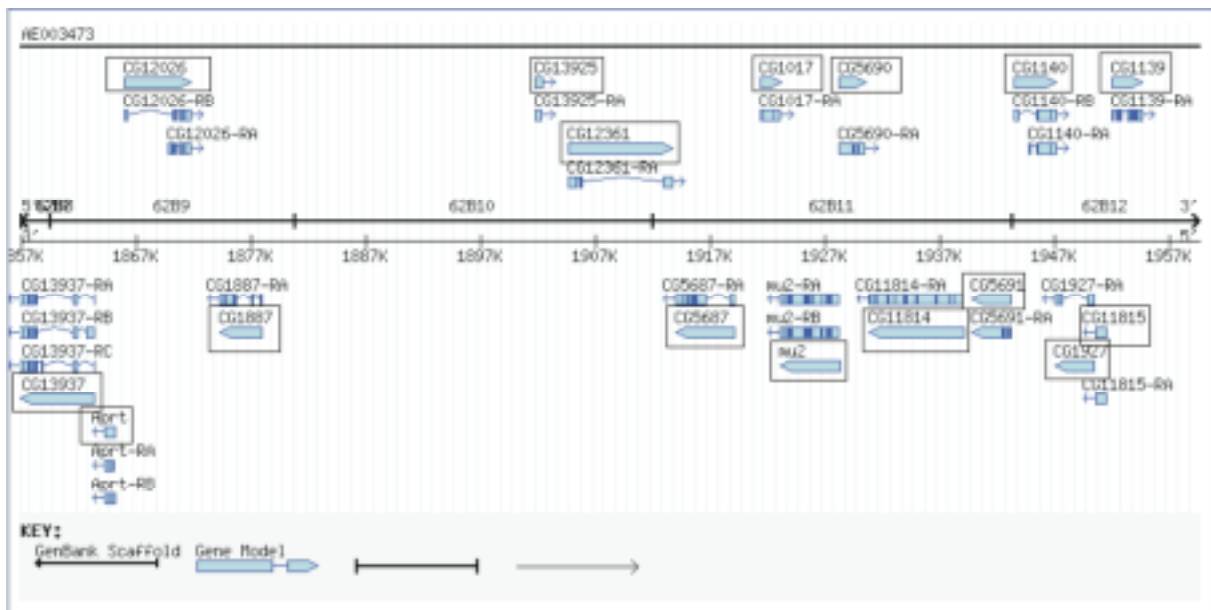


Abb.3.7 : Übersicht über vorhergesagte Gene der Region 62B8-B12 (Annotated Genome GBrowse)

Die Abb. zeigt eine Übersicht über 16 Gene der cytologischen Region 62B8-12, die von „Annotated Genome GBrowse“ vorhergesagt sind. Die Gene sind mit schwarzen Kästchen umrahmt, versch. Splice-Varianten sind darüber bzw. darunter gezeigt.

Durch gezielte Tests mit Stämmen, die Mutationen in Genen der identifizierten Region tragen, bzw. in unmittelbarer Nachbarschaft zu dieser Region liegen (s. Tab.3.1), konnte *Rap1* als das betroffene Gen identifiziert werden.

Aus der nicht erfolgten Komplementation der Stämme *Rap1^{rv(R)B1}* und *Rap1^{rv(R)B3}* mit der Linie *l(3)5703* kann gefolgert werden, daß die Linie eine Mutation im Locus des Gens *Rap1* trägt.

Die Linien *Rap1^{rv(R)B1}* und *Rap1^{rv(R)B3}* sind EMS induzierte Revertanten der dominanten Mutation *Roughened* (R) im *Rap1* Locus (Hariharan, 1991; s. auch Schema Abb.3.8).

Stamm	Lokalisation	Komplementation mit <i>l(3)5703?</i>
<i>Df(3L)Aprt-123</i>	62B8-10; 62B11-C1	Ja
<i>Df(3L)Aprt-27</i>	62B5-7; 62D6-E9	Ja
<i>Df(3L)Aprt-24</i>	62B8-9; 62D2-5	Ja
<i>Df(3L)Aprt-102</i>	62B5-7; 62E6-F1	Ja
<i>P{hsneo}l(3)62Be,red/TM3, Sb</i>	62B9	Ja
<i>Mu2</i>	62B11	Ja
<i>Rap1^{rv(R)B1}</i>	62B7	Nein
<i>Rap1^{rv(R)B3}</i>	62B7	Nein

Tab.3.1: Zur Feinkartierung eingesetzte Stämme und Komplementationsergebnisse

Eine Sequenzierung des *Rap1*⁵⁷⁰³ Allels (s. Material und Methoden), ergab, daß sich im kodierenden Bereich des Gens in diesem Allel keine Mutation befindet. D. h., daß vermutlich ein regulatorisches Element von einer Mutation betroffen ist. Eine dahingehende Analyse steht noch aus.

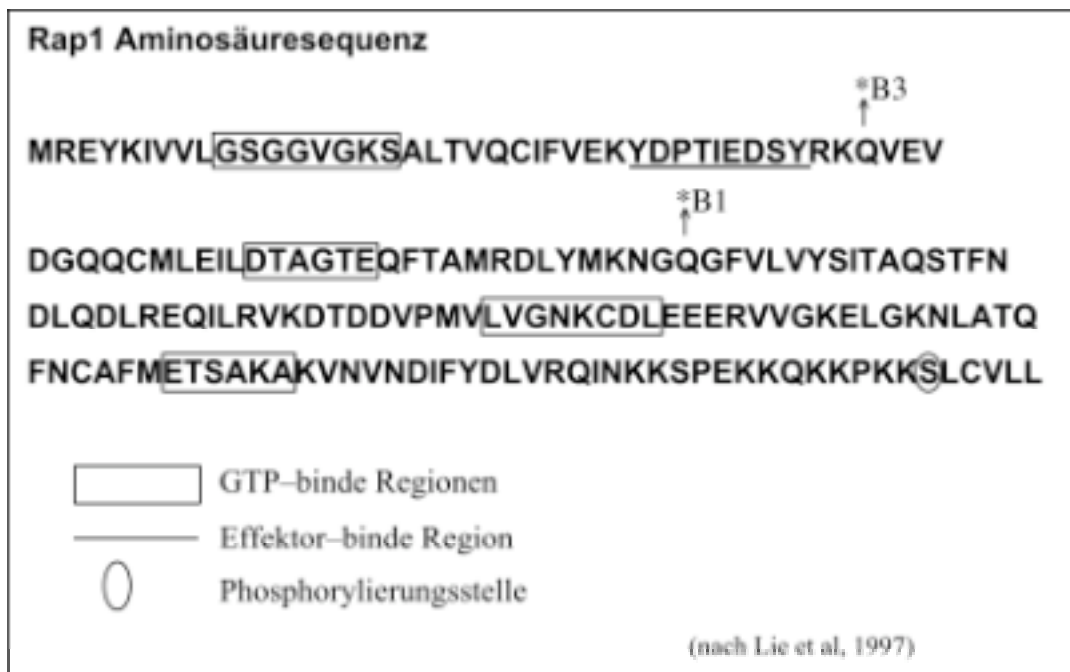


Abb.3.8 : Darstellung der Aminosäuresequenz von *Drosophila* Rap1

In der abgebildeten Aminosäuresequenz sind die vorhergesagten GTP-binde Regionen durch Kästchen umrahmt, die Effektor-binde Domäne ist unterstrichen und eine Phosphorylierungsstelle umkreist. Zwei Mutationen, welche im Rahmen dieser Arbeit für Komplementationstests verwendet wurden, sind mit Pfeil und * gekennzeichnet. Sie repräsentieren Punktmutationen an den markierten Stellen. B1 steht für *Rap1*^{rv(R)B1} B3 für *Rap1*^{rv(R)B3}.

3.3 Analyse der Morphologie anhand von Raster-Elektronen-Mikroskopie (REM)

Die Embryonen bilden am Ende ihrer Entwicklung ihre Kutikula aus, so daß bei der Analyse von Kutikulaphänotypen nur ein erster Eindruck über den terminalen Phänotyp gewonnen werden kann. Daraus kann gefolgert werden, was vermutlich im Endeffekt mit den kutikulasezernierenden Epithelien passiert ist. Es ist keine Aussage über Art und Zeitpunkt von auftretenden Defekten möglich, im Gegensatz zur rasterelektronenmikroskopischen Analyse (REM). Mit Hilfe dieser Methode lassen sich die morphogenetischen Defekte einzelner Entwicklungsstadien der *Drosophila* Embryonen gut identifizieren und analysieren.

Um einen Überblick über die allgemeine Morphologie der *Rap1⁵⁷⁰³* KBK Embryonen zu erhalten, wurden Embryonen mit Hilfe eines Raster-Elektronen-Mikroskop (REM) analysiert und mit Wildtyp Embryonen verglichen (vgl. Abb.3.9 mit 3.10 und 3.11 mit 3.12).

Die ersten Zellen, die aus dem syncytialen Blastoderms hervorgehen und das Entwicklungsstadium 4 (s. Abb. 3.9 A) kennzeichnen, sind die posterior gelegenen Polzellen. Im nachfolgenden Stadium 5 (Abb.3.9 B) findet die Zellularisierung des Embryos statt. In Stadium 6 beginnt die anterior/dorsal gerichtete Keimstreifausstreckung, in dessen Zuge die posterior gelegenen Polzellen in Richtung anterior-dorsalen gelangen. Die Polzellen werden dann im Rahmen der amnioproctodealen Invagination in das posteriore Mitteldarm Primordium eingezogen (s. Abb.3.9 C). Des Weiteren ist das Procephalon und die Kopf- Furche im anterioren Bereich der Embryonen erkennbar. Das Entwicklungsstadium 8 ist durch die beginnende, rapide Keimstreifausstreckung gekennzeichnet. Des Weiteren ist zu diesem Zeitpunkt die Amnioserosa erkennbar, ein dünnes Epithel, welches vom dorsalen Bereich des Blastoderms gebildet wird und den Keimstreif dorsal bedeckt (Abb.3.9 mit weißer Linie umzeichnet).

Die maximale Keimstreifausstreckung wird im Stadium 11 erreicht. Hier sind auch im Bereich des Keimstreifs parasegmentale Furchen (s. Abb. 3.9 D und E) und im anterioren Bereich die Kiefersegmente erkennbar. Gegen Ende dieses Stadiums werden im Bereich des Keimstreifs Tracheengrübchen erkennbar (Abb.3.9 E). In den folgenden Stadien erfolgen der Keimstreifrückzug und die klare Segmentierung des Embryos. Das Ende des Rückzugs wird etwa im Stadium 14/15 (Abb.3.9 F) erreicht. Ab diesem Stadium beginnt der dorsale Schluß des Embryos, der durch dorsale Streckung der lateralen Epidermis erfolgt.

Dabei wird die Amnioserosa von den Epithelzellen überwandert, hierdurch internalisiert und im Innern des Embryos abgebaut.

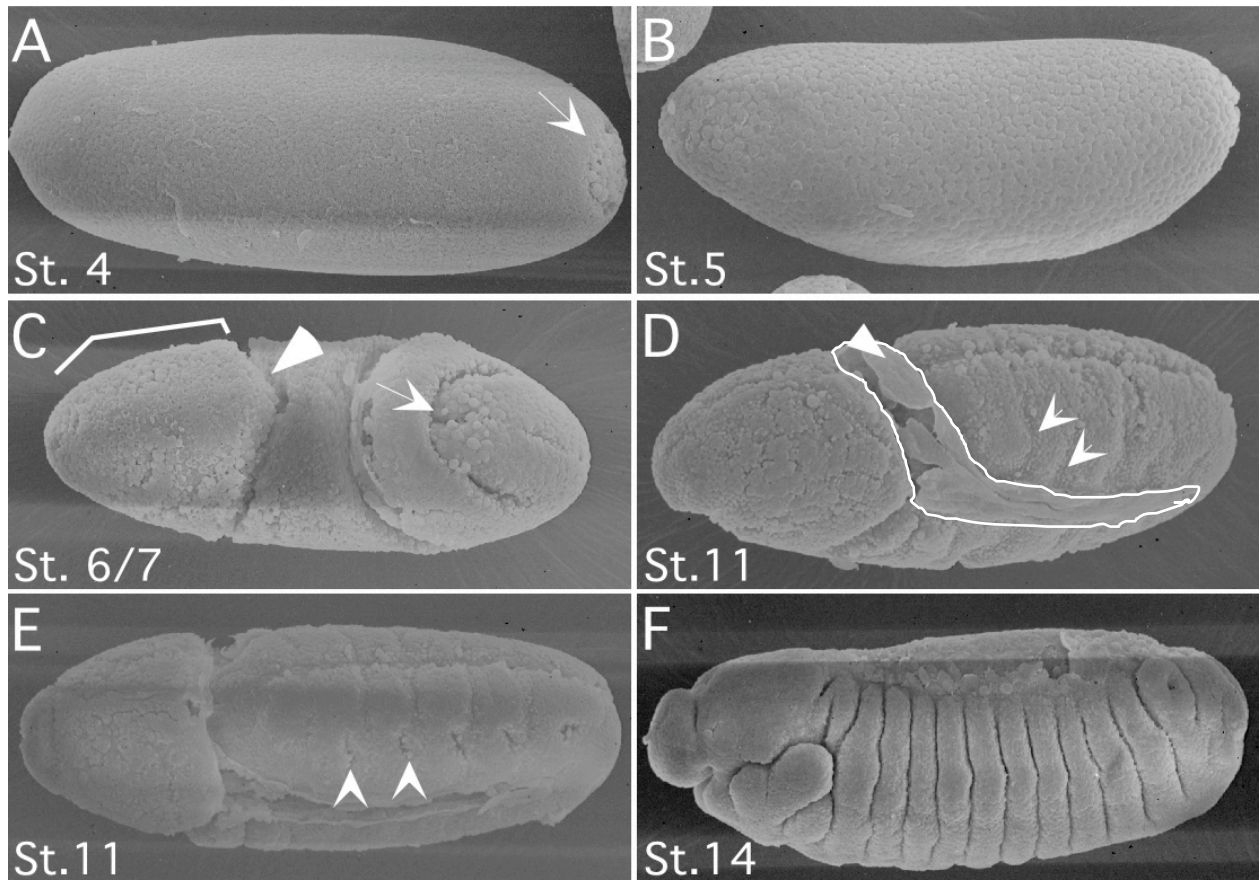


Abb.3.9: Raster EM Aufnahmen von Wildtypembryonen verschiedener Stadien

A zeigt einen Embryo im Stadium 4 kurz vor der Zellularisierung, die Polzellen (Pfeil) haben sich bereits gebildet. In Abb. B ist ein Embryo nach Abschluß der Zellularisierung zu sehen (Stadium 5). Im Stadium 6/7 (C) sind die Polzellen in das posteriore Mitteldarmprimordium gewandert (Amnioproctodeale Invagination; Pfeil rechts); des weiteren sind das Procephalon (Klammer) und die Kopffurche (Pfeilkopf) zu erkennen. Im Entwicklungsstadium 11 (D und E), wird die maximale Keimbandausstreckung erreicht (D); dorsal sind die parasegmentalen Furchen (Pfeile in D) und die Amnioserosa (Pfeilkopf in D, und mit weißer Linie umzeichnet) erkennbar. Im späten Stadium 11 sind die Tracheengrübchen (Pfeile in E) zu erkennen, und im anterioren Bereich bilden sich Strukturen, die später die Mundwerkzeuge formen. Im Stadium 14 (F) ist der Keimstreifrückzug fast beendet. Kopf, Thorax und abdominal Segmente lassen sich unterscheiden; der dorsale Schluß schreitet voran. Die Embryonen sind im Allgemeinen anterior links, posterior rechts, dorsal oben und ventral unten orientiert. Abb. C zeigt eine dorsale Ansicht.

Im Vergleich zu der Entwicklung von wildtypischen Embryonen, ist die Morphologie in *Rap1*⁵⁷⁰³ KBK Embryonen so stark betroffen, daß die Einteilung in die einzelnen Stadien schwierig ist (s. Abb.3.10). In *Rap1*⁵⁷⁰³ KBK Embryonen sind die Stadien vor der Zellularisierung (Stadium 4, s. Abb. 3.10 A), und nach der Zellularisierung (Stadium 5 in B), vergleichbar mit dem Wildtyp, wobei sich in beiden Stadien die Polzellen nicht so klar von den anderen Zellen absetzen wie im Wildtyp (vergleiche Abb. 3.10 A und B).

Kennzeichen der Stadien 6/7 sind die Polzellen, die durch die Keimstreifausstreckung anterior/dorsal ziehen und die im Rahmen der amnioproctodealen Invagination in den Embryo internalisiert werden. Diese sind in den Keimbahnklon Embryonen nur in einigen Fällen ausgebildet (s. Abb.3.10 Pfeil in C), in anderen jedoch nicht erkennbar (s. Abb.3.10 Pfeil in D). Die weiteren Entwicklungsstadien bis Stadium 11 sind durch die Keimstreifausstreckung gekennzeichnet, wobei dann im Stadium 11 die Segmentierung des Embryos erkennbar wird. Da in vielen Embryonen klare Bereiche, wie Keimstreif und Procephalon, nicht erkennbar sind, ist die Zuordnung zu bestimmten Entwicklungsstadien erschwert (s. Abb.3.10 E, G und H). Andere Embryonen, die diese Bereiche zeigen, sind um die eigene Achse verdreht, was an der ebenso verdrehten Lage der Amnioserosa zu erkennen ist (s. Abb.3.10 F und I, weiß umzeichnet). Die Stadien 11-14 sind im Wildtyp durch den Keimstreifrückzug und eine klare Segmentierung gekennzeichnet. Embryonen dieser Stadien lassen sich wiederum erkennen (s. Abb.3.10 K-M). Die Tatsache, daß neben stark betroffenen Embryonen in frühen Stadien wiederum relativ gut erhaltene Embryonen in späteren Stadien auftreten, läßt sich durch die schon in Abschnitt 3.1 eingeführte „paternale Rettung“ erklären. Auch die Tatsache, daß in den Kutikulapräparaten eine Klasse von Embryonen mit einem abgeschwächten Phänotyp auftrat, geht einher mit dieser Beobachtung, daß alte Embryonen mit einer relativ gut erhaltenen Struktur auftreten. Jedoch sind auch in diesen Stadien Defekte in der Morphologie erkennbar. Diese äußern sich in ventralen Löchern (s. Abb.3.10 Pfeil in K; siehe auch Abb.3.11) und einer hevworgewölbten Amnioserosa (Abb.3.10 M).

Abb.3.10 (s. nächste Seite): Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *Rap1*⁵⁷⁰³ Keimbahnklon Embryonen.

Stadium 4 (A), vor der Zellularisierung; Stadium 5 (B), nach der Zellularisierung, wobei in beiden Fällen die Polzellen nicht so klar ausgebildet sind wie im Wt. In Abb. C ist vermutlich, wie in D, ein Embryo im Stadium 6/7 abgebildet. Kennzeichen dieses Stadiums sind die wandernden Polzellen, die im Rahmen der amnioproctodealen Invagination in den Embryo internalisiert werden (s. Pfeile in C und D). Die weiteren Entwicklungsstadien bis Stadium 11 sind durch die Keimstreifausstreckung gekennzeichnet. Im Bereich dieser Stadien sind die Embryonen in E bis I einzuordnen. In den Embryonen in E, G und H ist dies Zuordnung sehr schwierig, da keine klaren Bereiche des Embryos, wie Keimstreif und Procephaleon, erkennbar sind. In F und I ist dies einfacher, jedoch zeigen diese Embryonen eine verdrehte Morphologie (Amnioserosa ist weiß umzeichnet). Die Embryonen in K bis M sind in Stadien der Keimstreifrückziehung, welche durch die klare Segmentierung des Embryos gekennzeichnet sind. Der Embryo in K ist stark in seiner Morphologie gestört, die Segmentierung läßt sich erahnen (Pfeilköpfe), und ein großes Loch in der ventralen Seite ist erkennbar (Pfeil). Im Allgemeinen sind die Embryonen mit anterior links, posterior rechts, dorsal oben und ventral unten orientiert.

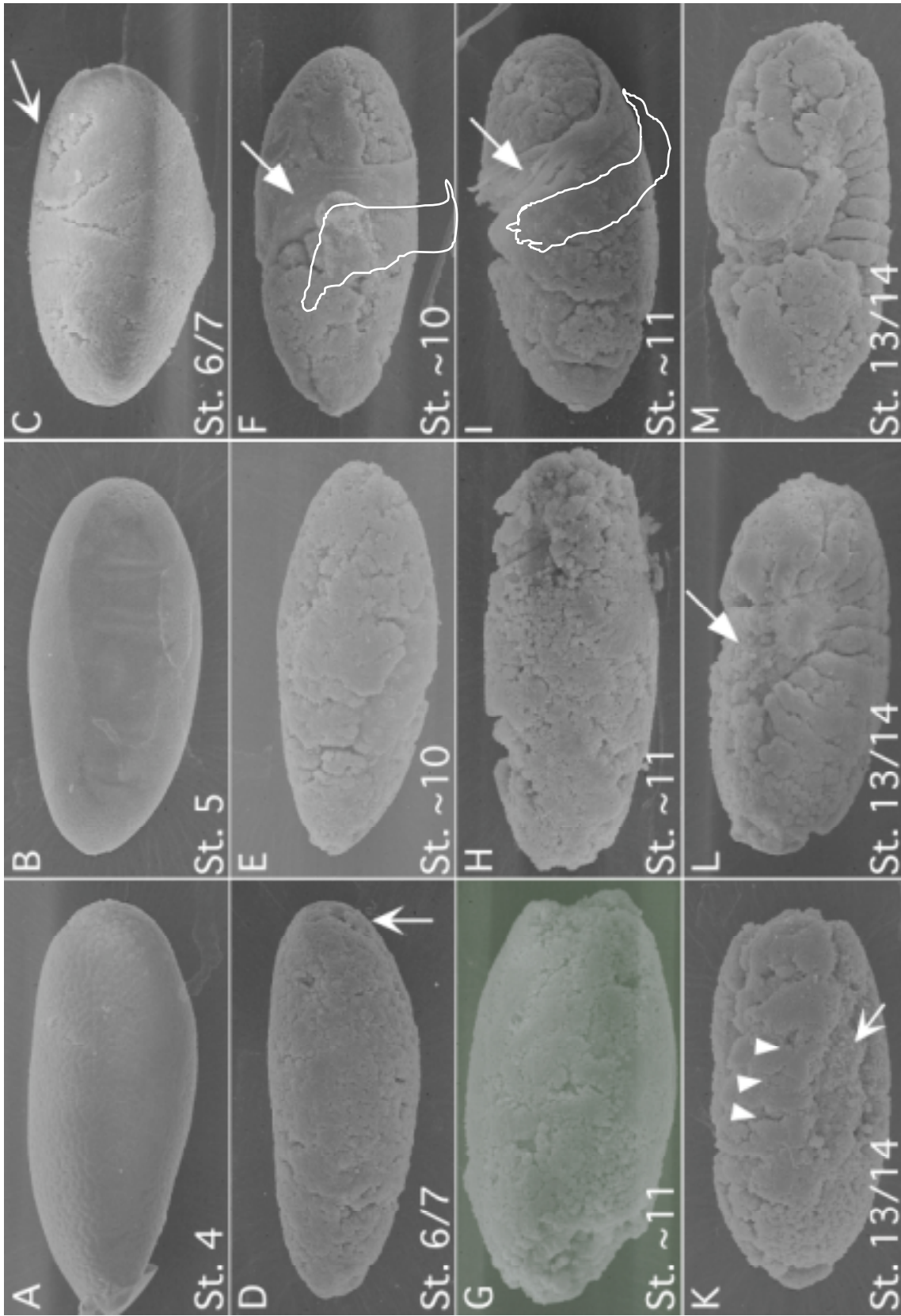


Abb.3.10.: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *Rap1^{57/03}* kBK Embryonen
 Beschreibung s. S. 58

Mit Hilfe der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen kann neben der allgemeinen Morphologie der Embryonen auch die Zellform untersucht werden. In den Wildtyp Embryonen ist bereits nach der Zellularisierung eine regelmäßige Zellanordnung zu beobachten (s. Abb. 3.11 A-C). Im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung bilden die Epithelien typische Furchen, die u. a. zur Segmentierung der Embryonen führen (s. Abb.3.11 F). Während dieser und weiterer morphogenetischer Bewegungen ist ein guter Zellzusammenhalt nötig.

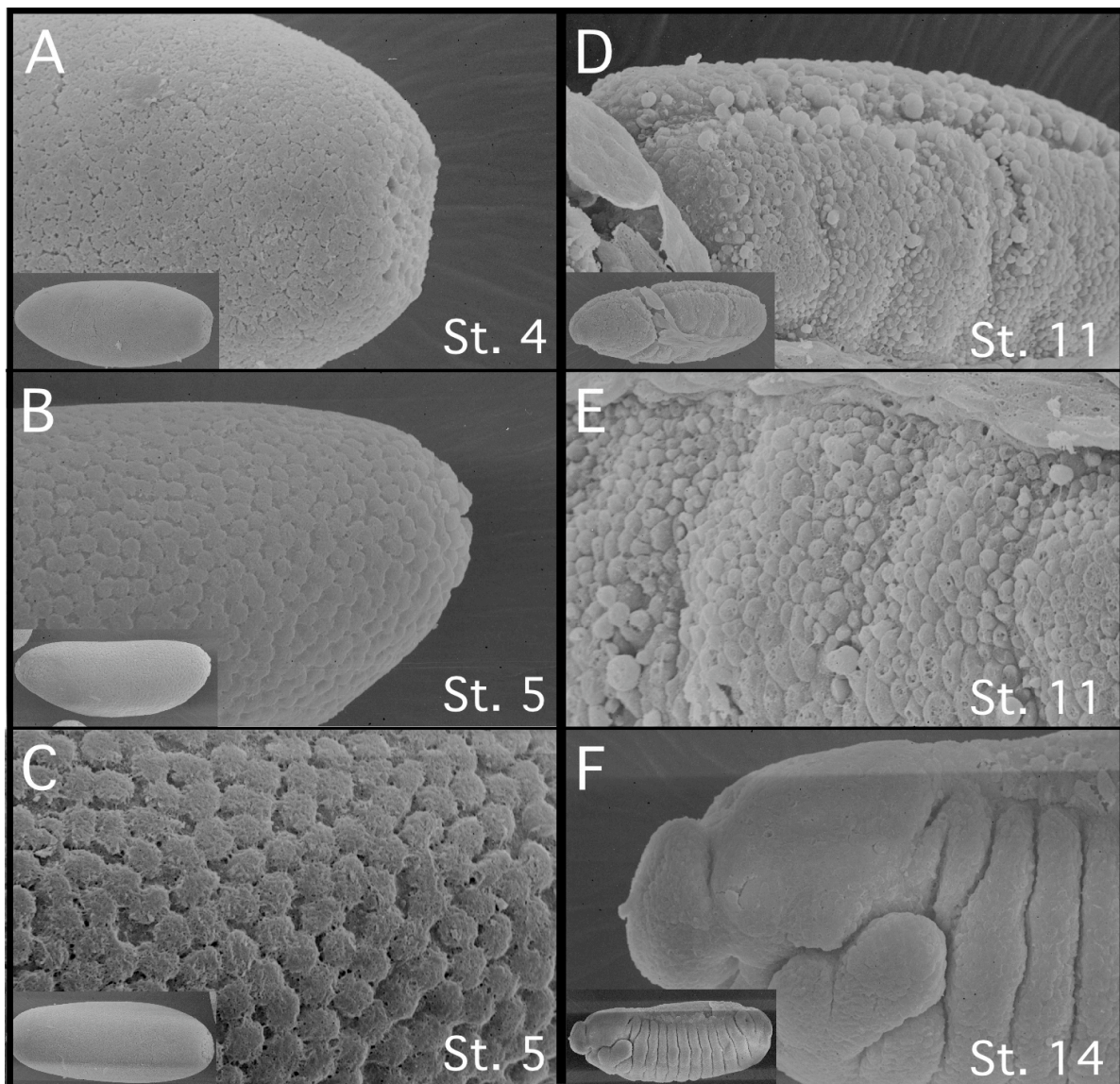


Abb.3.11 : REM-Analyse der Zellform wildtypischer Embryonen

A-F zeigen Ausschnitte aus Wildtyp Embryonen, die entsprechende Übersicht ist jeweils in den kleinen Bildern zu sehen. Nach der Zellularisierung ist eine sehr regelmäßige Zellanordnung zu beobachten (A-C). Im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung bilden die Epithelien typische Furchen.

Im Vergleich dazu sind in *Rap1*⁵⁷⁰³ KBK Embryonen bereits nach der Zellularisierung Veränderungen in der Zellform zu beobachten.

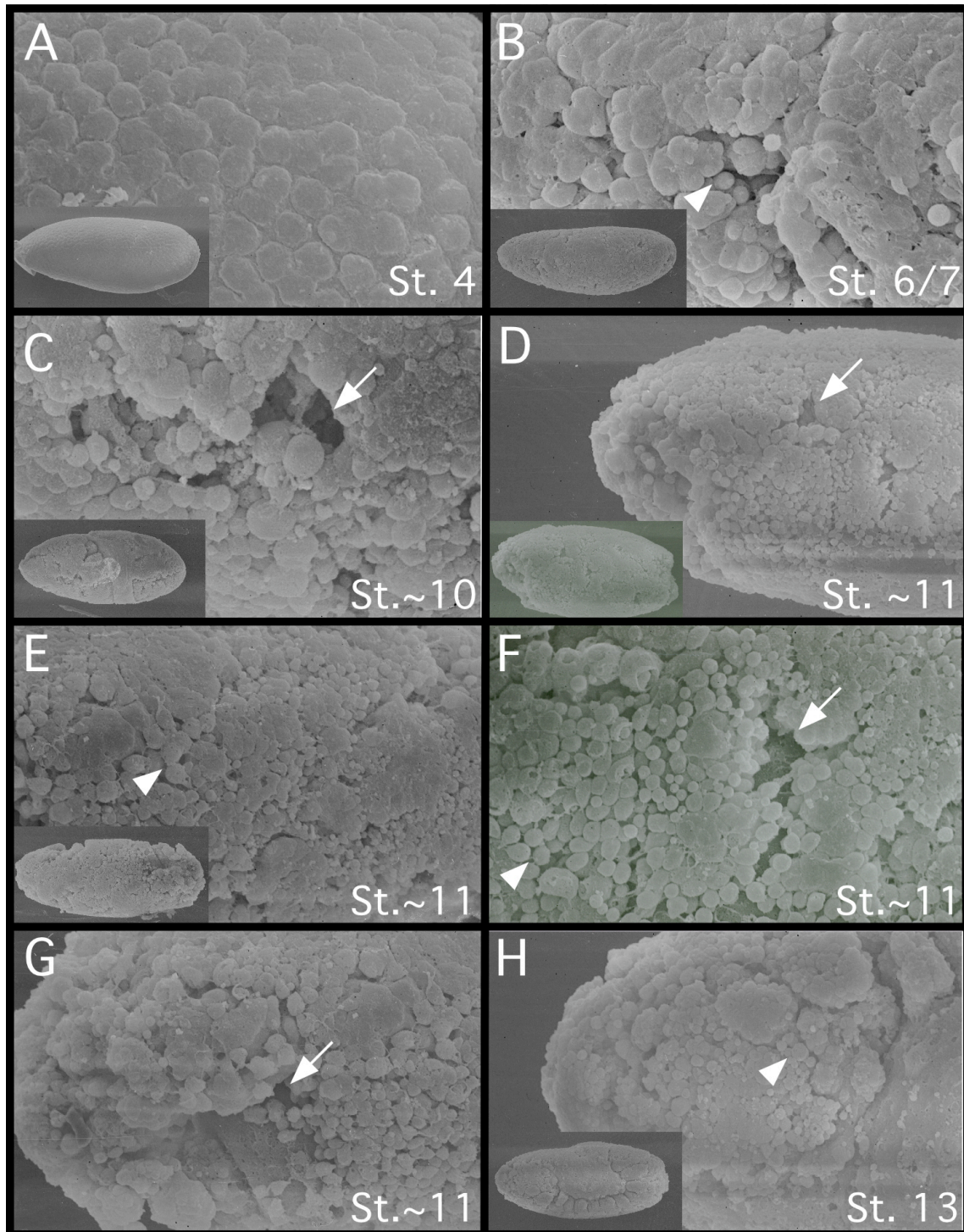


Abb.3.12: REM- Analyse der Zellform von *Rap1*⁵⁷⁰³ KBK Embryonen

A-H zeigen Ausschnitte von KBK Embryonen; die jeweiligen Embryonen sind in den kleinen Übersichtsbildern gezeigt. Die Epithelzellen dieser Embryonen sind weniger regelmäßig angeordnet und scheinen in Gruppen zusammen zu liegen. (A). Zellen verlieren den Kontakt zueinander (Pfeilköpfe in C, E, F und G), die typischen Furchungen sind nicht ausgebildet (E, F, G und H) und die Gewebe weisen viele Löcher auf (Pfeile in B, D, F und G).

Die Zellen sind weniger regelmäßig angeordnet und scheinen in Gruppen zusammen zu liegen. (s. Abb.3.12 A). Im weiteren Verlauf der Entwicklung bilden die Zellen keinen zusammenhängenden Verband mehr (Abb.3.12 Pfeilköpfe in C, E, F und H), die typischen Furchungen sind nicht gut erkennbar (Abb.3.12 E, F, G und H). Viele Zellen liegen abgerundet vor, zeigen keinen Zusammenhalt zu benachbarten Zellen, und in den Geweben sind viele Löcher erkennbar (Abb.3.12 Pfeile in B, D, F, und G).

Anhand der rasterelektronenmikroskopischen Analyse zeigte sich, daß *Rapl*⁵⁷⁰³ KBK Embryonen im Vergleich zu Wildtypembryonen eine stark betroffene Morphologie aufweisen. Bereits nach der Zellularisierung treten Zellformveränderungen auf, und Polzellen werden z.T. nicht vollständig ausgebildet. Im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung kommt es zur Verdrehung der Embryonen sowie zum Verlust des Gewebezusammenhalts.

3.4 Phänotypische Analyse mittels Antikörperfärbungen

Eine Analyse mittels des Rasterelektronenmikroskops ermöglicht einen Überblick über den morphologischen Phänotyp der Embryonen und gibt einen ersten Eindruck über Art und Zeitpunkt der frühesten Defekte. Mittels Antikörperfärbungen ist es nun möglich, den Phänotyp auf zellulärer Ebene zu untersuchen. Dies wird durch den Einsatz von Antikörpern möglich, welche Proteine detektieren, die während der gesamten Embryonalentwicklung von *Drosophila* in spezifischen Geweben und Membrandomänen lokalisieren.

Da der Schwerpunkt unserer Analysen auf der Etablierung und Aufrechterhaltung von Polarität in Epithelien liegt, werden spezifische Antikörper zur Analyse eingesetzt, die gegen Proteine gerichtet sind, welche den verschiedenen Domänen der Epithelzellen lokalisiert sind, und somit als Marker der Polarität dienen.

3.4.1 Untersuchungen in embryonalen Stadien vor der Zellularisierung

Anders als bei den meisten Tierarten findet im *Drosophila* Embryo während der Furchung nur eine Teilung der Zellkerne, nicht aber eine Teilung der Zellen statt, d.h. während der ersten zwei Stunden ist das *Drosophila* Ei ein Syncytium.

Die Mehrzahl der Zellkerne, die bis dahin noch zentral im Embryo lokalisiert waren, wandern während der Teilungszyklen 7-10 zum kortikalen Zytoplasma hin, wo weitere drei synchrone Furchungsteilungen stattfinden. Die Zellkerne sind am kortikalen Zytoplasma perlschnurartig aufgereiht (s. Abb.3.13 A).

Embryonen, die aus *Rap1*⁵⁷⁰³ KBK hervorgegangen sind, zeigen in dieser Zellkernanordnung Abnormalitäten. Die Zellkerne wandern zwar wie im Wildtyp (s. Abb.3.13 A) an das kortikale Zytoplasma, organisieren sich aber unregelmäßig (s. Abb.3.13 B). Die Kerne zeigen nicht den gleichen, regelmäßigen Abstand zum Zytoplasma, und auch der Abstand der Kerne untereinander ist teilweise ebenfalls nicht gleichmäßig (s. Abb.3.13 B, Pfeil).

Zur Visualisierung der ablaufenden Kernteilungen wurden Wildtyp- und KBK- Embryonen mit α -Tubulin Antikörper und Yoyo gefärbt. Bei Tubulin handelt es sich um ein Protein, das den Hauptbestandteil der mitotischen Spindel darstellt; Yoyo markiert die DNA.

Die Kernteilungen laufen in Wildtyp- und KBK-Embryonen gleichmäßig und synchron ab. Bei den mutanten Embryonen zeigen sich in einigen Fällen Unterschiede in den Größen der sich formenden Teilungsspindeln (s. Abb.3.13 F, und H Pfeile), während im Wildtyp alle Spindeln eine vergleichbare Größe aufweisen (s. Abb.3.13 E).

Des Weiteren lässt sich in den KBK Embryonen eine Fehllokalisierung der DNA beobachten. Während sich im Wildtyp die gesamte DNA eines Zellkerns in der Metaphaseplatte anordnet (Abb.3.13 G, K und L), findet sich in den mutanten Embryonen DNA auch an den Spindelpolen (Abb.3.13 H, N und O Pfeile).

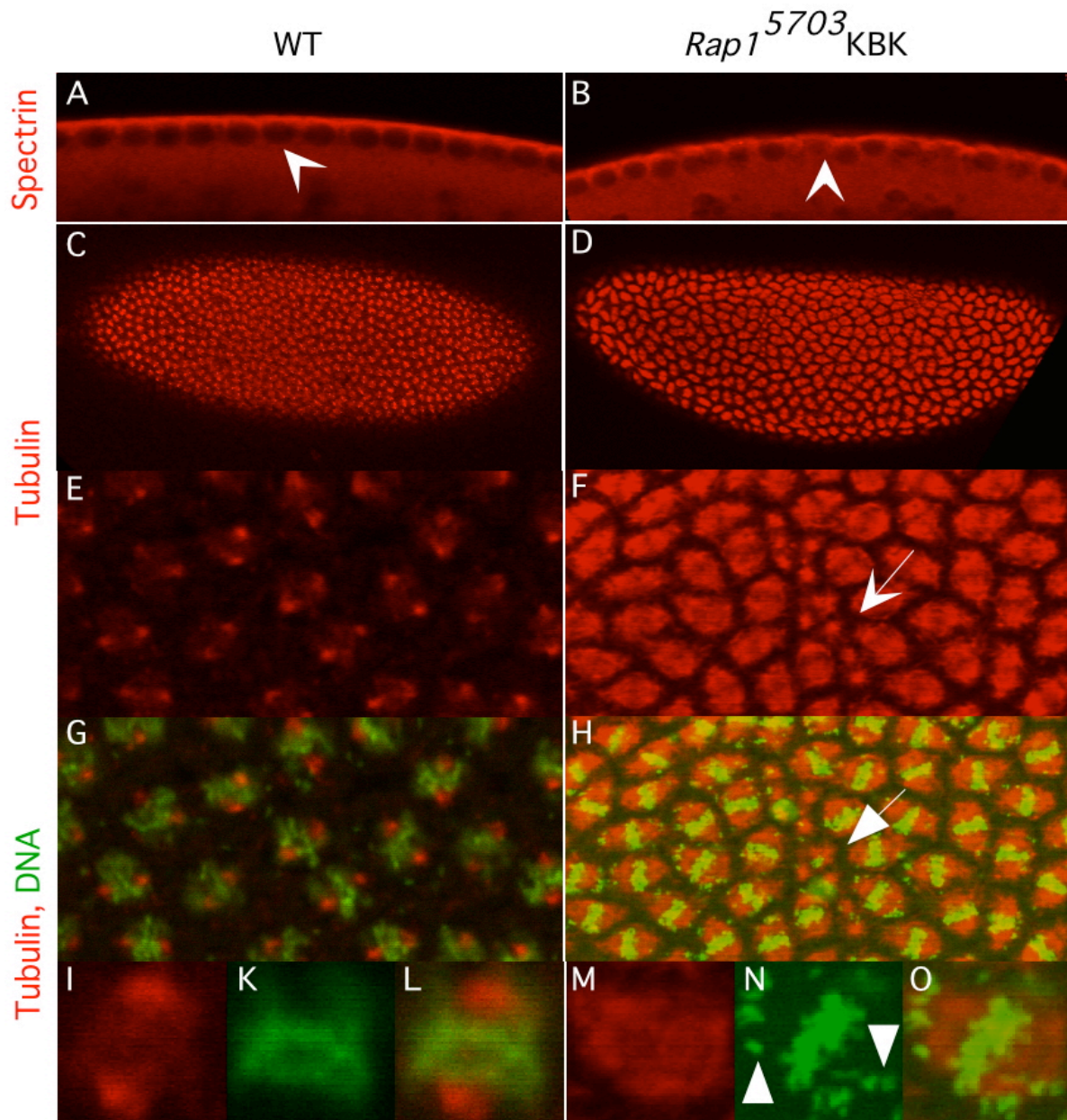


Abb.3.13: Untersuchungen zur Zellkernlokalisierung und Kernteilungen vor der Zellularisierung

WT Embryonen (A, C, E, G, I-L) im Vergleich zu $Rap1^{5703}$ KBK Embryonen (B, D, F, H, M-O). A und B zeigen \square -Spectrin Färbungen, in den übrigen Abbildungen ist DNA in Grün (Yoyo) und \square -Tubulin in Rot markiert. Im Vergleich zum Wildtyp (A) sind in KBK Embryonen die Zellkerne vor der Zellularisierung nicht regelmäßig am kortikalen Zytoplasma angeordnet (B, Pfeil). Auch während der Kernteilungen finden sich in den KBK Embryonen Unregelmäßigkeiten. Zum einen lassen sich Unterschiede in der Spindelgröße (F, Pfeil) beobachten, und zum anderen ist die DNA zusätzlich an Spindelpolen angeordnet (H und N, Pfeile).

Abb. C und D, zeigen Embryonen in der Übersicht, E-O entsprechende Vergrößerungen der Kerne in der Metaphase. A und B zeigen Querschnitte der Epidermis.

3.4.2 Analyse von Defekten während der Zellularisierung

In der Embryonalentwicklung von *Drosophila* wird der Embryo nach den 13 Kernteilungen, die an der Peripherie des Embryos ablaufen, zellularisiert. Während dieses Vorgangs werden neue laterale Membranen zwischen die Kerne gebildet, die sich schließlich basal der Kerne verbinden.

Während der Zellularisierung ist das Armadillo Protein an der Front der einwachsenden Membran der sich bildenden Zellmembran, an den basalen Zellverbindungsstrukturen, lokalisiert (s. Abb.3.14 A und C). Erst nach Abschluß der Zellularisierung ist es in der apikalen *zonula adherens* zu finden. In den mutanten Embryonen ist Armadillo ebenfalls, wie im Wildtyp, an den *basal junction* lokalisiert (Abb.3.14 B und D). Jedoch ist in den Keimbahnklon Embryonen die Zellform gegenüber dem Wildtyp verändert (vgl. Abb.3.14 A, C und E mit B, D und F). Dies ist anhand des Markers Neurotactin erkennbar, der an den wachsenden Membranen lokalisiert ist und somit die Zellform markiert. Die sich im Wildtyp bildenden Zellen zeigen eine regelmäßige Form, was die Länge in der apikobasalen Richtung und die Breite der Zellen betrifft. Die Zellen der *Rap1*⁵⁷⁰³ KBK Embryonen bilden in der fortschreitenden Zellularisierung eine unregelmäßige Form aus. Zum einen zeigen die sich bildenden Zellen eine unterschiedliche Länge in apikobasaler Richtung, zum anderen variieren sie in der Breite. Auch erscheint die Neurotactin-Lokalisation im apikalen Bereich der Zellen diffuser als im Wildtyp, ist aber im lateralen Bereich normal lokalisiert.

Ein Protein, welches früh den apikalen Bereich, apikal der zukünftigen *zonula adherens*, markiert, ist Bazooka (Baz). Auch in der Lokalisation dieses Proteins zeigen sich in den mutanten Embryonen Abweichungen von der wildtypischen Situation. Bei fortgeschrittener Zellularisierung ist Baz im Wildtyp-Embryo klar im subapikalen Bereich lokalisiert (Abb. 3.14 E). In den Keimbahnklon Embryonen ist Baz im gesamten apikalen Bereich der sich formenden Zellen diffus verteilt (Abb.3.14 F).

Zusammenfassend zeigen die sich bildenden Zellen in Keimbahnklon Embryonen während der Zellularisierung Unregelmäßigkeiten in Länge und Form, während die untersuchten Marker der verschiedenen Membrandomänen an den richtigen Domänen, wenn auch diffuser, lokalisiert, sind.

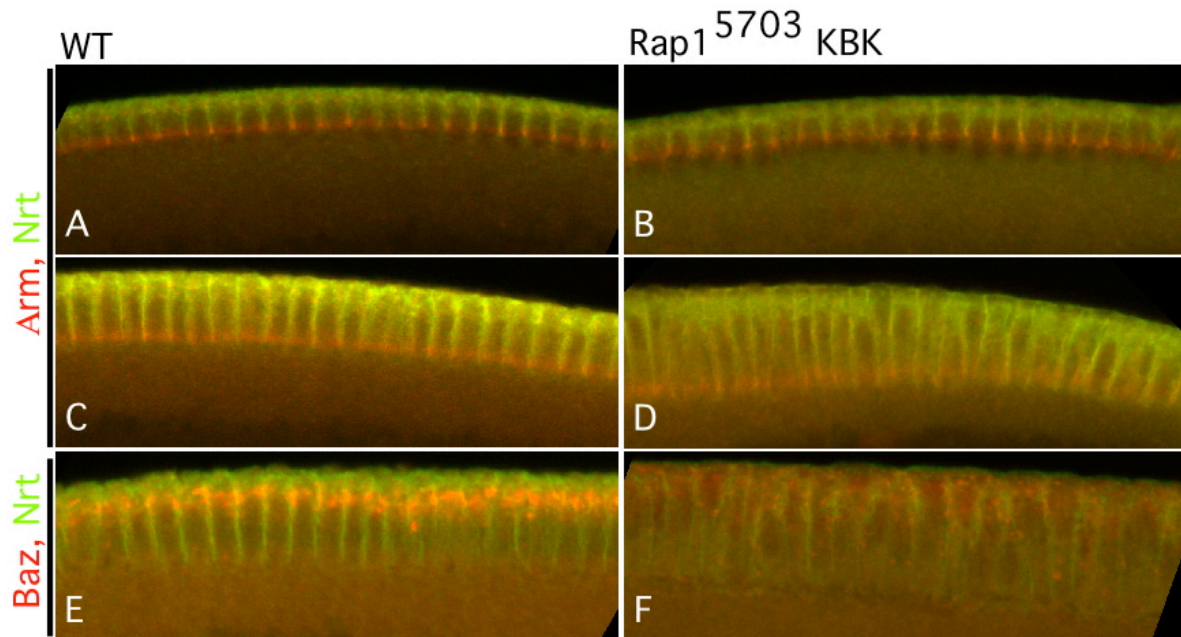
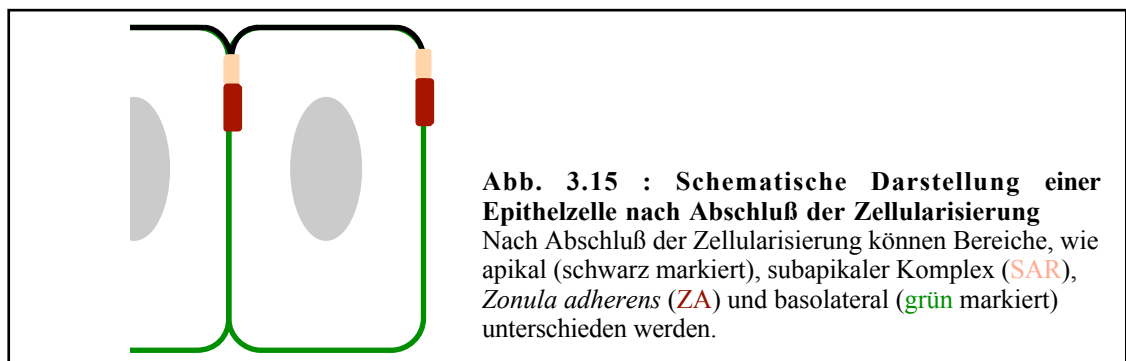


Abb.3.14: Untersuchung des mutanten Phänotyps während der Zellularisierung

A, C und E dokumentieren die fortschreitende Zellularisierung in Wildtypembryonen; B, D und F die in *Rap1⁵⁷⁰³* KBK Embryonen. A-D zeigt eine Markierung der **Armadillo** und **Neurotactin** Proteine; E und F **Bazooka** und **Neurotactin**. Arm ist während der Zellularisierung an den basalen Junction der fortlaufenden Front einziehender Zellmembranen lokalisiert (A und C). Diese Lokalisation ist in *Rap1⁵⁷⁰³* KBK Embryonen nicht gestört (B und D), dort sind jedoch eine Änderung der Zellform und eine unregelmäßig voranschreitende Front erkennbar (D). Baz ist im Wt (E) apikal, in der Region der sich formenden ZA, angereichert. In den KBK Embryonen (F) ist Baz sehr diffus im apikalen Drittel der sich bildenden Zellen zu finden.

3.4.3 Untersuchungen zur Zellpolarität während der Gastrulation

Nach Abschluß der Zellularisierung läßt sich der polare Aufbau der Epithelzellen von *Drosophila* durch Antikörperfärbung gegen Proteine, die mit bestimmten Regionen der Membran assoziiert sind, verdeutlichen. Als verschiedene Zellkompartimente können die laterale Membran, der basale, apikale und subapikale Bereich, und die *Zonula adherens* (ZA) unterschieden werden (Abb. 3.15).



Im Wildtyp wird die laterale Membran in frühen Stadien durch Neurotactin (Nrt) markiert (s. Abb.3.16 C und L), und die Position der ZA kann z.B. durch eine Färbung gegen das Protein Canoe (Cno) verdeutlicht werden (s. Abb.3.16 D und M).

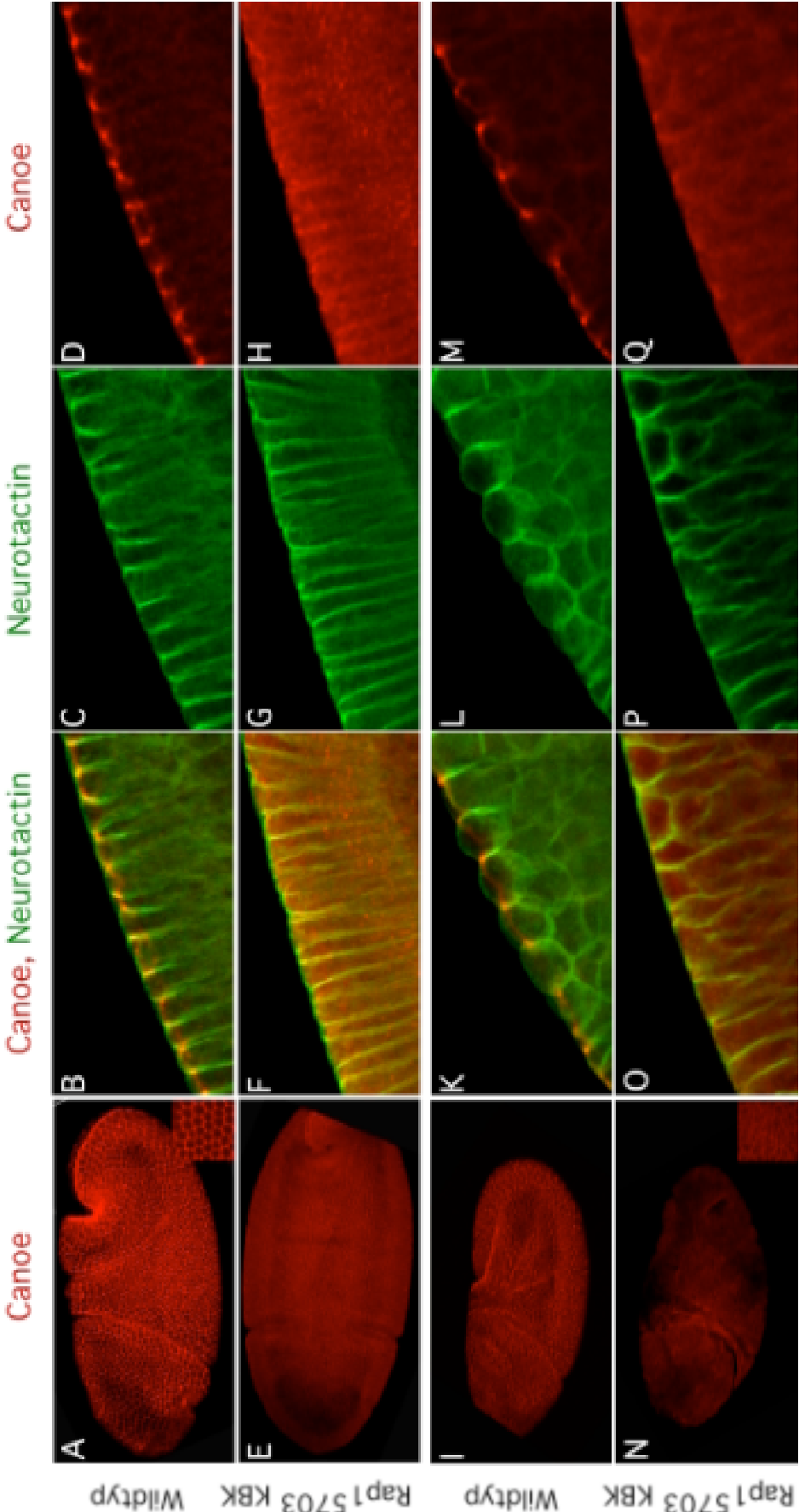
In wildtypischen Embryonen ist die klare apikale Cno Lokalisation und das lateral lokalisierte Nrt in verschiedenen Stadien (Stadium 6, A-D und Stadium 9/10 I-M) erkennbar. Des Weiteren ist in der Aufsicht ein klares hexagonales Muster in Bezug auf die apikale Cno Lokalisation erkennbar (Abb.3.16 A, Ausschnittsvergrößerung). Im Vergleich dazu ist in *Rap1*⁵⁷⁰³ KBK Embryonen die Cno Lokalisation betroffen. Das Protein ist sehr diffus verteilt und nicht mehr nur an der Membran, sondern auch im Zytoplasma der Epithelzelle zu finden (s. Abb. 3.16 H und Q). Des Weiteren ist auch in der Aufsicht (E und N) kein hexagonales Muster erkennbar.

Die Nrt-Verteilung scheint im Vergleich dazu in den mutanten Embryonen wie im Wildtyp, wobei eine Ausdehnung der Expressionsdomäne nach basal im Stadium 6 (vgl. Abb.3.16 C u. G) erkennbar ist. Des Weiteren ist in den Keimbahnklon Embryonen anhand der Nrt-Färbung eine Veränderung in der Zellform erkennbar (vgl. Abb.3.16 C. u. L mit G u. P). In den betrachteten Stadien erscheinen die Epithelzellen der mutanten Embryonen schmaler (Abb.3.16 G und P) als die der Wildtyp Tiere (Abb. 3.16 C und L).

Abb.3.16 (s. nächste Seite): Untersuchung der Canoe und Neurotactin Expression in Wildtyp und *Rap1*⁵⁷⁰³ KBK Embryonen

Wildtyp Embryonen (A-D, Stadium 6, I-M, Stadium 9/10) im Vergleich zu *Rap1*⁵⁷⁰³ KBK Embryonen der gleichen Stadien (E-H) und (N-Q); (gefärbt mit **Canoe** und **Neurotactin** Antikörpern. A, E, I und N zeigen Embryonen in Übersicht, restliche Abb. Ausschnitte).

Cno ist im Wildtyp apikal lokalisiert (D u. M), während in den KBK (H u. Q) das Protein über die gesamte Zelle, im Cytoplasma, und an der apikalen und lateralen Membran verteilt ist. Im Wildtyp (A u. I) ist das regelmäßige hexagonale Muster der Cno-Expression erkennbar (A, Ausschnitt), welches in den KBK (E u. N) sehr diffus ist (N, Ausschnitt). Die Nrt-Verteilung in den KBK Embryonen zeigt eine Ausdehnung der Expressionsdomäne nach basal (vgl. C u. G). Des Weiteren ist in den KBK Embryonen anhand der Nrt-Färbung eine Veränderung in der Zellform erkennbar (vgl. C u. L mit G u. P).



(Abb.3.16: Beschreibung s. Seite 67)

Ein weiterer Marker der apikalen Region ist das Bazooka (Baz) Protein. Baz wird maternal bereitgestellt. Während der Zellularisierung (s. Abb.3.14) konnte gezeigt werden, daß Baz in den Embryonen, die aus *Rap1*-Keimbahnklonen hervorgegangen sind, in der apikalen Region der sich bildenden Zellen lokalisiert ist, aber in einer weniger räumlich begrenzten Domäne als im Wildtyp. In den mutanten Embryonen ist das Protein diffus über eine breitere apikale Region verteilt. Im weiteren Verlauf der Entwicklung des Wildtyps ist Baz apikal der ZA lokalisiert (Abb. 3.17, C¹). Keimbahnklon Embryonen im vergleichbaren Stadium weisen eine uneinheitliche Baz Lokalisation auf. In einigen Regionen ist Baz, wie im Wildtyp, apikal lokalisiert (Abb. 3.17, F¹). In anderen Regionen ist Baz zwar apikal, aber in geringerer Menge zu finden (F²) oder sogar nicht detektierbar (F³). Betrachtet man im Zusammenhang hiermit die entsprechenden Zellformen (markiert durch Neurotactin), so ist in den Bereichen, wo Baz nicht mehr in großen Mengen, bzw. gar nicht mehr zu detektieren ist, auch die Zellform stärker verändert (vgl. 3.17 D¹, D² und D³).

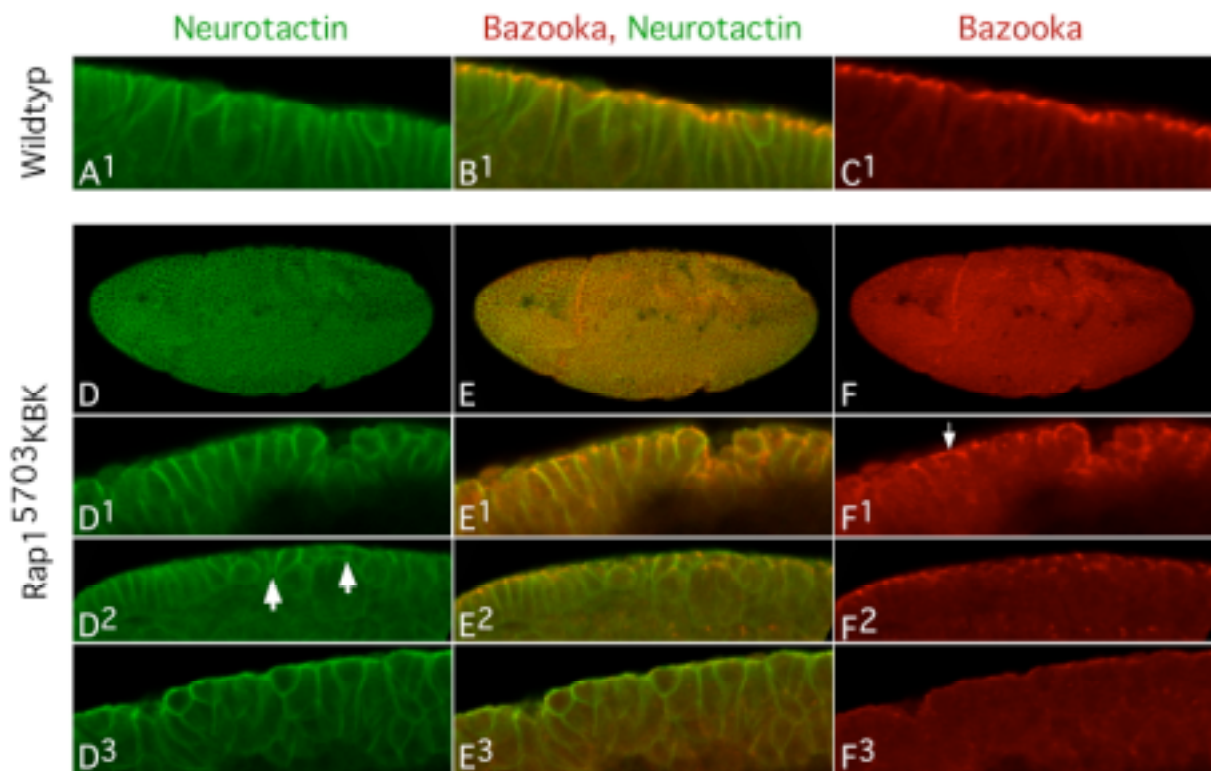


Abb.3.17: Analyse der Bazooka und Neurotactin Expression in Wildtyp und *Rap1*⁵⁷⁰³ KBK Embryonen. A-C zeigen einen Wildtyp Stadium 7/8 Embryo, D-F einen KBK Embryo in einem vergleichbaren Stadium (gefärbt mit Cno und Nrt Antikörpern) D-E zeigen Embryonen in der Übersicht, die restlichen Bilder zeigen Ausschnitte. Im Wildtyp ist die klare apikale Bazooka Lokalisation erkennbar (C¹), wohingegen der KBK Embryo Bereiche aufweist, in denen Bazooka wildtypisch (F¹, Pfeil), schwächer (F²) oder gar nicht lokalisiert ist (F³). Die Zellform scheint in den entsprechenden Bereichen nahezu wildtypisch (D¹), leicht verändert (D², Pfeil) und stärker unregelmäßig (D³).

Als ein weiterer Marker der Zellpolarität wurde Armadillo (Arm) benutzt. Arm kodiert für ein β -Catenin Homolog und ist, wie schon gezeigt, während der Zellularisierung an der Front der sich neubildenden Zellmembranen lokalisiert (s. Abb. 3.14). In den Stadien nach der Zellbildung ist es als Komponente der ZA apikal zu finden (Abb.3.18 C u. C¹). In der Aufsicht auf einen Wildtyp Embryo läßt sich das typische hexagonale Muster erkennen (C, Ausschnitt).

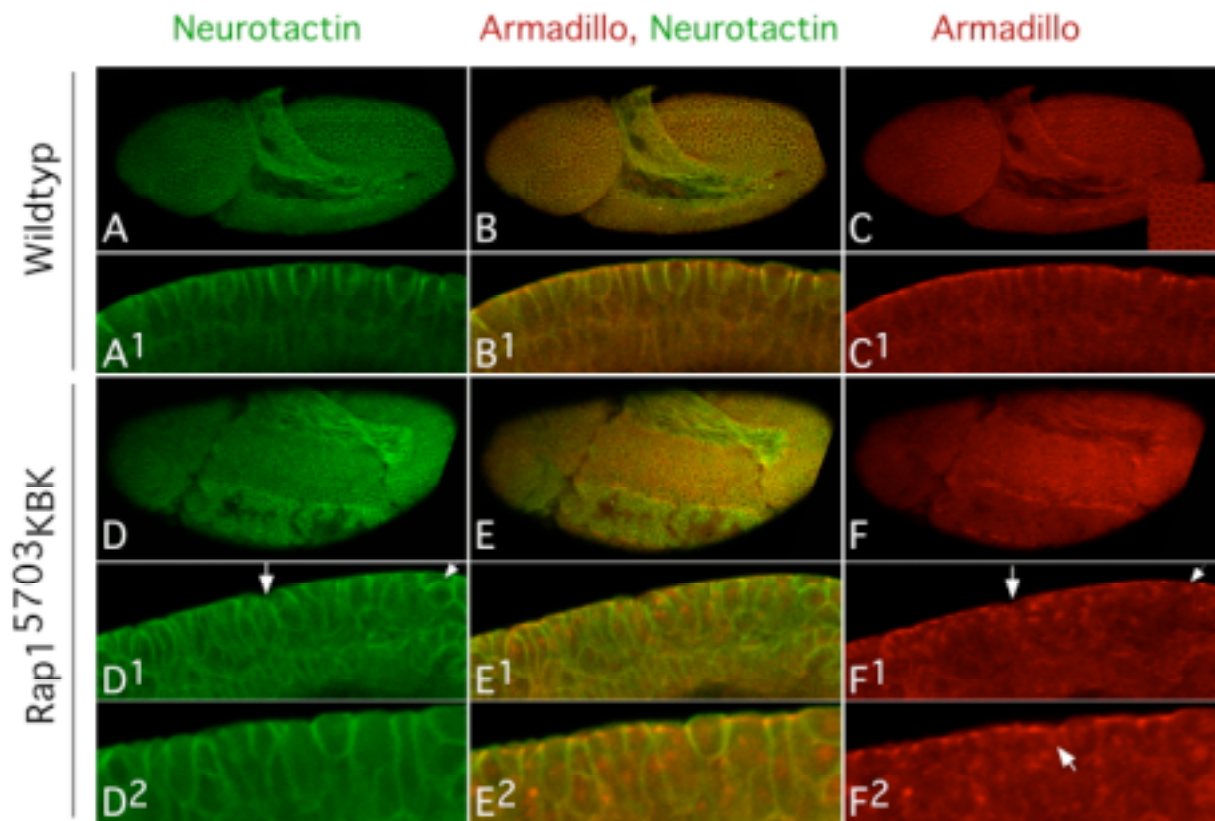


Abb.3.18: Untersuchungen zur Armadillo und Neurotactin Lokalisation in Wildtyp und $Rap1^{5703}$ KBK Embryonen.

A-C¹ Wildtyp Embryo Stadium 9/10, D-F² $Rap1^{5703}$ Embryo in vergleichbarem Stadium; gefärbt mit **Armadillo (Arm)** und **Neurotactin (Nrt)** Antikörpern. A- C und D- F zeigen Embryonen in der Übersicht, während die restlichen Bilder Ausschnitte aus der Epidermis zeigen. Im Wildtyp ist das Arm Protein apikal lokalisiert (C¹) und Nrt markiert basolateral die Zellgrenzen (A¹). In den KBK Embryonen ist Arm nicht mehr apikal lokalisiert (F¹ und F²), es findet sich auch diffus im Cytoplasma. Die Bereiche, in denen Arm in geringerem Maße apikal zu finden ist (F¹, Pfeil), gehen mit Defekten in der Zellform einher (D¹, Pfeil).

Ähnliche Beobachtungen wie bei der Bazooka Lokalisation in $Rap1^{5703}$ KBK lassen sich auch bei dem Armadillo Protein machen. Keimbahnklon Embryonen zeigen Bereiche, in denen das Arm Protein zum Teil, wie im Wildtyp, apikal lokalisiert ist (Abb.3.18 F²), wobei die Lokalisation nicht klar auf diese apikale Domäne beschränkt ist und das Protein auch diffus im Cytoplasma zu detektieren ist (Abb.3.18 F², Pfeil). Es finden sich aber auch Bereiche, in denen das Protein überwiegend im Cytoplasma und kaum noch in der apikalen Domäne lokalisiert ist (Abb.3.18 F¹).

In diesen Bereichen zeigen sich auch in Bezug auf die Zellform Veränderungen im Vergleich mit dem Wildtyp (vgl. Abb.3.18 A¹ u. D¹).

Der Befund, daß in einigen Regionen eine fast wildtypische Lokalisation des Arm-Proteins beobachtet wird, welche in Verbindung mit einer weitgehend normalen Zellform auf ein intaktes Epithel schließen läßt, in anderen Regionen Arm jedoch nicht mehr lokalisiert ist, läßt sich auch in der späten Embryonalentwicklung (s.Abb.3.19) finden.

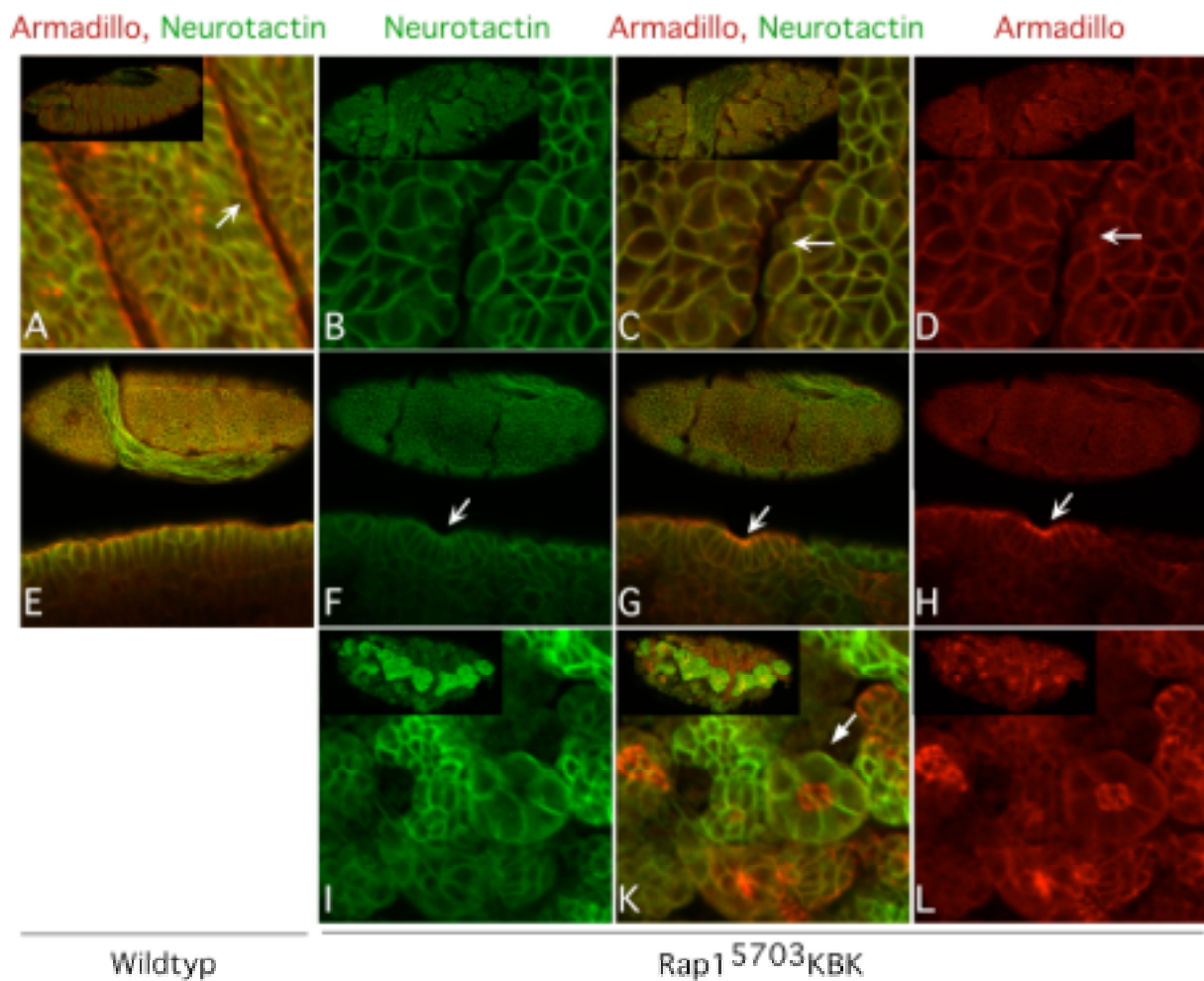


Abb.3.19: Analyse der Armadillo und Neurotactin Lokalisation in späten Entwicklungsstadien

A und E zeigen Wt Embryonen (Stadium 12/13 (A) bzw. 11 (E)), B-D bzw. F-L *Rap1*⁵⁷⁰³ KBK Embryonen entsprechender Stadien. Embryonen in Übersicht befinden sich jeweils oben in den Bildern, Ausschnitte darunter. Alle Embryonen sind mit **Armadillo** (Arm) und **Neurotactin** (Nrt) Antikörpern gefärbt. In A- D ist auf Segmentfurchen fokussiert. Dort ist im Wt (A) Arm deutlich apikal detektierbar. In KBK Embryonen (C und D) ist dieses nicht erkennbar. E bis H zeigt Ausschnitte der Epidermis, in denen im Wt (E) die apikale Arm-Färbung und lateral Nrt erkennbar sind. In KBK Embryonen finden sich Bereiche, in denen ebenfalls diese wildtypische Proteinlokalisierung zu finden ist (G, Pfeil), aber daneben Bereiche, in denen Arm nicht mehr apikal lokalisiert ist und die eine unregelmäßige Zellform aufweisen (F, G und H). I, K und L zeigen Embryonen mit stark aufgelöster Epithelstruktur. Es sind Strukturen (Vesikel?) zu erkennen (K, Pfeil) in denen die untersuchten Marker wie im Wildtyp lokalisieren.

Embryonen sind anterior links, posterior recht, dorsal oben und ventral unten orientiert.

Ab Stadium 12 sind im Wildtyp die Segmentfurchen gut ausgebildet. An deren Grenzen ist die apikale Zellseite deutlich in der Aufsicht erkennbar (s. Abb. 3.19, A Pfeil). In mutanten Embryonen eines vergleichbaren Stadiums, die in der Aufsicht keine Defekte in Bezug auf die Segmentierung erkennen lassen (Abb.3.19 B–D, kleine Abbildungen), ist die apikale Arm-Lokalisation nur sehr schwach (Abb.3.19 C und D Pfeile). In Embryonen, die von außen bereits die veränderte, verdrehte Morphologie aufweisen (Abb. 3.19 F-H, oben), finden sich einige Bereiche, in denen die Zellform und Zellpolarität wildtypisch ist (Pfeile in Abb.3.19 F-H), aber direkt daneben große Bereiche, in denen die Form der Zellen verändert ist, ihre Adhäsion untereinander gestört und Arm nicht detektierbar ist. In mutanten Embryonen, in denen starke morphologische Defekte eine Altersbestimmung erschweren, finden sich überwiegend Bereiche, in denen keine einheitliche Epithelstruktur mehr erkennbar ist (Abb.3.19 I-L). Allerdings finden sich auch hier Bereiche, in denen die Marker korrekt lokalisiert sind (Abb.3.19 K, Pfeil), wobei nicht eindeutig ist, um welches Gewebe es sich hierbei handelt. Es könnte sich um ein Teil von röhrenförmigen Epithelien, wie Darm oder Malphigische Gefäße handeln, oder um Vesikel, die sich nach Auflösen von epithelialen Strukturen aus Epithelzellen bilden.

3.4.4 Untersuchung der polaren Proteinlokalisierung in Neuroblasten

Das Bazooka Protein spielt neben seiner Rolle im Aufbau der *adherens junction* in Epithelien auch eine Rolle in der asymmetrischen Zellteilung der Neuroblasten. Neuroblasten sind Vorläuferzellen des zentralen Nervensystems in *Drosophila*. Sie delaminieren in den Entwicklungsstadien 9-11 aus dem Epithel, runden sich ab und teilen sich im Folgenden mehrmals asymmetrisch. Aus diesen Teilungen gehen erneut ein Neuroblast und eine Gangliennutterzelle hervor, aus welcher dann die Neurone hervorgehen. Das Baz Protein kann, wie viele andere Proteine in Neuroblasten, asymmetrisch verteilt, während der Pro- und Metaphase, in einem apikalen halbmondförmigen Bereich detektiert werden (s. Abb.3.20 E, Pfeile), während Nrt symmetrisch verteilt, den gesamten Zellumriß markiert (Abb. 3.20 F).

In $Rap1^{5703}$ KBK Embryonen finden sich in Bezug auf die Neuroblasten- Lokalisation des Baz Proteins Variationen, wie sie auch bei der Lokalisation des Proteins in der Epidermis zu finden sind (s. Abb.3.17). In den mutanten Embryonen finden sich überwiegend Neuroblasten, in denen Baz nicht detektierbar ist (Abb.3.20 K-P, Pfeile).

Jedoch treten auch hier vereinzelt Neuroblasten auf, in denen Baz apikal zu finden ist, wobei die Domäne, in der das Protein lokalisiert, im Vergleich zu der wildtypischen Lokalisationsdomäne kleiner erscheint. Im Wildtyp erstreckt sich das Baz Protein in einer halbmondförmigen Struktur über den gesamten apikalen Bereich. In den mutanten Embryonen ist dieser Bereich kürzer (vgl. Abb.3.20 N u. O mit D und E).

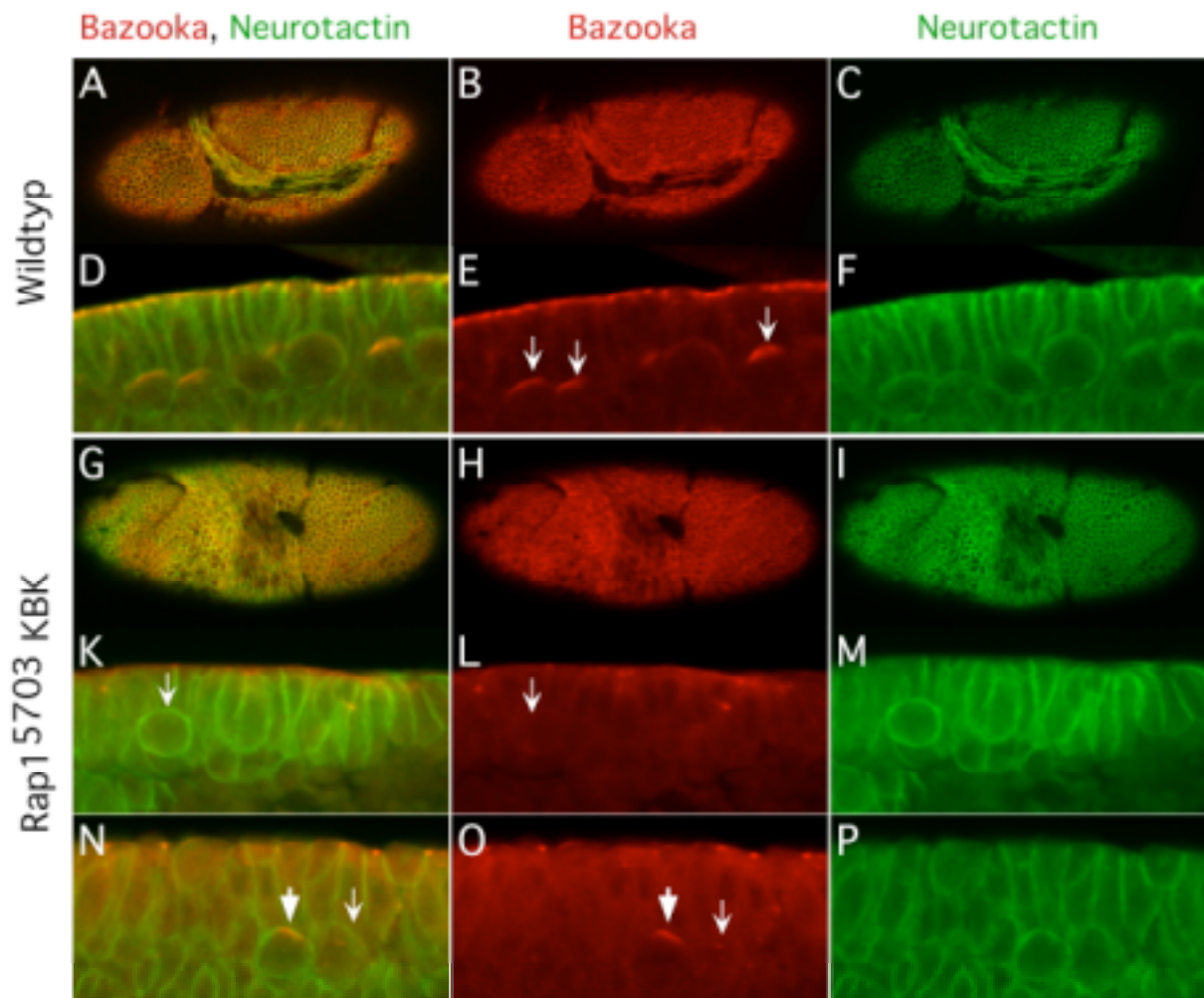


Abb.3.20: Lokalisation des Baz Proteins in Neuroblasten

A-F zeigen Wildtypembryonen im Stadium 11, G-P mutante Embryonen im vergleichbaren Stadium, wobei A-C und G-I Übersichten zeigen. Die anderen Abbildungen zeigen Schnitte. Die Embryonen wurden mit **Bazooka (Baz)** bzw. **Neurotactin (Nrt)** Antikörpern gefärbt.

In wt Embryonen ist in den Neuroblasten Baz in einem apikalen Halbmond zu finden (E, Pfeil), wohin gegen Nrt den gesamten Zellumriß markiert (F). In den KBK Embryonen ist in den meisten Neuroblasten die apikale Baz Lokalisation verloren gegangen (L und O, Pfeil). In den vereinzelt Neuroblasten, in denen Baz detektierbar ist (O), scheint die Expressionsdomäne im Vergleich zum Wildtyp verkleinert. (vgl. D und N).

In der Abbildung erscheint die Anzahl der Neuroblasten reduziert, was damit zusammen hängen kann, daß durch die Defekte in der Morphologie die Neuroblasten nicht mehr in einer Fokusebene liegen und bei einer Aufnahme nicht erfaßt werden.

Untersuchungen des mutanten Phänotyps auf zellulärer Ebene zeigen eine Vielzahl von Defekten. Zu Beginn der Zellularisierung sind Zellkernanordnung, sowie die Spindelgröße und DNA-Verteilung gestört. Im weiteren Verlauf der Zellularisierung und Gastrulation ist die Zellform betroffen sowie die Lokalisation verschiedener Proteine (Arm, Baz und Cno), die die Zellpolarität markieren, gestört.

3.5 In *Rapl*⁵⁷⁰³ KBK Embryonen findet vermehrt Zelltod statt

Während der Embryonalentwicklung von *Drosophila* wird ein Teil der Zellen durch programmierten Zelltod eliminiert. Das räumliche und zeitliche Muster der auftretenden sterbenden Zellen ist dabei für jeden Wildtyp Embryo reproduzierbar. Durch Markierung der apoptotischen Zellen mit dem Farbstoff *Acridin Orange* und einem Vergleich zwischen Mutanten und Wildtyp kann überprüft werden, ob in mutanten Embryonen vermehrt Zelltod stattfindet.

Hierbei ist es notwendig, mutante und Wildtyp Embryonen des gleichen Entwicklungsstadiums zu vergleichen, da jedes dieser Stadien durch eine unterschiedlich hohe Anzahl von Zellen in Apoptose geprägt ist.

Auf Grund der stark veränderten Morphologie der mutanten Embryonen ist es in dem Fall aber nicht möglich, die Entwicklungsstadien eindeutig zu unterscheiden.

Es konnte gezeigt werden, daß in frühen Stadien 6-9 in KBK Embryonen kein zusätzlicher Zelltod zu finden ist. Ab Stadium 10 ist eine erhöhte Zahl sterbender Zellen sichtbar (vgl. Abb.3.21 B und C mit E und F). Hierbei kann jedoch nicht festgelegt werden, in welchen Bereichen diese zu finden sind, da aufgrund der veränderten Gesamtmorphologie der mutanten Embryonen nur schwer die Orientierung des Embryos und die Lage der inneren Strukturen zu bestimmen ist.

Auch in den späten Embryonalstadien 14-16 kann in KBK Embryonen eine erhöhte Anzahl sterbender Zellen identifiziert werden (Abb.3.21 G und H im Vgl. zu I und K).

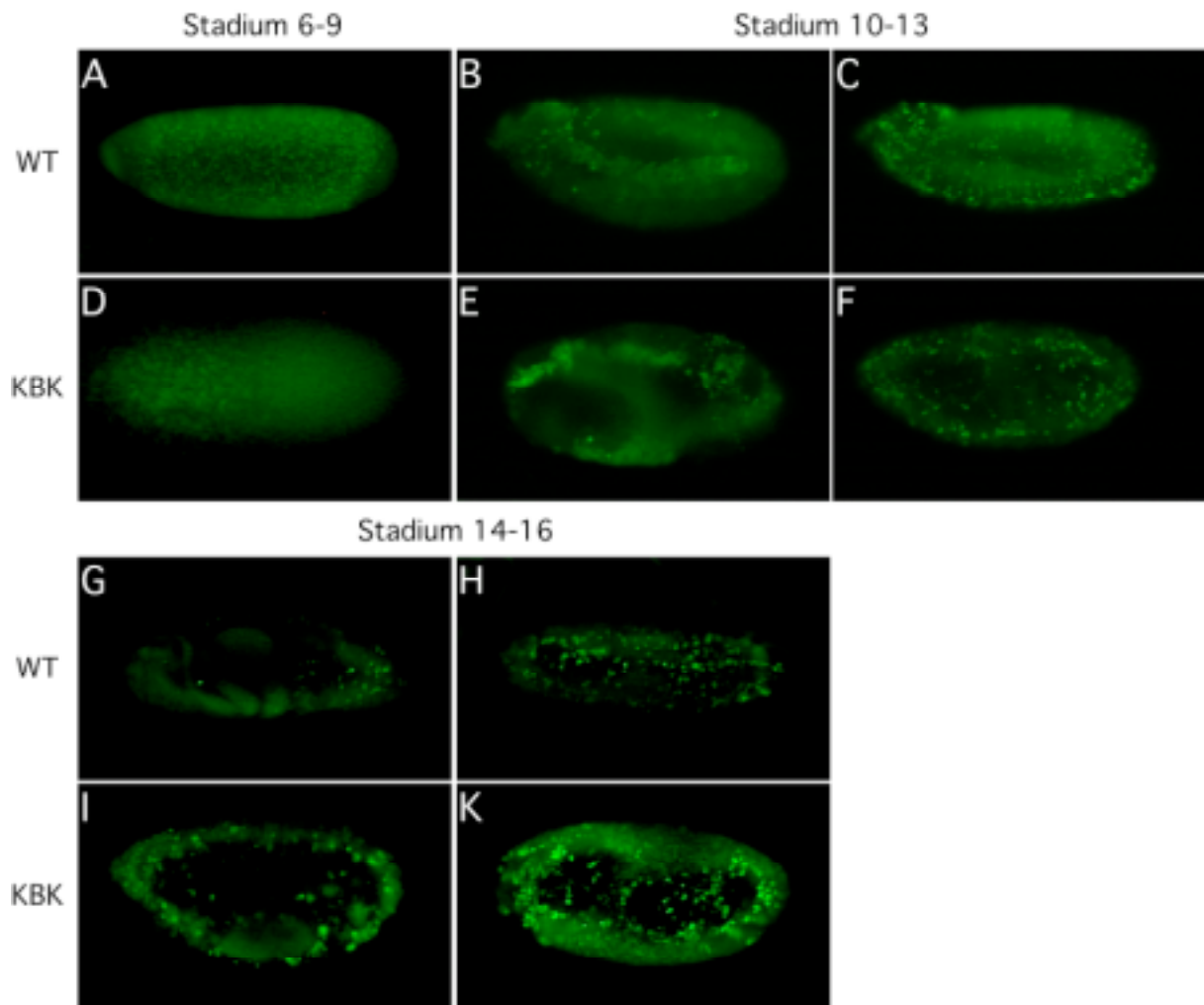


Abb. 3.21: Vergleich der Anzahl apoptotischer Zellen in Wt und *Rap1*⁵⁷⁰³ KBK Embryonen.
 Mit Acridin Orange angefärbte apoptotische Zellen in Wildtyp (A-C und G-H) und KBK Embryonen (D-F und I-K). In frühen Stadien (6/7, A und B) zeigen WT und mut. Embryonen eine vergleichbar geringe Menge an Zelltod. Ab Stadium 10 tritt in KBK Embryonen (E-F und I-K) vermehrt Zelltod auf. Auf Grund der stark veränderten Morphologie in den mutanten Embryonen lassen sich Stadien und veränderte Regionen nur schwer deuten.

3.6 Herstellung weitere *Rap1*-Allele mittels EMS-Mutagenese

Zur Analyse eines mutanten Phänotyps ist es hilfreich, wenn für diese Untersuchungen mehrere Allele des zu untersuchenden Gens vorliegen. Durch Mutationen können verschiedenen Domänen eines Proteins betroffen sein, die unterschiedliche Aspekte des Phänotyps betreffen können und somit zum Verständnis der Rolle dieses Proteins beitragen. Neue Mutationen können durch Behandlung adulter Fliegen mit Chemikalien oder Bestrahlung induziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine EMS- Mutagenese (s. Material und Methoden 2.2.4) durchgeführt. Da zu Beginn der Mutagenese die Kartierung der Mutation noch nicht abgeschlossen war, wurde hierbei nach Mutationen in Genen gesucht, die in der *Df(3L)R* (Region 62B8-B12) liegen, die zur Kartierung der Mutation in der Linie *l(3)5703* diente. Es wurden 2000 männliche Fliegen mit dem Genotyp $FRT^{3L-2A} FRT^{3R-82B} / FRT^{3L-2A} FRT^{3R-82B}$ mutagenisiert. Dieser Stamm, der zu Beginn der Mutagenese isogenisiert wurde, trägt auf dem 3.Chromosom die FRT-Elemente, welcher auch der Stamm *Rap1⁵⁷⁰³/TM3* trägt. Die vorhandenen FRT-Elemente sind insofern von Vorteil, als daß aus der Mutagenese resultierende Stämme dann ebenfalls diese Elemente tragen, und somit zur Erzeugung von Keimbahnklonen eingesetzt werden können, ohne zuvor FRT-Elemente in aufwendigen Kreuzungen rekombinieren zu müssen. Mit 6272 Tieren wurden Einzelkreuzungen angesetzt und über diese Kreuzung 16 Stämme isoliert, die letal über die *Df(3L)R* sind und vermutlich in dieser Region eine Mutation tragen (Kreuzungsschema in Abb.3.22). Die Linien wurden zunächst mit den Namen FRT*X (X: Ziffern 1-16), benannt.

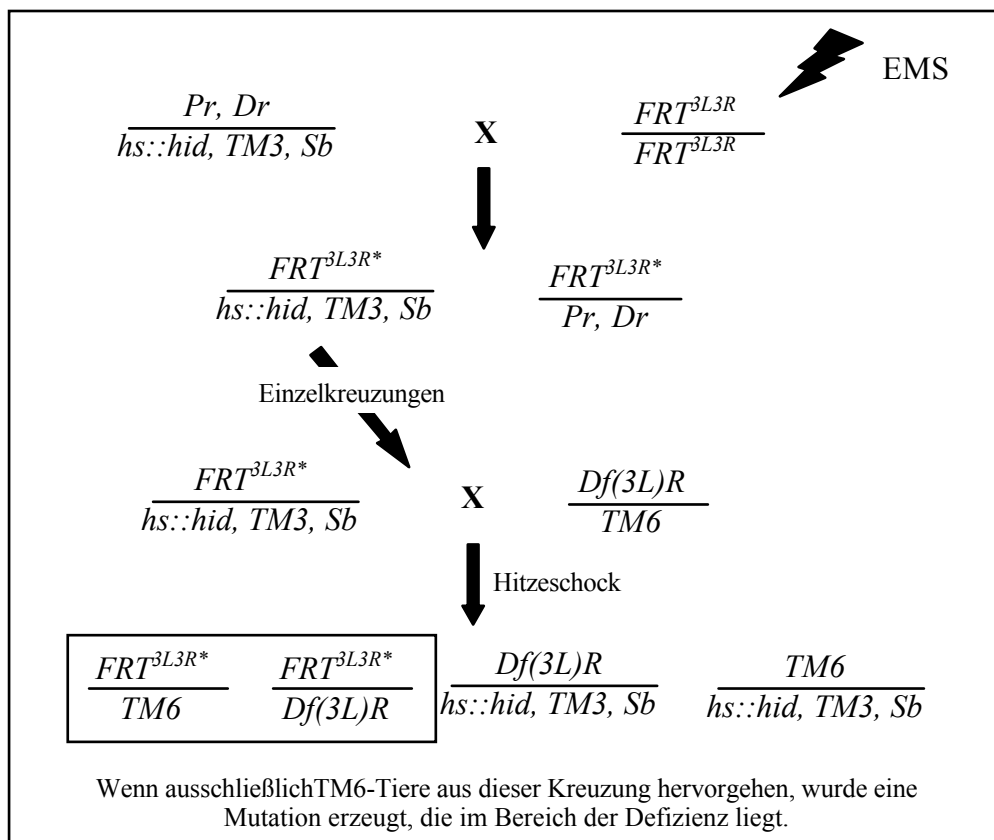


Abb.3.22: Schematische Darstellung des Kreuzungsschema zur EMS-Mutagenese (zu näheren Erläuterungen s. Material und Methoden).

Um zu überprüfen, wie effizient die Mutagenese war und wie viele Komplementationsgruppen die Stämme umfassen, wurden alle isolierten Stämme untereinander gekreuzt. Die Region, in der die Mutationen der gewonnenen Stämme liegen, umfaßt laut „Annotated Genome GBrowse“ 16 Gene. In einer gesättigten Mutagenese sollten in jedem Gen dieser Region mehrere Mutation erzeugt worden sein. Die Ergebnisse dieser Komplementationstests sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	■	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+
2	-	■	+	-	-*	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+
3	+	+	■	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	-	+	■	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
5	+	-*	+	+	■	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	-	-	+	-	-	■	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
7	-	-	+	-	+	-	■	-	+	+	+	-	-	-	-	+
8	-	-	+	-	+	-	-	■	+	+	-	-	+	-	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	■	-	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	■	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	■	+	+	+	+	+
12	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	■	-	-	-	+
13	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	■	-	+	+
14	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	■	+	+
15	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	■	+
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	■

Tabelle 3.2: Ergebnisse der Komplementationstest der 16 isolierten Linien des EMS-Screens untereinander

Zur Feststellung des Komplementationsverhaltens der 16 Linien untereinander, wurden Weibchen jeder Linie (Ziffer 1-16, in der Senkrechten), mit Männchen jeder Linie (Ziffern 1-16 Waagerechte) gekreuzt. Komplementieren zwei Linien, bzw. die möglichen Mutationen, die sie tragen, so ist dies mit einem roten Plus gekennzeichnet. Komplementieren sie sich nicht, so ist dies mit einem grünen Minus markiert. Bei mit * gekennzeichneten Kreuzungen sterben hm mutantr Fliegen beim Schlüpfen in der Puppe.

Die aus diesen Ergebnissen resultierenden acht Komplementationsgruppen sind nochmals zur besseren Übersicht in Schema in Abb.3.23 dargestellt.

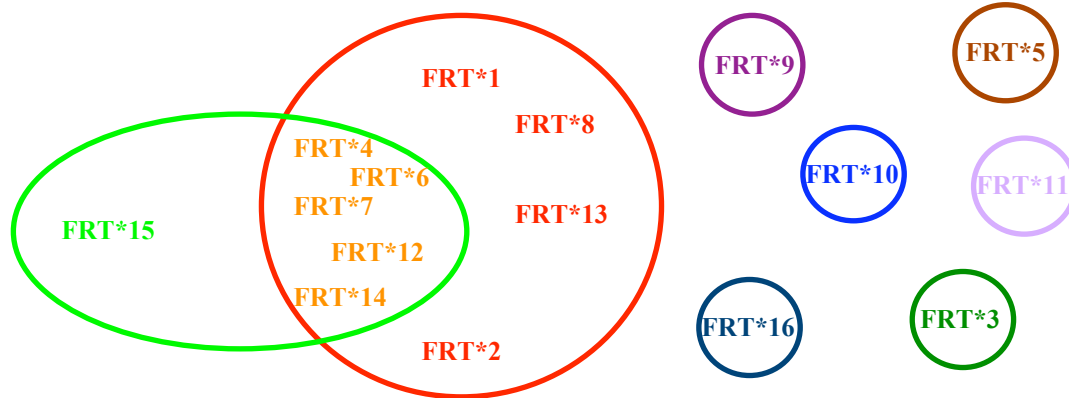


Abb.3.23: Schematische Darstellung der acht identifizierten Komplementationsgruppen

Die acht verschiedenen Komplementationsgruppen, die sich durch Kreuzungen der 16 Linien untereinander ergeben, sind durch verschiedenfarbige Kreise gekennzeichnet. Sechs der Gruppen bestehen aus nur jeweils einem Mitglied. Die rote Gruppe zeigt eine Unterteilung in Bezug auf ihr Komplementationsverhalten der Linien FRT*15 gegenüber.

Auffällig hierbei ist, daß es neben sechs Komplementationsgruppen, die jeweils nur ein Mitglied enthalten (Linien 3, 5, 9, 10, 11, und 16), eine große Gruppe mit 9 Mitgliedern gibt, die sich im Komplementationsverhalten zu Linie FRT*15 unterscheiden. FRT*15 komplementiert nicht die Linien 4, 6, 7, 12 und 14, wohl aber 1, 2, 8 und 13.

Weitere Analysen der 16 Linien erfolgte durch Komplementationstest mit *Rap1*-Allelen und Linien, die bekannte Mutationen in der Region tragen (s. Tabelle 3.3).

Kompl. + Keine Kompl. -	FRT* 1	FRT* 2	FRT* 3	FRT* 4	FRT* 5	FRT* 6	FRT* 7	FRT* 8	FRT* 9	FRT* 10	FRT* 11	FRT* 12	FRT* 13	FRT* 14	FRT* 15	FRT* 16
Def57 (3L)R/TM6 C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rap1 ⁵⁷⁰³ /TM3, sb (Weibchen)	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Rap1 ^{rv(R)B1} /TM6 (Weibchen)	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
Rap1 ^{rv(R)B3} /TM6 (Weibchen)	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
#1220 mu2/TM6 C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rap1 ⁵⁷⁰³ /TM3, sb (Männchen)	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Rap1 ^{rv(R)B1} /TM6 (Männchen)	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
Rap1 ^{rv(R)B3} /TM6 (Männchen)	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+

Tab.3.3 : Darstellung der Komplementationstests mit *Rap1*-Allelen und einem *mu2*-Allel

Grau unterlegt sind die Linien, die nach Auswertung der Kreuzungen als *Rap1*-Allele identifiziert werden konnten. Mit blauen Kästchen sind hierbei Ergebnisse markiert, die abweichen und auf ein komplexes Komplementationsverhalten der Linien untereinander deuten. Kreuzungen gegen *Rap1*-Allele wurden reziprok angesetzt.

Dies komplexe Komplementationsverhalten deutet darauf hin, daß in den Allelen verschiedene Domänen des Gens betroffen sind. So ist es möglich, daß sich Mutationen in einem Gen komplementieren.

3.6.1 Maternaler Phänotyp der neuen *Rap1*-Allele

Um zu untersuchen, ob die neuen Allele einen ähnlichen Phänotyp wie *Rap1*⁵⁷⁰³ zeigen, wurden Keimbahnklone von den Linien induziert. Dabei zeigte sich, daß nur *Rap1*^{WG15} Weibchen, die Keimbahnklone tragen, Eier produzieren. Die Weibchen der anderen Linien legen keine Eier.

3.6.1.1 Phänotyp der Linie *Rap1*^{WG15}

Rap1^{WG15} KBK Embryonen zeigen einen variablen Phänotyp (s. Abb.3.25). Es treten Segmentierungsdefekte (Abb. 3.25 B), ventrale Löcher (C), sowie anteriore und ventrale Löcher (D und E) auf. Des weiteren zeigen sich Embryonen, die nur noch kleinere Reste zusammenhängender Kutikula zeigen (F).

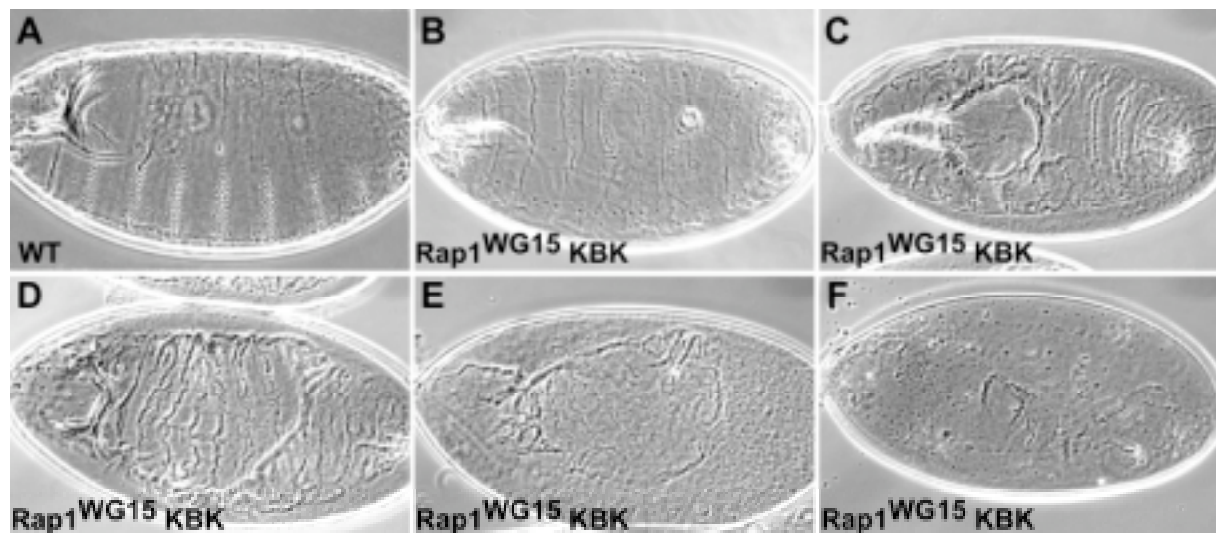


Abb.3.25: Der maternale Phänotyp der Linie *Rap1*^{WG15} zeigt eine große Variabilität.

Die Abbildung zeigt den Kutikulaphänotyp von *Rap1*^{WG15} KBK Embryonen (B-F) im Vergleich zum Wildtyp (A). Die mutanten Embryonen zeigen einen variablen Phänotyp. Es treten Segmentierungsdefekte (B), ventrale Löcher (C) und anteriore und ventrale Löcher (D und E) auf. Des weiteren zeigen sich Embryonen, die nur noch kleinere Reste zusammenhängender Kutikula zeigen (F).

Der Phänotyp dieser Linie zeigt Ähnlichkeiten zu dem der Linie *Rap1*⁵⁷⁰³. Jedoch lassen sich hier nicht klar zwei Phänotypklassen unterscheiden. Alle Variationen treten zu gleicher Anzahl auf.

Diese intermediären Phänotypen wie in 3.26 C und E treten bei Linie *Rap1⁵⁷⁰³* (s. Abb.3.3) nicht auf.

3.6.1.2 Untersuchung der Ovarien der *Rap1^{WG}*- Linien, die keine Eier produzieren

Eine Präparation der Ovarien dieser Weibchen und ein Vergleich mit Wildtyp ermöglicht eine erste Beurteilung der Ursache für eine Störung der Eiablage. Ein Ovarium besteht aus 16 Ovariolen (s. Abb. 3.26 A). Jede Ovarirole besitzt an der anterioren Spitze (Germarium) Keimzell- und somatische Stammzellen, deren Nachkommen in Eikammern organisiert werden (s. Abb.3.26 B). Eikammern verlassen das Germarium und entwickeln sich kontinuierlich, während sie in der Ovarirole nach posterior wandern.

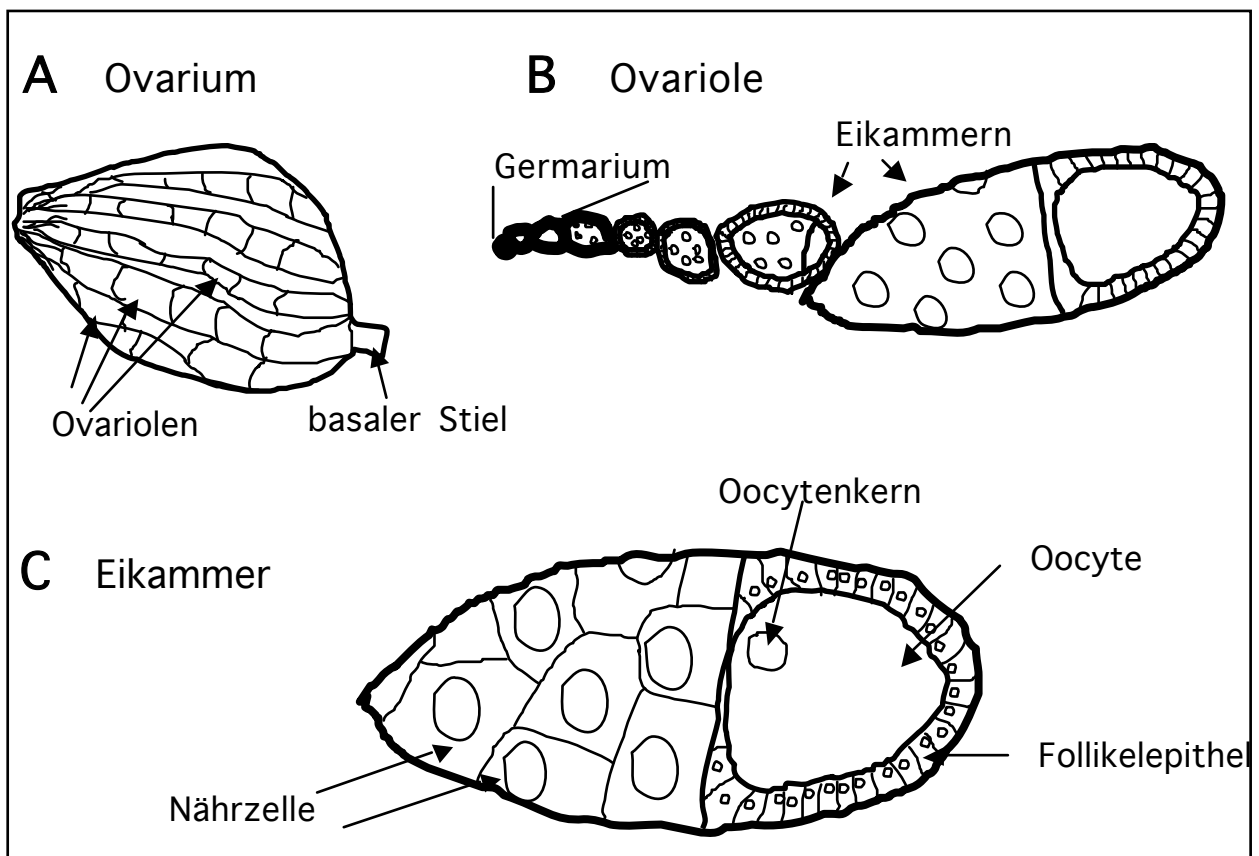


Abb.3.26: Schematische Darstellung von Ovarium, Ovarirole und Eikammer von *Drosophila*.

Die Abbildung zeigt ein Ovarium (A), eine Ovarirole (B) und eine Stadium 10 Eikammer (C). (A) ein Ovarium setzt sich aus 16 Ovariolen zusammen, die am basalen Stiel zusammenführen. (B) jede Ovarirole besitzt an der anterioren Spitze Keim- und somatische Zellen, deren Nachkommen in der Region des Germariums zu Eikammern organisiert werden. Eikammern verlassen das Germarium und entwickeln sich kontinuierlich, während sie in der Ovarirole nach posterior wandern. Eine Eikammer (C) besteht aus der Oocyte, die mit 15 Nährzellen verbunden ist. Umgeben wird sie von Follikelzellen, welche um die Oocyte als Säulenepithel, um die Nährzellen als Plattenepithel ausgebildet sind.

Die Tatsache, daß Fliegen der Linien *Rap1^{WG4}*, *Rap1^{WG6}*, *Rap1^{WG7}*, *Rap1^{WG12}* und *Rap1^{WG14}*, die Keimbahnklone tragen, keine Eier legen, kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen kann das Fehlen von Keimzellen dafür verantwortlich sein, aber auch die Degeneration von Eikammern oder Ovarien kann dies zur Folge haben.

Im Vergleich zu wildtypischen Ovariolen (Abb.3.27, A) zeigen Ovariolen der *Rap1^{WG4}*, *Rap1^{WG6}*, *Rap1^{WG7}*, *Rap1^{WG12}* und *Rap1^{WG14}* Tiere deutlich Degeneration (Abb.3.27 B, *Rap1^{WG4}* als Beispiel). Der anteriore Bereich, der das Germarium umfaßt, ist nicht mehr vorhanden. Auch sind die Ovarien insgesamt kleiner als die der Wildtypfliegen (vgl. Abb.3.27 C mit D). Ebenfalls sind in den mutanten Ovarien degenerierte Eikammern erkennbar.

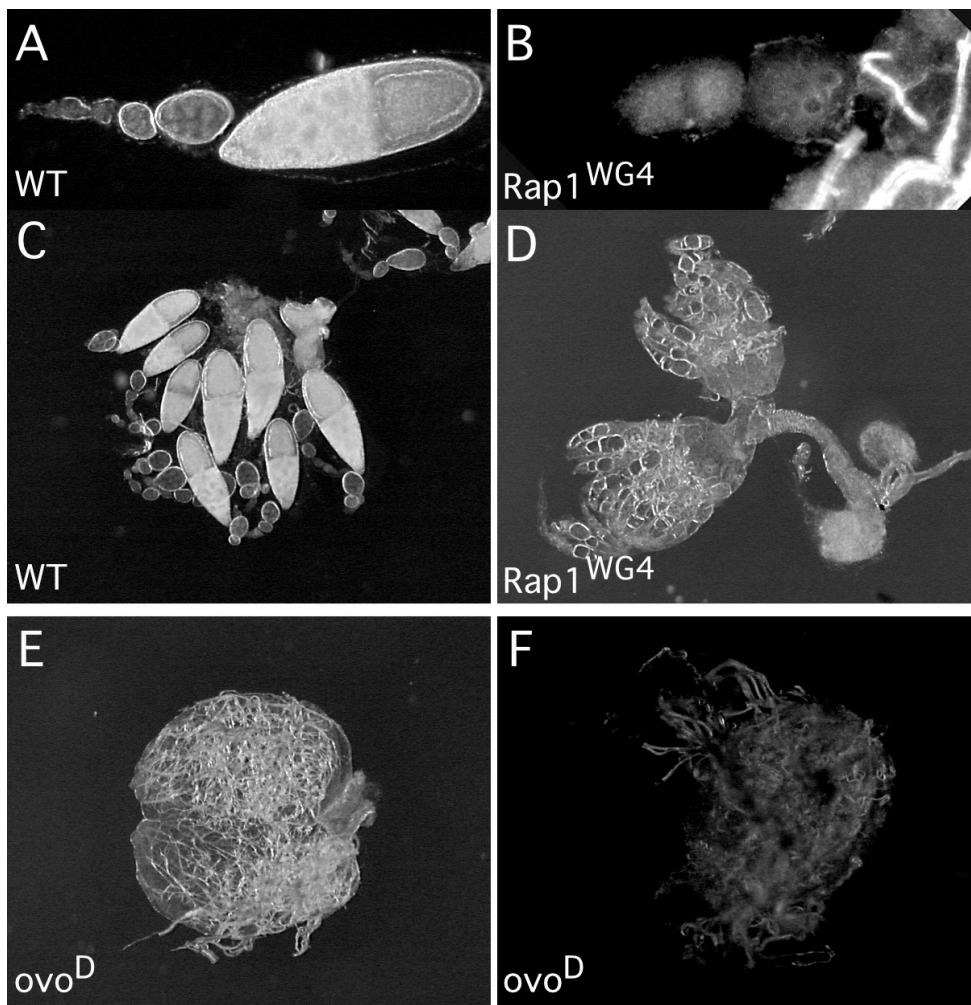


Abb. 3.27: Wildtyp Ovarien im Vergleich mit Ovarien aus Fliegen, die *Rap1^{WG}* KBK tragen. Die Abbildung zeigt eine Wildtyp Ovariolen (A) im Vergleich zu einer Ovariolen aus *Rap1^{WG4}* Weibchen, repräsentativ für Ovariolen aus *Rap1^{WG6}*, *Rap1^{WG7}*, *Rap1^{WG12}* und *Rap1^{WG14}*. Im WT (A) ist die Struktur der Ovariolen klar erkennbar. Anterior (links) ist das Germarium, und daraus folgend Eikammern der verschiedenen Stadien erkennbar. Ovariolen der *Rap1^{WG4}* Tiere zeigen Degeneration. Der anteriore Bereich und auch entwickelte Eikammern sind nicht erkennbar. Zum Vergleich sind in E und F Ovarien von Weibchen, welche die Sterilmutation *ovo^D* tragen, abgebildet.

Ein den Mutanten ähnlicher Phänotyp findet sich auch in den Ovarien von Fliegen, die die Sterilmutation *ovo^D* tragen (Abb.3.27 E und F). Jedoch zeigt sich hier z.T. eine stärkere Degeneration des gesamten Ovariums (Abb.3.27 F).

Durch die EMS Mutagenese konnten sechs neue Rap1 Allele induziert werden, welche ein komplexes Komplementationsverhalten aufweisen. Fünf Linien tragen vermutlich eine zweite Mutation, da diese Linien auch Mitglieder einer weiteren Komplementationsgruppe nicht komplementieren. Des weiteren führt die Induzierung von Keimbahnklonen in diesen Linien zu Defekten in der Oogenese, während Embryonen der Linie *Rap1^{WG15}* einen variablen Phänotyp aufweisen, der dem der Linie *Rap1⁵⁷⁰³* ähnelt.

IV. Diskussion

Da frühere Suchen nach weiteren zygotischen Komponenten, die an Etablierung und Aufrechterhaltung epithelialer Polarität beteiligt sind, erfolglos blieben und angenommen wird, daß entscheidende Genprodukte als maternale mRNA oder Protein bereitgestellt werden, wurden systematische Suchen nach maternalen Faktoren (Perrimon et al, 1989; Bellotto et al, 2002) durchgeführt.

Aus den P-Elementlinien, die Müller, H.-A. J. und Wodarz, A. bei einer generellen Suche nach maternal exprimierten Genen (unveröffentlichte Daten) verwendet haben, wurden im Hinblick auf meine Fragestellung nach maternalen Genen, die in der Epithelentwicklung eine Rolle spielen, Linien ausgewählt, deren Kutikulaphänotyp auf eine Störung in der Epithelentwicklung deutet. Da die Kutikula ein Sezernierungsprodukt von Epithelien darstellt, kann vom Phänotyp der Kutikula auf den Zustand der Epithelien geschlossen werden. Tritt wie im Fall der Linie *l(3)5703* ein Phänotyp auf, bei dem nur noch Stücke von Kutikula erkennbar sind, kann daraus geschlossen werden, daß die Integrität des sezernierenden Epithels stark gestört ist.

Solche Beobachtungen wurden schon bei Kutikulapräparaten von Genen gemacht, bei denen gezeigt wurde, daß sie an Aufbau und Aufrechterhaltung der epithelialen Integrität beteiligt sind, wie z.B. *crb* und *sdt* (Jürgens et al., 1984; Tepass und Knust, 1990, 1993).

Nicht nur der Kutikulaphänotyp der Linie, der auf Störungen in der Epithelentwicklung deutet, sondern auch die Tatsache, daß dieser Phänotyp penetrant und reproduzierbar ist, führte zur Auswahl der Linie *l(3)5703* zur weiteren Untersuchung.

4.1 Identifizierung von *l(3)5703* als *Rap1*-Allel

Neben der phänotypischen Analyse ist die Identifizierung des von der Mutation betroffenen Genlokus ebenso von großem Interesse. Die Tatsache, daß es sich bei der zu untersuchenden Linie um eine P-Elementinsertionslinie handelt, brachte jedoch nicht den erwarteten Vorteil der relativ einfachen Kartierung. Durch den Einsatz der inversen PCR stellte sich heraus, daß die Mutation nicht mit dem P-Element assoziiert sein kann.

Das P-Element wurde in einem Bereich auf dem rechten Arm des III.Chromosoms (100C-D) lokalisiert, wohingegen der untersuchte Phänotyp durch Erzeugung von Keimbahnklonen nur mit Rekombinationselementen des linken Arms induziert werden konnte. Somit erfolgte eine etwas aufwendigere Kartierung mittels Komplementationstests mit Defizienzen tragenden Stämmen. Dies ist nicht nur zeitintensiver, sondern auch deshalb aufwendiger, da nicht das gesamte *Drosophila* Genom durch Defizienzen abgedeckt ist und diese selbst oft nur grob kartiert sind. Daß relativ häufig P-Insertion und Mutationsereignis nicht zusammen fallen (Gödde, 2001 und Müller, mündliche Mitteilung), ist dadurch zu erklären, daß P-Elemente nach Mobilisierung und Insertion ins Genom nochmals in einen anderen Bereich springen können und dabei, durch unsauberes Ausschneiden, eine Mutation hinterlassen. In dem Bereich, in welchen sie letztendlich inserieren, können, müssen sie aber nicht zwangsläufig ebenfalls zu einem Mutationsereignis führen. Auch für die untersuchte Linie stellt sich somit die Frage, ob noch eine weitere P-induzierte Mutation vorliegt. Bei der Kartierung mittels Defizienzen wurde das gesamte III.Chromosom abgedeckt. Da dabei keine weiteren Regionen gefunden wurden, die eine Mutation tragen, und die Induzierung von Keimbahnklonen auf dem rechten Chromosomenarm zu keinem Phänotyp führten, kann davon ausgegangen werden, daß das P-Element dort keine weitere Mutation ausgelöst hat.

Da aufgrund dieser Unsicherheit auf jeden Fall eine Kartierung über meiotische Rekombination und/oder Defizienzen erfolgen muß, würde sich als Alternative zu einem "Screen" mit P-Elementen eine EMS-Mutagenese anbieten. EMS (Etyl-Methan-Sulfonat) ist eine Chemikalie, die in *Drosophila* häufig zur Erzeugung von Mutationen eingesetzt wird (Ashburner, 1989). Nach EMS-Mutagenese müßten entstandenen Mutationen auch über Komplementationstests mit Defizienzen und/oder meiotische Rekombination kartiert werden.

Für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Linie konnte, mittels Komplementationstests, das betroffene Gen als *Rap1* identifiziert werden. *Rap1* kodiert für eine kleine GTPase der Ras-Subfamilie, über die schon einiges, vor allem über Vertebraten Homologe, bekannt ist.

Rap Proteine sind sehr eng mit Ras Proteinen verwandt (50% Sequenzübereinstimmung) und zeigen eine hohe Konservierung zwischen verschiedenen Spezies. So sind die *Rap* Gene von Mensch und *Drosophila* z.B. enger untereinander verwandt, als die Ras Gene (Chen, 1997).

Die *Rap* Gene wurden ursprünglich in einem Screen nach cDNAs, welche die Morphologie von K-Ras-transformierten Zellen wieder herstellen, als Ras Antagonisten identifiziert (Kitayama, 1989). Neuste Studien aber sprechen eher für eine Ras unabhängige Rap1 Funktion (Review Zwartkruis und Bos, 1999).

Die erste Mutation im *Rap1* Gen, die in *Drosophila* näher charakterisiert wurde, ist die dominante „gain-of-function“ Mutation *Roughened*, welche zu einem rauhen Augenphänotyp führt (Hariharan et al., 1991).

Untersuchungen des „loss-of-function“ Phänotyps zeigten, daß Mutationen im *Rap1* Locus in Homozygose erst larval zu Letalität führen, da maternal bereitgestelltes *Rap1* für eine bis dahin normale Embryogenese ausreicht. *Rap1* Keimbahnklone, denen die maternale Komponente fehlt, zeigen Defekte in der Morphogenese und eine abnormale Wanderung von Mesoderm Vorläuferzellen (Asha et al., 1999).

Eine Rolle während der Etablierung und/oder Aufrechterhaltung von Zellpolarität im *Drosophila* Embryo konnte für Rap1 bisher aber noch nicht nachgewiesen werden.

4.1.1 Identifizierung weiterer *Rap1*-Allele

Zum Verständnis der Rolle eines Gens, ist die Analyse weiterer mutanter Allele sinnvoll, da in diesen möglicherweise verschiedene Regionen eines Gens betroffen sein können und durch ihre Analyse unterschiedliche Rückschlüsse auf die Funktion verschiedener Domänen erfolgen können.

Durch eine EMS-Mutagenese und anschließende Komplementationstests konnten acht Komplementationsgruppen isoliert werden, die zum Teil nur ein Mitglied aufweisen, was auf eine nicht gesättigte Mutagenese deutet. Sechs neue *Rap1*-Allele konnten isoliert werden. Die Tatsache, daß die neuen Allele kein einheitliches Komplementationsverhalten in Bezug auf die bekannten *Rap1*-Allele zeigen, deutet darauf hin, daß in den neuen Allelen vermutlich unterschiedliche Domänen des Gens betroffen sind.

Jedoch deutet die Beobachtung, daß fünf der neuen Allele auch Kandidaten einer Komplementationsgruppe nicht komplementieren, die keine *Rap1*-Allele umfassen, darauf hin, daß in diesen fünf Stämmen noch eine weitere Mutation vorliegt. Die Vermutung wird auch durch den Befund gestützt, daß aus induzierten Keimbahnklonen keine Embryonen hervorgingen.

Zwar beschreibt Asha (Asha et al, 1999) bei Untersuchungen zur *Rap1* Funktion in der Oogenese auch Degeneration von Eikammern, welche mit den beobachteten Phänotypen vergleichbar sind, jedoch konnten diese Degenerationen durch Induzierung von Follikelzellklonen, aber nicht durch Klone in der Keimbahn erzeugt werden. Die untersuchten Ovarien der keimbahnklontragenden Weibchen der fünf Linien ähneln sehr stark den Ovarien, die aus Weibchen stammen, welche die Sterilmutation *Ovo^D* tragen. Da für alle sechs neuen *Rap1*-Allele alle Schritte, welche zur Erzeugung von Keimbahnklonen nötig sind, parallel und mit den gleichen Stämmen des Flp-DFS-Systems angesetzt wurden, kann ausgeschlossen werden, daß die Stämme des Flp-DFS-Systems fehlerhaft, oder in dem Versuchsablauf ein Fehler (z.B. zu niedrige Temperatur beim Hitzeschock im Wasserbad) unterlaufen ist. Daß die Weibchen, die Keimbahnklone tragen, mit Weibchen verwechselt wurden, welche die Sterilmutation tragen, ist unwahrscheinlich, da diese mit gut sichtbaren Markermutationen ausgestattet sind. Daß eine Verwechslung nach der Präparation geschehen ist, ist möglich, aber sehr unwahrscheinlich, da nur in einem Ansatz die Kontroll *Ovo^D* Ovarien präpariert wurden und in sechs Ansätzen die der *Rap1*-Allele.

Somit bleibt als einzige Erklärung die Möglichkeit, daß bei der Behandlung mit EMS das FRT-Element mutiert wurde und in den betroffenen Linien nun keine Klone erzeugt werden können. Diese Möglichkeit müsste allerdings über Sequenzierung des FRT-Elements in den Linien überprüft werden.

4.2 Der Kutikulaphänotyp der Linie *Rap1⁵⁷⁰³* deutet auf eine Störung der epithelialen Integrität hin

Der Kutikulaphänotyp der Embryonen, die aus *Rap1⁵⁷⁰³* Keimbahnklonen hervorgegangen sind, läßt sich in zwei Klassen unterteilen. 50% zeigen einen schwachen Phänotyp, der von kleinen bis größeren Löchern im anterioren Bereich gekennzeichnet ist. Die andere Hälfte zeigt einen starken, dem *crb*-Phänotyp ähnlichen Phänotyp mit kleinen Resten von Kutikula.

Der starke Phänotyp deutet darauf hin, daß ähnlich wie im Fall der Gene *sdt* und *crb*, auch *Rap1* an der Epithelentwicklung beteiligt ist. Die Tatsache, daß auch ein abgeschwächter Phänotyp genau bei der Hälfte der untersuchten Embryonen auftritt, läßt auf eine paternale Rettung des Phänotyps durch die vom Vater eingebrachte Wildtypkopie des *Rap1* Gens, schließen.

Dies bedeutet, daß die, durch die zygotische Wildtypkopie gewährleistete, zygotische Expression von *Rap1* den Verlust der maternalen Expression bis zu einem gewissen Grad ausgleichen kann. Eine vollständige Rettung zur Larve oder adultem Tier erfolgt jedoch nicht. Bei bislang durchgeführten Untersuchungen zur Rolle der maternalen Komponente von Rap1 konnten in den Kutikulapräparaten des *Rap1^{CD5}*-Allels nur ventral offene Embryonen, z.T. mit einem zusätzlichen dorsalen Loch und Kutikulaphänotypen mit großen anterioren Löchern beobachtet werden (Boettner et al., 2003). Ein starker Phänotyp, wie er in Linie *Rap1⁵⁷⁰³* zu beobachten ist, konnte bislang nicht gefunden werden. Dies deutet darauf hin, daß es sich hierbei um das bislang stärkste *Rap1*-Allel handelt.

Der zygotische Phänotyp der Mutation in *Rap1⁵⁷⁰³* führt hingegen zur larvalen Letalität, ein Phänotyp, der bislang bei allen bekannten *Rap1*-Allelen beobachtet wurde (Hariharan, 1991; Asha, 1999).

4.3 Der Verlust der maternalen Komponente von *Rap1⁵⁷⁰³* führt zu erhöhtem Zelltod im Embryo

Während der Embryonalentwicklung von *Rap1⁵⁷⁰³* KBK Embryonen konnte ektopischer Zelltod beobachtet werden. Als primärer Effekt für das Auftreten von ektopischen Zelltod sind Defekte im Apoptosesignalweg anzusehen. Das erhöhte Vorkommen von Apoptose kann aber auch als sekundärer Effekt auftreten, wenn Zellen auf Grund einer Fehlfunktion ihre Morphologie ändern, Kontakt zu Nachbarzellen verlieren und so aus dem Zellverband ausscheiden.

Eine mögliche direkte Rolle von Rap1 im Apoptose-Signalweg wurde noch nicht untersucht, kann aber weitgehend ausgeschlossen werden, da in dem Fall entweder kein Zelltod oder massiver Zelltod zu erwarten wäre (Grether et al., 1995; Chen et al., 1996; White et al., 1996). Somit ist es wahrscheinlich, daß hier durch die betroffene Morphologie die Gewebe zerfallen und Zellen in den Zelltod gehen.

Der starke Kutikulaphänotyp, der bei *Rap1*⁵⁷⁰³ KBK Embryonen zu beobachten, und von kleinen Kutikularesten gekennzeichnet ist, kann (möglicherweise) auch auf den ektopischen Zelltod zurückzuführen sein. So geht auch der Verlust der Kutikula in *crb* mutanten Embryonen, der dem bei *Rap1*⁵⁷⁰³ KBK Embryonen beobachteten Phänotyp ähnelt, mit Zelltod in epidermalen Primordien einher (Tepass und Knust, 1990). In *crb* mutanten Embryonen beginnen ab Stadium 11 epidermale Zellen ihre normale, säulenförmige Morphologie zu verlieren, Zellen und Kerne runden sich ab und Gewebedisorganisation und ektopischer Zelltod treten auf. Die zu beobachteten Kutikulareste sind Sekretionsprodukte einiger epidermaler Zellen, die Vesikel bilden, oder der Tracheen.

4.4 *Rap1*⁵⁷⁰³ spielt eine Rolle in der Morphogenese und bei der Aufrechterhaltung von Zellpolarität

In *Rap1*⁵⁷⁰³ KBK Embryonen sind schon ab frühen Entwicklungsstadien Defekte in der Morphologie zu beobachten. Diese äußern sich in Zellformveränderungen, einer Verdrehung der Embryonen um die anterior/posteriore- Achse, Defekte bei der ventralen Invagination und Verlust des Zusammenhalts der Zellen untereinander. Ähnliche Defekte, welche die Morphologie betreffen, konnten bei Untersuchungen an *Rap1*^{CD3} KBK Embryonen (Asha et al., 1999) gemacht werden. Hier konnten neben Defekten bei der ventralen Invagination Defekte bei der Kopfinvagination und beim dorsalen Schluß beobachtet werden.

Diese Defekte deuten darauf hin, daß Rap1 bei gewissen morphogenetischen Prozessen, die im Rahmen der Embryonalentwicklung von *Drosophila* durchgeführt werden, eine Rolle spielt. Es beeinflusst jedoch nicht alle Prozesse, die eine Änderung in der Zellmorphologie erfordern, da z.B. der Prozeß der Keimstreifausstreckung normal verläuft.

Die Bewegung ganzer Gewebe, z.B. bei Prozessen der Invagination, erfordert eine Änderung der Zellmorphologie, welche wiederum über Änderungen im Zytoskelett erfolgen. Diese Prozesse sind nötig, um bei Zellformänderungen gleichzeitig stabile Zellkontakte bei zu behalten, damit die Zellen im Gewebeverband verbleiben.

Da bei Verlust von Rap1 Defekte in morphogenetischen Prozessen auftreten, legt das die Vermutung nahe, daß Rap1 eine Schlüsselfunktion in der Verbindung von Zellen mit dem Zytoskelett und/oder bei der Organisation des Zytoskeletts spielt.

Eine Rolle von Rap1 bei der Regulation von Morphogenese konnte auch in anderen Spezies gezeigt werden.

So stellte sich Rap1 auch in Säugetieren als Regulator der Zellmorphologie heraus. In PC12 Zellen konnte gezeigt werden, daß die Expression einer dominant negativen Form von Rap1B die neuronale Differenzierung als Antwort auf Nervenwachstumsfaktoren blockiert. Nervenwachstumsfaktoren induzieren in PC12 Zellen über die kleinen GTPasen Ras und Raf eine frühe Phase von MAP Kinase Aktivierung, die für Proliferation nötig ist. Eine später anhaltende Aktivierung über Rap und B-Raf wird für die Differenzierung der Zellen benötigt (York et al., 1998).

Auch bei der Aggregation von menschlichen Blutplättchen spielt Rap1 eine Rolle. Rap1B wird durch einen Anstieg der intrazellulären Kalziummenge während der Aggregation aktiviert (Franke et al., 1997). Diese Aggregation ist abhängig von der Reorganisation des Zytoskeletts und von der Änderung der Zell-Zell und Zell-Substrat Adhäsion. Auch dies deutet auf eine Rolle von Rap1 bei morphologischen Änderungen als Antwort auf verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden.

In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist das Rap1 ortholog BUD1 an der Knospenausbildung beteiligt. Hierbei zeigt sich auch ein Zusammenhang zwischen Rap1 und Zellpolarität, da BUD1 für die Polarisierung des Aktinzytoskeletts an den Stellen der sich formierenden Knospen nötig ist (Chant, 1996).

In Zellkultur (MDCK-Zellen) konnte kürzlich gezeigt werden, daß Rap1 die Formation der auf E-Cadherin basierenden Zellkontaktstrukturen reguliert, bzw. daß E-Cadherin mit einem Rap1 Aktivator (C3G) interagiert (Hogan et al, 2004; Price et al, 2004).

4.4.1 Der Verlust von Rap1 führt auch in *Drosophila* zu Defekten in der Zellpolarität

Auf zellulärer Ebene finden sich neben Zellformveränderungen, die schon während der Zellularisierung der *Rap1*⁵⁷⁰³ KBK Embryonen beobachtet werden können, auch Störungen in der Zellpolarität. Diese äußern sich in einer anormalen Veränderung der Lokalisation verschiedener Markerproteine, wie Bazooka (Baz), Armadillo (Arm) und Canoe (Cno).

4.4.1.1 Rap1 und Baz/Interagiert Rap1 mit dem Baz-Komplex?

Die wildtypische, subapikale Lokalisation des Bazooka Proteins ist für die Etablierung der ZA und die Rekrutierung von Crumbs zum apikalen Pol notwendig.

Der Verlust von *Rap1*⁵⁷⁰³ scheint die frühe, subapikale Baz Lokalisation nicht zu beeinträchtigen, führt während der Gastrulation aber zu einer diffusen Baz Lokalisation, bis hin zum Verlust von Baz. Dies deutet darauf hin, daß *Rap1* in *Drosophila* keine Rolle bei der Etablierung der Zellpolarität, wohl aber bei der Aufrechterhaltung derselben spielt. Es kann weiterhin vermutet werden, daß Rap1 vor allem bei der Zell-Adhäsion eine Rolle spielt, da Defekte bei einsetzender Gastrulation auftreten, d.h. zu einem Zeitpunkt, an dem viele morphogenetische Veränderungen stattfinden. Diese Beobachtung trifft auch auf *Rap1*-Klone in Flügelimaginalscheiben (Knox und Brown, 2002) zu, wo Defekte erst bei einsetzender Gewebewegung auftreten.

Eine Interaktion von Rap1 mit dem Baz-Komplex (Baz, aPKC, Par-6) könnte eventuell über die kleine GTPase Cdc42 stattfinden. Ein Zusammenhang zwischen Cdc42 und Rap1 konnte kürzlich bei der Determination von neuronaler Polarität in der Ratte nachgewiesen werden (Schwamborn und Püschel, 2004). Auch bindet Cdc42GTP an Par-6, was zur Verstärkung der Kinaseaktivität der an Par-6 gebundenen aPKC führt (Yamanaka et al., 2001)(MDCK-Zellen). Ebenso interagiert das Rap1 Hefe Ortholog BUD1 mit Cdc24, einem GEF (Guanin nucleotide exchange factor = Aktivator) von Cdc42 (Park et al, 1999).

Da der Proteinkomplex um Par-3 (Vertebraten Baz Homolog) in Interaktion mit Cdc42 in der Astrozytenwanderung an der Formation von polarisierten Zellausläufern beteiligt ist, die eine Reorganisation des Mikrotubulinnetzwerks erfordern (Etienne-Manneville, 2001), stellt sich die Frage, ob auch Rap1 in *Drosophila* über diesen Weg einen Einfluß auf das Mikrotubulinnetzwerk nehmen kann, um Zellformen zu beeinflussen.

4.4.1.2 (Wie) interagiert Rap1 mit Komponenten der ZA?

Bei Analysen von *Rap1*-Klonen in *Drosophila* Imaginalscheiben konnte gezeigt werden, daß die *Rap1*-Aktivität für eine gleichmäßige Verteilung der *adherens junctions* (AJs) rund um die Zellen benötigt wird (Knox und Brown, 2002). In *Rap1*-Klonen sind die AJs zwischen zwei mutanten Zellen nur an einer Seite der Zellen konzentriert, so daß es bei Bewegung der Gewebe zu ektopischer Zellwanderung kommt. Des weiteren wird eine Rolle von Rap1 bei der Zellteilung vermutet, da Rap1 an den AJs zwischen neugebildeten Tochterzellen angereichert ist, um vermutlich den Neuaufbau der AJs zu regulieren (Knox und Brown, 2002).

In frühen Stadien, während der Etablierung der ZA, ist in *Rap*⁵⁷⁰³ KBK Embryonen das β -Catenin Homolog Armadillo (Arm), welches die AJs mit dem Aktinzytoskelett verbindet, wie im Wildtyp lokalisiert. Mit Beginn der Gastrulation ist das Protein, einhergehend mit sich verändernder Zellmorphologie, nicht mehr lokalisiert. Wie schon in den Flügelimaginalscheiben gezeigt, scheint auch im *Drosophila* Embryo Rap1 an der Stabilisierung der ZA beteiligt zu sein. Solange sich die Zellverbände nicht bewegen, sind keine Defekte zu beobachten, gewinnt aber bei morphogenetischen Bewegungen die Adhäsion der Zellen untereinander an Bedeutung, sind Veränderungen in der Zellmorphologie und in der Verteilung des Arm Proteins zu beobachten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß Rap1 auch im *Drosophila* Embryo an der Regulierung der Zell-Kontaktstrukturen beteiligt ist.

Über welchen Mechanismus Rap1 auf die Zell-Kontaktstrukturen wirkt, konnte für *Drosophila* noch nicht gezeigt werden. Für das Vertebraten Homolog ist jedoch beschrieben, daß Rap1 über E-Cadherin eine Regulation der Zell-Kontakte bewirkt (Hogan et al, 2004; Price et al, 2004). Hierbei stellt ein Aktivator von Rap1, der Nukleotid Austauschfaktor C3G, welcher mit der zytoplasmatischen Domäne von E-Cadherin interagiert, die Verbindung zwischen Rap1 und E-Cadherin her. C3G stellt vermutlich auch in *Drosophila* einen Rap1 Aktivator dar (Ishimaru et al., 1999), der Nachweis einer Interaktion von C3G und Rap1 und ihre Wirkung auf die AJs und/oder eine Interaktion mit DE-Cadherin steht noch aus.

4.4.1.3 Rap1 wird für die Lokalisation von Cno benötigt

Die erste Mislokalisierung von Markerproteinen, die in *Rap1*⁵⁷⁰³ KBK Embryonen zu beobachten ist, ist die Nicht-Lokalisation von Cno. Cno, ein PDZ-Domänen-Protein, ist im Wildtyp ab St.6 in Epithelzellen im Bereich der ZA lokalisiert (Takahashi et al., 1998) und wird später für den Prozeß des dorsalen Schluß im *Drosophila* Embryo benötigt (Jürgens et al., 1984).

Zunächst konnte in Vertebraten (Linnemann et al, 1999), kürzlich aber auch für *Drosophila* (Boettner et al, 2003) gezeigt werden, daß Rap1 mit Cno (*Drosophila* AF-6 Ortholog) *in vivo* interagiert. Die Untersuchungen in *Drosophila* wurden in Bezug auf den Prozeß des dorsalen Schluß durchgeführt, Cno stellt einen Rap1-Effektor während dieses Prozesses dar. Diese Untersuchungen zur Rap1 Funktion wurden mit Hilfe eines dominant negativ wirkenden Rap1 Allels durchgeführt und führten unter anderem zu der Schlußfolgerung, daß Rap1 nicht für die Lokalisation von Cno benötigt wird. Da die Expression des dominant negativen Rap1 jedoch die endogene Rap1 Aktivität nicht vollständig reduzieren konnte, ist nicht auszuschließen, daß die geringe Restproteinmenge zur Cno Lokalisation ausreicht.

Da im Rahmen dieser Arbeit in den *Rap1*⁵⁷⁰³ KBK Embryonen die Mislokalisierung von Cno vor allen anderen beobachteten Polaritätsdefekten auftritt, ist es wahrscheinlich, daß es sich hierbei nicht um einen sekundären, durch morphologische Defekte hervorgerufenen Effekt handelt. Es kann auch vermutet werden, daß Rap1 für die frühe Lokalisation des Cno Proteins benötigt wird.

Eine Verbindung zwischen Rap1, Cno und der ZA könnten die Proteine Polychaetoid (Pyd; *Drosophila* ZO-1) und \square Catenin darstellen. Cno interagiert mit dem multidomänen Verbindungsprotein Pyd (DZO-1) (Takahashi et al. 1998), für dessen Vertebraten Homolog ZO-1 eine Verbindung zu der *adherens junctions* (AJs) Komponente \square Catenin gezeigt wurde, welche wiederum die Verbindung zwischen den AJs und dem Aktinzytoskelett gewährleistet (Itoh et al., 1997). Auch eine direkte Verbindung von AF-6 (Vertebraten Cno Ortholog) zum Aktinzytoskelett über Profilin konnte in MDCK Zellen nachgewiesen werden (Boettner et al., 2000).

Somit wäre die Interaktion von Rap1 und Cno eine weitere Regulationsmöglichkeit für die Stabilität der AJ und das Aktinzytoskelett.

(1) In *Drosophila* konnte gezeigt werden, daß Canoe (Cno; *Drosophila* AF-6 Ortholog) ein Effektor von Rap1 ist (Boettner et al., 2003). Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluß zu, daß Rap1 für die Lokalisation von Cno in *Drosophila* Epithelzellen benötigt wird. (2) Cno wiederum bindet an Polyactoid (Pyd), das *Drosophila* ZO-1 Ortholog (Takahashi et al., 1998).

(3) In Vertebraten konnten zwei Wege gefunden werden, über die Rap1, in Verbindung mit AF-6 bzw. ZO-1 mit dem Aktinzytoskelett in Verbindung steht. Zum einen wurde nachgewiesen, daß AF-6 über die Bindung mit Profilin mit Aktin interagiert (Boettner, 2000), zum anderen konnte gezeigt werden, daß ZO-1 in nichtepithelialen Zellen eine Verbindung zwischen \square Catenin und dem Aktinnetzwerk darstellt (Itoh et al., 1997). (4) Eine Interaktion mit Komponenten des Crumbs-Komplex konnte bislang nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Interaktion mit Crumbs kann genetisch im *Drosophila* Auge überprüft werden. Durch ektopische *crb*-Expression mit Hilfe des GMR-Treibers (Glass Multimer Reporter; Hay et al., 1994) wird ein rauher Augenphänotyp induziert, der durch zusätzliche Entfernung von Interaktionspartnern verstärkt oder abgeschwächt werden kann (Pellikka, et al., 2002; Izaddoost et al., 2002; Johnsaon et al., 2002; Grzeschik, 2003). Die Mutation in der Linie Rap1⁵⁷⁰³ führt zu einer Verstärkung des durch GMR-*crb* induzierten rauhen Augenphänotyps (Daten nicht gezeigt). Eine funktionelle Interaktion von Crb und Rap1 im Embryo, die durch eine Repression des *crb*-Phänotyps gezeigt wäre, konnte nicht beobachtet werden. Somit ist eine funktionelle Interaktion von Crb und Rap1 im Auge möglich, für den Embryo jedoch unwahrscheinlich.

In *Drosophila* konnte gezeigt werden, daß Rap1 bei der Regulation der ZA in der Flügelimaginalscheiben eine Rolle spielt (Knox und Brown, 2002). Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte beobachtet werden, daß Rap1 an der Aufrechterhaltung der ZA im *Drosophila* Embryo beteiligt ist. (5) In Vertebraten konnte kürzlich nachgewiesen werden, daß diese Regulation der Zell-Zell-Kontaktstruktur durch Rap1 über Interaktion mit dem Protein E-Cadherin erfolgt (Hogan et al., 2004; Price et al., 2004).

Eine direkte Interaktion von Rap1 mit dem Bazooka-Komplex konnte nicht gezeigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte beobachtet werden, daß ein Verlust von Rap1 zu Mißlokalisationen von Bazooka (Baz) in *Drosophila* Epithelzellen und Neuroblasten führt.

(6) Eine Interaktion mit dem Baz-Komplex ist über die kleine GTPase Cdc42 denkbar. Cdc42 bindet an PAR-6, welches mit Par-3 (Vertebraten Baz Homolog) einen Komplex bildet.

In Vertebraten konnte nachgewiesen werden, daß die Interaktion von Rap1 und Cdc42 bei der Determination von neuronaler Polarität eine Rolle spielt (Scharmhorn und Püschel, 2004).

(7) Über Cdc42 ist nicht nur eine Verbindung zum Baz-Komplex möglich, hierüber könnte Rap1 auch an der Regulation des Mikrotubulinetzwerkes beteiligt sein. In der Hefe *S. cerevisiae* ist das Rap1 Ortholog BUD1 in Verbindung mit Cdc42 an der Knospung beteiligt, welche eine Reorganisation des Zytoskeletts erfordert (Park et al., 1999). Auch bei der Astrozytenwanderung ist Cdc42 bei der Formation von polarisierten Zellausläufern an der Mikrotubuliorganisation beteiligt (Etienne-Manneville et al., 2001).

(8) Eine weitere Beteiligung von Rap1 an der Regulation von Kontaktstrukturen konnte in Vertebraten bei Zell-Matrix-Verbindungen gezeigt werden. Rap1 kontrolliert die zelluläre Adhäsion durch Modulation der Integrinfunktion (Reedquist et al., 2000). Die extrazelluläre Matrix (ECM) ist an der Kontrolle der Zellmorphologie und Wanderung bzw. Bewegung beteiligt, indem Signale über Transmembranrezeptoren, wie den Integrinen, direkt zu den Zellen weitergeleitet werden. Bindung von Liganden an Integrine führen zu deren Gruppenbildung, was zur Rekrutierung von Aktinfilamenten führt.

Beobachtete Defekte in der Morphogenese der *Drosophila Rap1⁻* Embryonen könnten auch durch gestörte Signalgebung zwischen Rap1 und Integrinen stammen. Ein Zusammenhang zwischen Rap1 und Integrinen wurde bislang nicht untersucht, wobei zu berücksichtigen ist, daß Integrine erst später expremiert werden.

4.6 Ausblick

Rap1 ist in vielen Organismen an unterschiedlichen Prozessen beteiligt. Diese Prozesse haben die Regulation des Zytoskeletts und/oder die Regulation von Zell-Adhäsion gemein.

In *Drosophila* stehen die Analysen zum Verständnis der Rap1-Funktion erst am Anfang, der Einblick in die Funktion dieses Gens in anderen Spezies verdeutlicht aber seine Bedeutung für das Verständnis der Aufrechterhaltung der Zell-Adhäsion und der Regulation des Aktinzytoskeletts.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen deuten darauf hin, daß Rap1 im *Drosophila* Embryo an der Aufrechterhaltung der Zellpolarität beteiligt ist.

Weitere Untersuchungen sind nötig, um zu differenzieren, in welche der aufgezeigten Prozesse es regulatorisch eingreift und welche Interaktionspartner hierbei eine Rolle spielen.

V. Zusammenfassung

Epithelien sind Abschlußgewebe, die sich durch intensive Zell-Zell-Kontakte und die apiko-basale Polarität ihrer Zellen auszeichnen. Neben ihrer Funktion bei der Abgrenzung von Körperkompartimenten spielen Epithelien eine wichtige Rolle beim vektoriellen Transport vieler Substanzen. Viele Gene, die am Aufbau und der Aufrechterhaltung der epithelialen Integrität beteiligt sind, konnten bereits identifiziert werden. Jedoch sind noch nicht alle Prozesse vollständig aufgeklärt und noch nicht alle Interaktionspartner schon bekannter beteiligter Proteine gefunden. Zum Verständnis des gesamten Ablaufs sind diese Informationen essentiell. Da vermutet werden kann, daß entscheidende Genprodukte als maternale mRNA oder Protein bereitgestellt werden, wurde systematisch nach Genen gesucht, die maternal exprimiert werden. Auch im hiesigen Labor wurde solch ein "Screen" mit homozygot letalen P-Elementinsertionslinien durchgeführt. Hierzu wurden Keimbahnklone (KBK) von den Linien erzeugt und nach Kutikulaphänotypen gesucht, die auf eine Störung in der Epithelentwicklung deuten. Bei dieser Analyse wurde ein neues *Rap1*-Allel, *Rap1*⁵⁷⁰³, gefunden, welches im Rahmen dieser Arbeit näher molekular und genetisch analysiert und phänotypisch durch immunohistochemischen Untersuchungen charakterisiert wurde. *Rap1*⁵⁷⁰³ KBK Embryonen zeigen starke morphologische Defekte. Auf zellulärer Ebene finden sich neben Zellformveränderungen, die schon während der Zellularisierung der *Rap1*⁵⁷⁰³ KBK Embryonen beobachtet werden können, auch Störungen in der Zellpolarität. Diese äußern sich in einer anormalen Veränderung der Lokalisation verschiedener Markerproteine, wie Bazooka (Baz), Armadillo (Arm) und Canoe (Cno). Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß *Rap1* in *Drosophila* keine Rolle bei der Etablierung der Zellpolarität, wohl aber bei der Aufrechterhaltung derselben spielt. Es kann weiterhin vermutet werden, daß Rap1 vor allem bei der Zell-Adhäsion eine Rolle spielt, da Defekte bei einsetzender Gastrulation auftreten, d.h. zu einem Zeitpunkt, an dem viele morphogenetische Veränderungen stattfinden. Hierbei steht vor allem die mögliche Regulation des Zytoskeletts im Vordergrund. Über welchen Mechanismus Rap1 auf die Zell-Kontaktstrukturen wirkt, konnte für *Drosophila* noch nicht gezeigt werden. Weitere Untersuchungen sind nötig, um zu differenzieren, in welche Prozesse Rap1 in *Drosophila* regulatorisch eingreift und welche Interaktionspartner hierbei eine Rolle spielen.

VI. Literatur

Alberts et al. (1990). *Molekularbiologie der Zelle*, 2.Auflage, VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim

Asha, H., de Ruiter, N. D., Wang, M.-G. and Hariharan, I. K. (1999). The Rap1 GTPase functions as a regulator of morphogenesis *in vivo*. *EMBO J* 18: 605-615

Ashburner, M. (1989). *Drosophila*, A Laboratory Handbook. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press

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

Bachmann, A., Timmer, M., Sierralta, J., Pietri, G., Gundelfinger, E.D., Knust, E. und Thomas, U. (2004). Cell type-specific recruitment of *Drosophila* Lin-7 to distinct MAGUK-based protein complexes defines novel roles for Sdt and Dlg-S97. *J Cell Science* 117: 1899-1909

Bier, E., Vaessin, H., Shepherd, S., Lee, K., McCall, K., Barbel, S., Ackerman, L., Carretto, R., Uemura, T., Grell, E., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1989). Searching for pattern and mutation in the *Drosophila* genome with a P-*lacZ* vector. *Genes & Development* 3:1273-1287

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. and Perrimon, N. (2003). Integrated activity of PDZ protein complexes regulates epithelial polarity. *Nature Cell Biol.* 5:53-58

Birnboim H. C. and Doly J. (1979). A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-1523

Boettner, B., Govek, E.-E., Cross, J und Van Aelst, L.(2000). The junctional multidomain protein AF-6 is a binding partner of the Rap1A GTPase and associated with the actin cytoskeletal regulator profilin. *PNAS* 97: 9064-9069

Boettner, B., Harjes, P., Ishimaru, S., Heke, M., Fan, H., Q., Qin, Y., Van Aelst, L. and Gaul, U. (2003). The AF-6 Homolog Canoe Acts as aRap1 Effector During Dorsal Closure of the *Drosophila* Embryo. *Genetics* 165: 159-169.

Boriack-Sjodin, P. A., Margarit, S. M., Bar-Sagi, D. and Kuriyan, J. (1998). The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature*, 394: 337-343.

- Bos, J. L.** (1997). Ras-like GTPases. *Biochim. Biophys. Acta* 1333: M19-M31
- Bryant, P.J.** (1997). Junction genetics. *Dev. Genet.* 20:75-90
- Campos-Ortega, J. A. und Hartenstein, V.** (1997). The embryonic development of *Drosophila melanogaster*, 2nd Edition (Berlin:Springer)
- Caron, E.** (2003). Cellular functions of the Rap1 GTP-binding protein: a pattern emerges. *J Cell Science* 116:435-440
- Chant, J.** (1996). Generation of cell polarity in yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8:557-565
- Chen, F., Barkett, M., Ram, K. T., Quintanilla, A. and Hariharan, I. K.** (1997). Biological characterization of *Drosophila* Rapgap1, a GTPase activating protein for Rap1. *Genetics* 94:12485-12490
- Chen, P., Nordstrom, W., Gih, B. und Abrams, J. M.** (1996). Grim a novel cell death gene in *Drosophila*. *Genes Dev* 10: 1773-1782
- Chou, T.-B. und Perrimon, N.** (1992). Use of Yeast site-specific recombinase to produce female germline chimera in *Drosophila*. *Genetics* 131:643-653
- Chou, T.-B. und Perrimon, N.** (1996). The Autosomal FLP-DFS Technique for generating Germline Mosaics in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 144: 1673-1679
- Daniel, J.M., und Reynolds, A.B.** (1997). Tyrosine phosphorylation and cadherin/catenin function. *Bioessays* 19: 883-391
- Drubin, D. G. und Nelson, W. J.** (1996). Origins of cell polarity. *Cell* 84:335-344
- Eaton, S., Simons, K.** (1995). Apical, basal, and lateral cues for epithelial polarization. *Cell* 82:5-8
- Etienne-Manneville, S. und Hall, A.** (2001). Integrin-Mediated Activation of Cdc42 Controls Cell Polarity in Migrating Astrocytes through PKC ζ . *Cell* 106: 489-498
- Faivre-Sarrailh, C., Banerjee, S., Li, J., Hortsch, M., Laval, M. und Bhat, M. A..** (2004). *Drosophila* contactin, a homolog of vertebrate contactin, is required for septate junction organization and paracellular barrier function. *Dev.* 131: 4931-4942
- Franke, B, Akkerman, J. W. and Bos, J. L.** (1997). Rapid Ca²⁺-mediated activation of Rap1 in human platelets. *EMBO J.*, 16: 252-259
- Genova, J. L. und Fehon, R. G.** (2003). Neuroglian, Gliotactin, and the Na⁺/K⁺-ATPase are essential for septate junction function in *Drosophila*. *JCB* 161: 979-989

Golic, K. G. und Lindquist, S. (1989). The FLP recombinase of Yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* 59:499-509

Gödde, W. (2001). Suche nach maternalen Komponenten der Epithelentwicklung. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Düsseldorf

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

Grether, M. E., Abrams, J. M., Agapite, J., White, K. und Steller, H. (1995). The head involution defective gene of *Drosophila melanogaster* functions in programmed cell death. *Genes Dev* 9: 1694-1708

Grzeschik, N. (2003). Suche nach funktionellen Interaktionspartnern von *crumbs* mit Hilfe eines *crumbs*-induzierten rauen Augenphänotyps. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Düsseldorf

Gumbiner, B. M. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84:345-357

Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279: 509- 514

Hariharan, I. K., Carthew R. W. and Rubin, G. M. (1991). The *Drosophila* *Roughened* Mutation: Activation of a rap Homolog Disrupts Eye Development and Interferes with Determination. *Cell* 67:717-722

Hartsch, M., Ratel, N. H., Bieber, A. J., Tarquina, Z. R. und Goodman, C. S. (1990). *Drosophila* neurotactin, a surface glycoprotein with homology to serine esterases, is dynamically expressed during embryogenesis. *Development* 110:1327-1340

Hay, B.A., Wolff, T. und Rubin, G.M. (1994). Expression of baculovirus P34 prevents cell death in *Drosophila*. *Dev.* 120: 2121-2129

Hogan, C., Serpente, N., Cogram, P., Hosking, C. R., Bialucha, C. U., Feller, S. M., Braga, V. M. M, Birchmeier, W. and Fujita, Y. (2004). Rap1 Regulates the Formation of E-cadherin-based Cell-Cell-Contacts. *MCB* 24: 6690-6700

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

Hunter, C. und Wieschaus, E. (2000). Regulated expression of *nullo* is required for the formation of distinct apical and basal adherens junctions in *Drosophila* blastoderm. *JCB* 150:391-401

Hynes, R. O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25

- Ishimaru, S., Williams, R., Clark, E., hanafusa, H. und Gaul, U.** (1999). Activation of the *Drosophila* C3G leads to cell fate changes and overproliferation during development, mediated by the RAS-MAPK pathway and Rap1. *The EMBO Journal* 18: 145-155
- Itoh, M., Nagafuchi, A-, Moroi, S. and Tsukita, S.** (1997). Involvement of ZO-1 in Cadherin-based Cell Adhesion through Ist Direct Binding to \square Catenin and Actin Filaments. *JCB* 138: 181-192
- 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
- Jacob, L., Opper, M., Metzroth, B., Phannavong, B. und Mechler, B.M.** (1987). Structure of the l(2)gl gene of *Drosophila* and delimitation of its tumor suppressor domain. *Cell* 50: 215-225
- 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., Kluding, H.** (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. II. Zycotic loci on the third chromosome. *Wilhelm Roux's Arch* 193:283-295
- Kinch, M.S: and Burridge, K.** (1995). Altered adhesion in ras-transformed breast epithelial cells. *Biochem. Soc. Trans.* 23: 446-450
- Kitayama, H., Sugimoto, Y., Matsuzaki, T., Kawa, Y., and Noda, M.** (1989). A ras-related gene with transformation suppressor activity. *Cell* 56:77-84
- 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
- Lecuit, T. und Wieschaus, E.** (2000). Polarized insertion of new mambrane from a cytoplasmic reservoir during cleavage of the *Drosophila* embryo. *JCB* 150:849-860
- Lindsley D. L. and Zimm G. G.** (1992). *The Genome of Drosophila melanogaster*. Acad. Press, San Diego
- Linnemann, T., Geyer, M-, Jainter, B. K., Block, C., Kalbizzer H. R., Wittinghofer, A. und Herrmann, C.** (1999). Thermodynamic and Kinetic Characterization of the Interaction between the Ras Binding Domain of AF6 and Members of the Ras Subfamily. *JBC* 274: 13556-13562
- Luschnig S., Moussian, B., Krauss, J., Desjeux, I., Perkovic, J. und Nüsslein-Volhard, C.** (2004). An F1 Genetic Screen for Maternal-Effect Mutations Affecting Embryonic Pattern Formation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 167: 325–342

- McKeown, C., Praitis, V. und Austin, J.** (1998). Sma-1 encodes a β_H -spectrin homolog required for *Caenorhabditis elegans* morphogenesis. *Development* 125:2087-2098
- Miller K. G., Field C. M. and Alberts B. M.** (1989). Actin-binding proteins from *Drosophila* embryos: a complex network of interacting proteins detected by F-actin affinity chromatography. *JCB* 109: 2963-2975
- Mullis, K. B. and Faloona F. A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350
- Müller, H.-A. J.** (2000). Genetic control of epithelial cell polarity: lessons from *Drosophila*. *Developmental Dynamics* 218:52-67
- Müller, H.-A. J. 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
- Nelson, W. J.** (1992). Regulation of cell surface polarity from bacteria to mammals. *Science* 258:948-955
- Nüsslein-Volhard C., Wieschaus E., Kluding H.** (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. I. Zygotic loci on the second chromosome. *Wilhelm Roux's Arch* 193:267-282
- Park, H.-O., Sanson, A. und Herskowitz, I.** (1999). Localization of Bud2p, a GTPase-activating protein necessary for programming cell polarity in yeast to the presumptive bud site. *Genes & Dev* 13: 1912-1917
- Patel, N. H., Snow, P. M. und Goodman, C. S.** (1987). Characterization and cloning of fasciclin III: a glycoprotein expressed on a subset of neurons and axon pathways in *Drosophila*. *Cell* 48:975-988
- Pelikka, M., Tanentzapf, G., Pinto, M., Smith, C., McGlado, 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., Engstrom, L. und Mahowald, A. P.** (1989). Zygotic lethals with specific maternal effect phenotypes in *Drosophila melanogaster*. I. Loci on the X Chromosome. *Genetics* 121:333-352
- Petroncki, M und Knoblich, J.** (2001). DmPAR-6 directs epithelial polarity and asymmetric cell division of neuroblasts in *Drosophila*. *Nature Cell Biol.* 3: 43-49
- Potempa, S. and Ridley A.J.** (1998). Activation of both MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase by Ras is required for hepatocyte growth factor/scatter factor-induced adherence junction disassembly. *Mol. Biol. Cell* 9: 2185-2200

- Price, L. S., Hajdo-Milasinovic, A., Zhao, J., Zwartkruis, F. J. T., Collard, J. G. und Bos, J. L.** (2004). Rap1 regulates E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *J Biol. Chem.* 279: 35127-35132
- Prokopenko, S. N., Saint, R. and Bellen, H. J.** (2000). Untying the Gordian Knot of Cytokinesis: Role of Small G Proteins and Their Regulators. *JCB* 148:843-848
- Reedquist, K. A., Ross, E., Koop, E. A., Wolthuis, R. M., Zwartkruis, F. J., Van Kooyk, Y., Salmon, M. Buckley, C. D., and Bos, J. L.** (2000). The small GTPase Rap1, mediates CD31-induced integrin adhesion. *JCB* 148: 1151-1158
- Riggleman, B., Schedl, P. und Wieschaus, E.** (1990). Spatial expression of the *Drosophila* segment polarity gene armadillo is posttranscriptionally regulated by wingless. *Cell* 63:549-560
- Rodriguez-Boulan, E. und Nelson, W. J.** (1989). Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotyp. *Science* 245:718-725
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Ehrlich, H. A.** (1988). Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-Polymerase. *Science* 239:487-490
- Scheffzek, K. , Ahmadian, M. R., Kabsch, W., Wiesmuller, L., Lautwein, A., Schmitz, F. and Wittinghofer, A.** (1997). The Ras-RasGap complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* 277: 333-338
- Schwamborn, J. C. und Püschel, A.** (2004). The sequential activity of the GTPase Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nature Neuroscience* 7: 923-929
- Simons, K.** (1995). Biogenesis of epithelial cell surface polarity. *Harvey Lect* 89:125-46
- Takahashi, K., Matuso, T., Katsube, T., Ueda, R. und Yamamoto, D.** (1998). Direct binding between two PDZ domain proteins Canoe and ZO-1 and their roles in regulation of the Jun N-terminal kinase pathway in *Drosophila* morphogenesis. *Mech. Dev.* 78(1-2): 97-111.
- Tanentzapf, G. and Tepass, U.** (2003). Interactions between *crumbs*, *lethal giant larvae* and *bazooka* pathways in epithelial polarization. *Nature Cell Biol.* 5: 46-52
- Tepass, U.** (1997). Epithelial differentiation in *Drosophila*. *BioEssays* 19:673-682
- 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 neurectoderm and other morphogenetically active epithelia. *Genes Dev* 10:672-685
- Tepass, U. und Hartenstein, V.** (1993). The Development of Cellular Junctions in the *Drosophila* Embryo. *Dev Biol.* 161: 563-596

- 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. und Knust, E.** (1993). *crumbs* and *stardust* act in a genetic pathway that controls the organization of epithelia in *Drosophila melanogaster*. Developmental Biology 159:311-326
- 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
- Thomas, G. H. und Kiehart, D. P.** (1994). β_{Heavy} -spectrin has a restricted tissue and subcellular distribution during *Drosophila* embryogenesis. Development 120:2039-2050
- Tsukita, S. Oishi, K., Akiyama, T., Yamanashi, Y und Yamamoto, T.** (1991). Specific proto-oncogenic tyrosine kinases of src family are enriched in cell-to-cell adherens junctions where the level of tyrosine phosphorylation is elevated. J. Cell Biol. 113: 867-879
- Walsh, S. P., Metzger, D. A. and Higuchi, R.** (1991). Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques 10: 506-513
- White, K., Tahaoglu, E. und Steller, H.** (1996). Cell killing by the *Drosophila* gene *reaper*. Science 271: 805-807
- Wieschaus, E. und Noell, E.** (1986). Specificity of embryonic lethal mutations in *Drosophila* analysed in germ line clones. Roux's Arch Dev Biol 195:63-73
- Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C., Jürgens, G.** (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. III. Zycotic loci on the X chromosome and fourth chromosome. Wilhelm Roux's Arch 193:296-307
- Wodarz, A., Ramrath, A., Kuchinke, U. und Knust, E.** (1999). Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in *Drosophila* neuroblasts. Nature 402:544-547
- 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
- Woods, D.F. and Bryant, P.J.** (1991). The *discs-large* tumor suppressor gene of *Drosophila* encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. Cell 66: 451-464
- Xu, T. and Rubin, G.M.** (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. Dev 117: 1223-1237

Yamanaka, T., Horikooshi, Y., Suzuki, A., Sugiyama, Y., Kitamaru, K., Maniwa, R., Nagai, Y., Yamashita, A., Hirose, T., Ishikawa, H. und Ohno, S. (2001). PAR-6 regulates aPKC activity in a novel way and mediates cell-cell contact-induced formation of the epithelial junctional complex. *Genes to Cells* 6: 721-731

York, R. D., Yao, H., Dillon, T., Ellig, C. L., Eckert, S. P., McCleskey, E. W. and Stork, P. J. (1998). Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature*, 392: 622-626

Zwartkruis, F. J., and Bos, J. L. (1999). Ras and Rap1: two highly related small GTPases with distinct function. *Exp. Cell Res.* 253: 157-165

VII. Anhang

5.1. Abkürzungen

□-...	anti-...
Abb.	Abbildung
ähnl.	Ähnlich
anschl.	anschließend
Anz.	Anzahl
Bal.	Balancer
bp	Basenpaare
ca.	circa
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
Evtl.	eventuell
g	Gramm
Genom.	Genomisch
HRP	Meerrettich Peroxidase
Lsg	Lösung
m...	milli...(10 ⁻³)
M	Molarität (mol/l)
min	Minuten
Hm	homozygot
μ...	mikro...(10 ⁻⁶)
°C	Grad Celsius
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
St.-Lsg	Stamm-Lösung
Tab.	Tabelle
U	Unit
u.a.	unter anderem
UV-Licht	ultraviolettes Licht
ü.N.	über Nacht
Verd.	Verdünnung
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
z. T.	zum Teil
z. Z.	zur Zeit

5.3 Defizienzenkolektion des III. Chromosoms

Stamm	Df Kit	Genotyp	Bruchpunkte
2577	DK3	Df(3L)emc-E12/TM6B, Tb[1]	061A;061D03
439	DK3	Df(3L)Ar14-8, red[1]/TM2, p[p]	061C05-08;062A08
5411	DK3	Df(3L)Aprt-32/TM6	062B01;062E03
2400	DK3	Df(3L)R-G7, ve[1]/TM6B, Tb[+]	062B08-09;062F02-05
3650	DK3	Df(3L)M21, kni[ri-1] p[p]/In(3LR)T33[L]f19[R]	062F;063D
3649	DK3	Df(3L)HR119/TM6B, Tb[1]	063C02;063F07
3686	DK3	Df(3L)GN24/TM8, l(3)DTS4[1]	063F04-07;064C13-15
3096	DK3	Df(3L)ZN47, ry[506]/TM3, Sb[1]	064C;065C
4393	DK3	w[*]; Df(3L)XDI98, e[1]/TM6B, Tb[1]	065A02;065E01
1420	DK3	Df(3L)pbl-X1/TM6B, Tb[1]	065F03;066B10
1541	DK3	y[1] w[1] N[spl-1]; Df(3L)66C- G28/TM3, Sb[1]	066B08-09;066C09-10
4500	DK3	Df(3L)Scf-R6, th[1] st[1] cu[1] sr[1] ca[1]/TM3, Sb[1]	066E01-06;066F01-06
1688	DK3	Df(3L)Rdl-2, e[1]/TM3, Sb[1]	066F05;066F05
2479	DK3	Df(3L)29A6, kni[ri-1] p[p]/TM3, Sb[1]	066F05;067B01
997	DK3	Df(3L)AC1, roe[1] p[p]/TM3, Sb[1]	067A02;067D07-13 or 067A05;067D09-13
89	DK3	y[1?]; Df(3L)lxd6/TM3, Sb[1] Ser[1]	067E01-02;068C01-02
2611	DK3	Df(3L)vin5, ru[1] h[1] gl[2] e[4] ca[1]/TM3, Sb[1] Ser[1]	068A02-03;069A01-03
2612	DK3	Df(3L)vin7, ru[1] h[1] gl[2] e[4] ca[1]/TM3, Sb[1] Ser[1]	068C08-11;069B04-05
4507	DK3	Df(3L)iro-2, Sb[sbd-2]/TM3, Sb[1]	069B01-05;069D01-06
4366	DK3	In(3LR)C190[L]Ubx[42TR], Ubx[-]/sti[1]	069F03-04;070C03-04 + 089;089 (kleine Df irgendwo in 89)
3124	DK3	Df(3L)fz-GF3b, P{w[+tAR] ry[+t7.2AR]=wA[R]}; 66E/TM6B, Tb[1]	070C01-02;070D04-05
3126	DK3	Df(3L)fz-M21, th[1] st[1]/TM6	070D02-03;071E04-05
2992	DK3	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]	DK3	Df(3L)brm11/TM6C, cu[1] Sb[1]ca[1]	071F01-04;072D01-10
2993	DK3	Df(3L)st-f13, Ki[1] roe[1] p[p]/TM6B, Tb[1]	072C01-D01;073A03-04
2998	DK3	Df(3L)81k19/TM6B, Tb[1]	073A03;074F
2608	DK3	Df(3L)W10, ru[1] h[1] Sb[sbd- 2]/TM6B, Tb[1]	075A06-07;075C01-02

Stamm	Df Kit	Genotyp	Bruchpunkte
2990	DK3	Df(3L)Cat, kni[ri-1] Sb[sbd-1] e[*]/TM3, Ser[1]	075B08;075F01
3000	DK3	Df(3L)VW3/TM3, Sb[1]	076A03;076B02
3617	DK3	Df(3L)kto2/TM6B, Tb[1]	076B01-02;076D05
5126	DK3	Df(3L)XS-533/TM6B, Sb[1] Tb[1] ca[1]	076B04;077B
2052	DK3	Df(3L)rdgC-co2, th[1] st[1] in[1] kni[ri-1] p[p]/TM6C, cu[1] Sb[1]	077A01;077D01
3127	DK3	Df(3L)ri-79c/TM3, Sb[1]	077B-C;077F-78A
4429	DK3	Df(3L)ME107, mwh[1] red[1] e[1]/TM1, red[*]	077F03;078C08-09
3627	DK3	Df(3L)31A/Dp(3;3)C126, st[1] cp[1] in[1] kni[ri-1] p[p]	078A;078E, 078D;079B
4430	DK3	Df(3L)Pc-2q, ry[506]/TM2	078C05-06;078E03-079A01
4506	DK3	Df(3L)Ten-m-AL29/TM3, ry[RK] Sb[1]	079C01-03;079E03-08
4370	DK3	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	DK3	Df(3R)ME15, mwh[1] red[1] e[4]/MKRS	081F03-06;082F05-07
4787	DK3	Df(3R)3-4, ru[1] th[1] st[1]/TM3, Sb[1]	082F03-04;082F10-11
5694	DK3	w[*]; Df(3R)e1025-14/TM6B, Tb[1]	082F08-10;083A01-03
1990	DK3	Df(3R)Tpl10, Tp(3;3)Dfd[rv1], kni[ri-1] Dfd[rv1] p[p] Doa[10]/TM3, Sb[1]	083C01-02;084B01-02
1884	DK3	Df(3R)Scr, p[p] e[s]/TM3, Sb[1]	084A01-02;084B01-02
1842	DK3	Df(3R)Antp17/TM3, Sb[1]	084B01-02;084D11-12 or A06,D14
1968	DK3	Df(3R)p712, red[1] e[1]/TM3, Sb[1]	084D04-06;085B06
1962	DK3	Df(3R)p-XT103, ru[1] st[1] e[1] ca[1]/TM3, Ser[1]	085A02;085C01-02
1931	DK3	Df(3R)by10, red[1] e[1]/TM3, Sb[1]	085D08-12;085E07-F01
1893	DK3	Df(3R)by62, red[1] e[1]/TM1	085D11-14;085F06
3128	DK3	Df(3R)M-Kx1/TM3, Sb[1] Ser[1]	086C01;087B01-05
3003	DK3	Df(3R)T-32, (kni[ri-1]) cu[1] sr[1] e[s]/MRS	086E02-04;087C06-07
3007	DK3	Df(3R)ry615/TM3, Sb[1] Ser[1]	087B11-13;087E08-11
1534	DK3	Tp(3;Y)ry506-85C/MKRS	087D01-02;088E05-06;Y
383	DK3	Df(3R)ea, kni[ri-1] p[p]/TM3, Ser[1]	088E07-13;089A01

Stamm	Df Kit	Genotyp	Bruchpunkte
1467	DK3	Df(3R)P115, e[11]/TM1; Dp(3;1)P115/+ != Tp(3;1)P115	089B07-08;089E07-08;020
4431	DK3	Df(3R)DG2/TM2	089E01-F04;091B01-B02
3071	DK3	Df(3R)C4, p[*]/Dp(3;3)P5, Sb[1]	089E03-04;090A01-07
3011	DK3	Df(3R)Cha7/TM6B, Tb[1]	090F01-F04;091F05
3012	DK3	Df(3R)DI-BX12, ss[1] e[4] ro[1]/TM6B, Tb[1]	091F01-02;092D03-06
4962	DK3	Df(3R)H-B79, e[*]/TM2	092B03;092F13
3340	DK3	Df(3R)e-R1, Ki[1]/TM3, Sb[1]	093B06-07;093D02
2425	DK3	Df(3R)e-N19/TM2	093B;094
4940	DK3	cn[1]; Df(3R)mbc-30/TM3	095A05-07;095C10-11
2585	DK3	cn[1]; Df(3R)mbc-R1, ry[506]/TM3, Sb[1] ry[*]	095A05-07;095D06-11
4432	DK3	Df(3R)crb-F89-4, st[1] e[1]/TM3, Ser[1]	095D07-D11;095F15
2363	DK3	Df(3R)crb87-5, st[1] e[1]/TM3, Ser[1]	095F07;096A17-18
3468	DK3	Df(3R)slo[8]/Dp(3;3)Su[8]	096A02-07;096D02-04
5601	DK3	Df(3R)Esp13/TM6C, Sb[1]	096F01;097B01
1910	DK3	Df(3R)TI-P, e[1] ca[1]/TM3, Ser[1]	097A;098A01-02
823	DK3	Df(3R)D605/TM3, Sb[1] Ser[1]	097E03;098A05
430	DK3	w[1118]; Df(3R)3450/TM6B, Tb[1]	098E03;099A06-08
669	DK3	w[*]; Df(3R)Dr-rv1, ry[506]/TM3, ry[RK] Sb[1] Ser[1]	099A01-02;099B06-11
3547	DK3	Df(3R)L127/TM6; Dp(3;1)B152	099B05-06;099E04-F01
3546	DK3	Df(3R)B81, P{ry[+t7.2]=RP49}F2- 80A e[1]/TM3, Sb[1]; Dp(3;1)67A	099C08;100F05

Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und in Stellen der Arbeit –einschließlich Tabellen und Abbildungen–, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Fall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der geltenden Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Elisabeth Knust betreut worden.

Düsseldorf, im Oktober 2004

Danksagung

Diese Arbeit ist am Institut für Genetik der Heinrich-Heine-Universität unter Anleitung von Prof. Dr. Elisabeth Knust angefertigt worden. Ihr möchte ich für die Überlassung des Themas, die lehrreichen Diskussionen und die Unterstützung danken. Prof. Dr. H. Hegemann danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Allen Mitgliedern des Instituts danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und den Spaß- nicht nur bei den Wanderungen!

Dank an das **Fliegenlädchen**, daß es mir schon so lange eine schöne Heimat gab. Natürlich einen großen Dank an die ehemaligen und derzeitigen Insassen des Fliegenlädchens **Isa, Nico, Susi, Kevin, Özlem und Nadine**, dafür, daß ich mich immer wohl fühlen konnte.

Besonderen Dank an **Isa**, für den unbeschreiblichen Spaß, einfach überall und in jeder Situation, die guten Gespräche und natürlich für die stete Bereithaltung von Plan B- übrigens Isa, alles wird gut! Dank an **Nico** -der wahren Wok-Weltmeisterin- dafür, daß sie alles (fast) sofort möglich macht, nicht nur am Raster. **Susi** und **Özlem**, danke für das internationale Flair (Knusperflocken, Bulgur und Radio Multikulti). Und Dank an Euch alle für die offenen Ohren und guten Gespräche.

Olaf danke ich für die Einführung in die Mac-Welt, die Ausflüge in die Mc-Welt und dafür, daß das Kabuff immer eine offene Tür hat! **Ferdi** danke ich für fachliche und moralische Unterstützung; **Sandra** für die Bagels am Morgen; **Andre** dafür, daß er so ist, wie er ist; und **Britta** danke ich für die Sequenzierhilfe.

Nochmals einen extra Dank an Nico, Özlem und Papa für die Korrekturen!

Einen ganz besonders großen Dank an meine Familie!

Mama, ich hätte noch gerne manches Fest mit Dir gefeiert, aber Du hast recht: „Es fügt sich alles!“ Danke **Papa**, Du bist einfach der Beste. **Bri**, schön, daß es dich gibt und dieser Eierlikör.... Dank an **Henrike**, der besten Schwester der Welt -trotz der Entfernung- immer für mich da! **Birgit** danke ich für die Begleitung in jeglichen Lebenslagen. Den **Reinkens**, Danke für Alles, ich hab Euch lieb! **Tjorven** danke ich für das Kuscheln und die schöne Abwechslung an den Wochenenden.

Simon danke für Liebe, Verständnis und die gemeinsamen Träume! Ja, vi elsker dette landet, som det stiger frem, furet, værbit, over vannet, med de tusen hjem.