

**Untersuchungen zur Funktion der Ubiquitin  
spezifischen Protease *nonstop* im visuellen System  
von *Drosophila melanogaster*.**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(*Dr. rer. nat.*) der Naturwissenschaftlichen Fakultät III  
-Biologie und Vorklinische Medizin-  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Susanne Fischer aus Augsburg  
im Jahr 2001

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am 07. 02. 2001.

Die Arbeit wurde angeleitet von Herrn Prof. Dr. Stephan Schneuwly.

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Darnhofer-Demar

Prof. Dr. Schneuwly

Prof. Dr. Modrow

Prof. Dr. Heinze

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für  
Biologie und Vorklinische Medizin der Universität  
Regensburg unter der Betreuung von Herrn Prof.  
Dr. Stephan Schneuwly angefertigt.

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>8</b>
2.1	<i>Drosophila melanogaster</i> als Modellsystem	9
2.2	<b>Das Komplexauge und die optischen Loben</b>	<b>10</b>
2.2.1	Struktur und Entwicklung des Komplexauges	10
2.2.2	Adultstruktur der optischen Loben	13
2.2.3	Die Neurogenese der Lamina unter dem Einfluß der einwachsenden Photorezeptoren	14
2.2.4	Gliazellen des ersten optischen Ganglions	17
2.3	<b>Axonale Wegfindung</b>	<b>18</b>
2.3.1	Molekulare Grundlagen und Prinzipien	18
2.3.2	Der axonale Wegfindungsprozeß im visuellen System von <i>Drosophila melanogaster</i>	20
2.4	<b>Das Ubiquitin System</b>	<b>23</b>
2.5	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>26</b>
3.1	<b>Organismen und Medien</b>	<b>27</b>
3.1.1	Fliegenstämme	27
3.1.2	Immunreagenzien	28
3.1.2.1	Antikörper	28
3.1.2.2	NONSTOP Peptid-Seren	29
3.1.3	Bakterienstämme	29
3.1.4	Bakterienmedien	30
3.1.5	Plasmide	30
3.1.6	Phagenklon und cDNAs	30
3.2	<b>Histologie</b>	<b>31</b>
3.2.1	Immunfärbung an larvalen Gehirnen	31
3.2.2	Immunhistochemie an Gefrierschnitten	31
3.2.2.1	Adulte Köpfe	31
3.2.2.2	Weißer Puppen	31
3.2.2.3	β-Galactosidasefärbung	32
3.3	<b>Molekulare Methoden</b>	<b>32</b>
3.3.1	Molekulare Standardmethoden	32
3.3.1.1	Plasmid-Rescue	32
3.3.1.2	Sequenzierung	32
3.3.1.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	33
3.3.1.4	IPTG-induzierte Proteinexpression in <i>E. coli</i>	34
3.3.2	Immunohistochemie	34
3.3.2.1	Western Blot Analyse	34
3.3.2.2	Immunopräzipitation	34
3.3.3	Yeast Two Hybrid	35
3.3.4	Keimbahntransformation	35
3.3.5	Verbrauchsmaterialien	35

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>36</b>
4.1	<b>Genetische und histologische Charakterisierung der <i>nonstop</i> Mutante</b>	<b>37</b>
4.2	<b>Molekulare Analyse des <i>nonstop</i> Gens</b>	<b>39</b>
4.2.1	Molekulare Charakterisierung der P-Elementlinien	39
4.2.2	Struktur des <i>nonstop</i> Gens	41
4.2.3	Entwicklungs-Northern Blot Analyse der <i>nonstop</i> Expression	44
4.2.4	Expression der <i>not</i> cDNA rettet die Phänotypen der <i>nonstop</i> Mutante	45
4.2.5	<i>nonstop</i> kodiert für eine Ubiquitin spezifische Protease	48
4.2.6	NONSTOP interagiert mit Komponenten des Ubiquitinsystems	51
4.3	<b>Expressionsanalyse von <i>nonstop</i></b>	<b>53</b>
4.3.1	<i>in situ</i> Hybridisierung	53
4.3.2	Das Transgen P[ <i>not-myc</i> ]: molekulare und histologische Charakterisierung	54
4.3.3	Das <i>nonstop</i> GAL4 Konstrukt	57
4.4	<b>Versuch einer spezifischen Rettung des <i>nonstop</i> Phänotyps</b>	<b>59</b>
4.5	<b>Gewinnung eines Peptid-Antikörpers gegen das Nonstop Protein</b>	<b>60</b>
4.5.1	Immunoblotanalyse von NONSTOP	62
4.5.2	Immunopräzipitation von NONSTOP mit T1P5	64
4.5.3	Immunohistochemische Analyse mit dem Serum T1P5	65
4.6	<b>Das Two Hybrid System – Identifizierung spezifischer Interaktionspartner von NONSTOP</b>	<b>67</b>
4.6.1	Allgemeines zum Two Hybrid System	67
4.6.2	Das GAL4 Two Hybrid System	67
4.6.3	Die rekombinanten <i>nonstop</i> Konstrukte	69
4.6.4	Kotransformation der <i>nonstop</i> Konstrukte mit einer adulten und einer embryonalen <i>Drosophila</i> cDNA Bibliothek – der Two Hybrid Screen	70
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>75</b>
5.1	<b>Die axonale Wegfindungsmutante <i>nonstop</i></b>	<b>76</b>
5.2	<b>Die Funktion von <i>nonstop</i> wird in der Zielregion benötigt</b>	<b>78</b>
5.3	<b><i>nonstop</i> kodiert für eine Ubiquitin spezifische Protease und interagiert mit dem Ubiquitinsystem</b>	<b>81</b>
5.4	<b>Identifikation des NONSTOP Substrats</b>	<b>84</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURANGABEN</b>	<b>85</b>
<b>7</b>	<b>EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN</b>	<b>96</b>

## Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Wildtypisches Komplexauge von <i>Drosophila melanogaster</i> in einer Rasterelektronenmikroskopaufnahme	10
Abb. 2: Schematische Längs- und Querschnitte eines adulten Ommatidiums	11
Abb. 3: Schematische Darstellung der Photorezeptorentwicklung in der Augenscheibe	12
Abb. 4: Horizontalschnitte des optischen Lobus in <i>Drosophila</i>	13
Abb. 5: Schematische Darstellung des visuellen Systems der späten dritten Larve	14
Abb. 6: Schematisches Diagramm der Zellteilungsprozesse in der Laminavorläuferregion	15
Abb. 7: Schematische Darstellung der Laminadifferenzierung	16
Abb. 8: Schematische Darstellung des ontogenetischen Ursprungs der Laminazellen	17
Abb. 9: Verschiedene Gliazelltypen im optischen System von <i>Drosophila</i>	18
Abb. 10: Schematische Darstellung axonaler Wegfindungsmechanismen	19
Abb. 11: Das Ubiquitinsystem	23
Abb. 12: Phänotypische Analyse der <i>nonstop</i> Mutante	38
Abb. 13: Analyse der frühen Laminadifferenzierung	39
Abb. 14: Schematische Darstellung des <i>P lacW</i> Elementes (11 191 bp)	40
Abb. 15: Schematische Darstellung der <i>not<sup>3</sup></i> Insertion	40
Abb. 16: Sequenzstrategie der <i>nonstop</i> pcNS2 cDNA.	41
Abb. 17: Die genomische Region von <i>nonstop</i>	42
Abb. 18: Genomische Region des <i>nonstop</i> Gens, Sequenzstrategie und Insertionsloci der P-Elemente	43
Abb. 19: Northern Blot Analyse der <i>nonstop</i> mRNA	45
Abb. 20: <i>nonstop</i> Rescue Konstrukte	46
Abb. 21: Rettung des axonalen Wegfindungsphänotyps der <i>nonstop</i> Mutante	47
Abb. 22: Nonstop Protein und Homologievergleich der konservierten Domänen	48
Abb. 23: Anti-Ubiquitin Immunoblotanalyse von wildtypischen und <i>nonstop</i> Larven	50
Abb. 24: Verstärkung des retinalen Wegfindungsdefekts in <i>not<sup>1</sup>;l(3)73AilDf(3L)W4</i>	52
Abb. 25: <i>in situ</i> Analyse der <i>nonstop</i> Mutante	54
Abb. 26: Schema der genomischen <i>nonstop</i> Region und des P[ <i>not-myc</i> ] Konstrukts	55
Abb. 27: Expression des P[ <i>not-myc</i> ] <sup>1911</sup> Konstrukts in präpupalen Hemisphären	56
Abb. 28: Expression des P[ <i>not-myc</i> ] <sup>1911</sup> Konstrukts im optischen Lobus	57

Abb. 29: Schematische Darstellung des GAL4-UAS Systems	58
Abb. 30: Schematische Darstellung der genomischen <i>nonstop</i> Region und der pPTGAL4 Konstrukte	58
Abb. 31: Schematische Darstellung der genomischen <i>nonstop</i> Region und des UAS- <i>not</i> Konstrukts	59
Abb. 32: Analyse des Nonstop Proteins zur Gewinnung eines spezifischen Peptidantikörpers	61
Abb. 33: Western Blot Analyse des Peptid-Antikörpers T1P5	62
Abb. 34: Western Blot Analyse verschiedener Genotypen, bzw. Hitzeschockbedingungen geprobt mit dem Serum T1P5	63
Abb. 35: Immunopräzipitation von NONSTOP	65
Abb. 36: Immunohistochemie an adulten Gefrierschnitten mit T1P5	66
Abb. 37: Schematische Übersicht über das GAL4-UAS Two Hybrid System	68
Abb. 38: Modellvorstellung der <i>nonstop</i> Funktion im Wildtyp und der Mutante	83

## Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1: Auflistung der Fliegenstämme, die innerhalb dieser Dissertation verwendet wurden	27
Tab. 2: Antikörper	28
Tab. 3: Anti-NONSTOP Seren	29
Tab. 4: Sequenzierprimer	36
Tab. 5: Ergebnisse des Rettungsexperimentes	47
Tab. 6: Verstärkung der präpupalen Letalität von <i>nonstop</i> durch eine Mutation im Proteasomenkomplex	51
Tab. 7: Verstärkung des retinalen Wegfindungsdefekts von <i>nonstop</i> durch eine Mutation im Proteasomenkomplex	52
Tab. 8: Ergebnisse des Rescue Experimentes mit dem <i>not-myc</i> Konstrukt	55
Tab. 9: Übersicht über die durchgeführten Kotransformationen	70
Tab. 10: Auflistung der positiven Two-Hybrid Klone	71



## **1 Zusammenfassung**

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wird die molekulare, genetische und histologische Analyse der Ubiquitin spezifischen Protease *nonstop* (*not*) im visuellen System von *Drosophila melanogaster* beschrieben. *not<sup>1</sup>* wurde innerhalb einer ungerichteten EMS Mutagenese isoliert, welche mit dem Ziel durchgeführt wurde, Gene zu charakterisieren, die an dem axonalen Weg- bzw. Zielfindungsprozess der Photorezeptoren beteiligt sind (Martin *et al.*, 1995). In *Drosophila* müssen die Axone der acht Photorezeptoren (R1-R8) eines Ommatidiums korrekt in die optischen Loben einwachsen und verschaltet werden. Während R1-R6 in der Lamina terminieren, zieht R7 und R8 in die Medulla weiter. Die Mutante *not* zeigt eine starke Störung dieses retinalen Projektionsmusters: Die Axone von R1-R6 scheinen ihre Zielregion, die Lamina nicht zu erkennen und ziehen in die Medulla weiter. Diese Hyperinnervierung spiegelt einen spezifischen Defekt innerhalb des Zielfindungsprozesses wider. Neben den Störungen im Projektionsmuster der Photorezeptoraxone (PRA) ist die Mutante im frühen Puppenstadium letal. Drei weitere P-Element induzierte *nonstop* Allele (*not<sup>2</sup>*, *not<sup>3</sup>*, *not<sup>4</sup>*) standen zur Verfügung, welche ebenfalls charakterisiert wurden.

Die Analyse verschiedener genomischer Sequenzen der *not* Region und zweier *not* cDNAs ermöglichten die Erstellung einer kompletten Exon-Intron Struktur des Gens. Durch ein transgenes *nonstop* Konstrukt liesen sich Letalität und axonaler Wegfindungsphänotyp zum Wildtyp revertieren, d.h. Mutationen im *nonstop* Gen sind tatsächlich für die oben beschriebenen Phänotypen verantwortlich. Homologievergleiche ergaben, daß *nonstop* für eine Ubiquitin spezifische Protease (UBP) kodiert, welche innerhalb des Ubiquitinsystems für die Deubiquitinierung von Proteinen verantwortlich ist. Es konnte gezeigt werden, daß es in den Allelen *not<sup>1</sup>* und *not<sup>2</sup>* zu einer Anhäufung ubiquitiniertes Proteine kommt, was im Einklang mit der Rolle von *nonstop* als UBP steht. Interaktionsexperimente mit einer Mutante des Proteasomenkomplexes bestätigen, daß *not* innerhalb des Proteasomspezifischen Degradationssystems aktiv ist, und ein oder mehrere Substrate deubiquitiniert. Vermutlich führt in der Mutante *nonstop* die Akkumulation ubiquitiniertes Proteine zu den Störungen innerhalb der axonalen Projektion der PRA und zu der Letalität.

Um die Funktion von *nonstop* besser zu verstehen, wurden Expressionsanalysen durchgeführt. In der späten dritten Larve, zu einem Zeitpunkt, wenn der Prozess der axonalen Wegfindung der Photorezeptoren weitgehend abgeschlossen ist, wird *nonstop* in neuronalen und glialen Zellen der Lamina exprimiert. Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von SL Zipursky konnte gezeigt werden, daß *nonstop* an der Migration der Laminagliazellen in ihre Zielregion beteiligt ist und die gestörte axonale Projektion von R1-R6 vermutlich auf ein Fehlen glialer Zellen in der Lamina zurückzuführen ist.

## **2 Einleitung**

## 2.1 *Drosophila melanogaster* als Modellsystem

Der Forschung am Modellorganismus *Drosophila melanogaster* wurde im März 2000 durch die Veröffentlichung der Gesamtgenomsequenz ein wichtiger Meilenstein gesetzt. Nahezu 120 Megabasen sequenziertes Euchromatin ergab nicht nur eine Fülle an essentiellm Rohmaterial für zukünftige methodische Ansätze, sondern brachte auch überraschende Ergebnisse zu Tage. So zeigte sich, daß die Fruchtfliege mit 13 500 Genen den Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* nicht in der Genanzahl überbieten kann, jedoch im Aufbau des Genoms komplexer zu sein scheint (Pennisi, 2000). Die große Anzahl an Orthologen zu humanen Sequenzen, besonders im Bereich des Stoffwechsels und der Genexpression, aber auch die Existenz von homologen pathologisch involvierten Genen, wie z.B. dem Parkin- oder dem p53 Tumorsuppressorgen, bestätigen *Drosophila melanogaster* in ihrer Funktion als Modellsystem (Rubin *et al.*, 2000).

In den letzten 10 Jahren kristallisierte sich vor allem der Aspekt der Allgemeingültigkeit von grundlegenden Entwicklungsmechanismen heraus. Sei es bei der Entwicklung eines Grundbauplans mit Hilfe der homeotischen Gene (Gehring, 1992), der Anlage eines Auges über das Meistergen *Pax* (Gehring und Ikeo, 1999) oder selbst bei der Organisation von Gehirnstrukturen (Hirth und Reichert, 1999), immer wieder wird die Fruchtfliege bei vergleichenden Fragestellungen miteinbezogen. Durch das veröffentlichte Datenmaterial ist jetzt auf der Genebene ein vertiefter Einblick möglich.

Gleicherweise zeichnet sich beim Prozeß der axonalen Wegfindung, der in dieser Arbeit am visuellen System von *Drosophila* untersucht wird, eine gemeinsame genetische und molekularbiologische Basis mit anderen Modellorganismen wie z.B. *C. elegans* oder dem Vertebratensystem ab (Goodman, 1994; Chisholm und Tessier-Lavigne, 1999). Das optische System der Fliege stellt eine einfach zu manipulierende und experimentell bereits gut untersuchte Struktur dar, an welcher in der vorliegenden Dissertation Grundlagen der präzisen Projektion der Photorezeptoraxone untersucht werden. Dieser Prozeß setzt einerseits ein gerichtetes Wachstum der Axone voraus, andererseits eine korrekte Zielzellfindung. Über 800 Ommatidien müssen in diesem Zusammenhang retinotop im Gehirn verschaltet werden, eine Aufgabe, an der die Axone selbst, die umliegende extrazelluläre Matrix und die entsprechenden Zielregionen beteiligt sind.

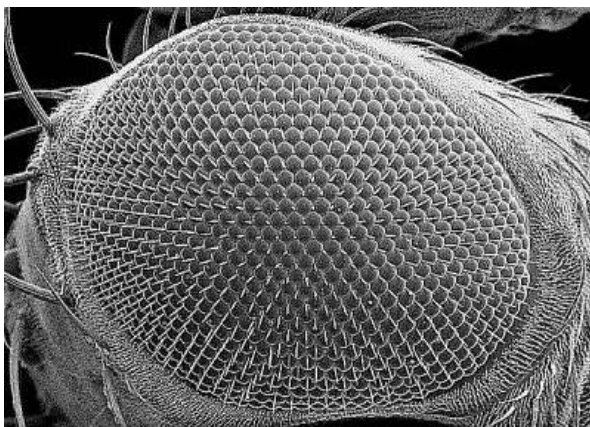
Um die molekularen Grundlagen, auf welche sich dieser komplexe Vorgang stützt, zu erforschen, stehen vielfältige Methoden zur Verfügung: eine der klassischsten innerhalb der *Drosophila*-forschung stellt dabei die ungerichtete Mutagenese dar. Dieser Ansatz ermöglicht es theoretisch

alle Gene, die an einem bestimmten Entwicklungsablauf oder Verhalten beteiligt sind, zu erfassen. Die im Anschluß durchzuführende molekulare Analyse des mutagenisierten Materials, wird in vielen Fällen durch die veröffentlichten Sequenzdaten erleichtert. Die in dieser Arbeit untersuchte Mutante *nonstop (not)* wurde innerhalb einer solchen Mutagenese identifiziert, bei der Gene, die an der Wegfindung und Zielerkennung der Photorezeptoraxone beteiligt sind, isoliert werden sollten (Martin *et al.*, 1995). Die strukturellen Grundlagen, das Komplexauge und die optischen Loben sollen im Folgenden kurz charakterisiert werden, um das funktionelle Zusammenspiel der beiden innerhalb des Wegfindungsprozesses zu verstehen.

## 2.2 Das Komplexauge und die optischen Loben

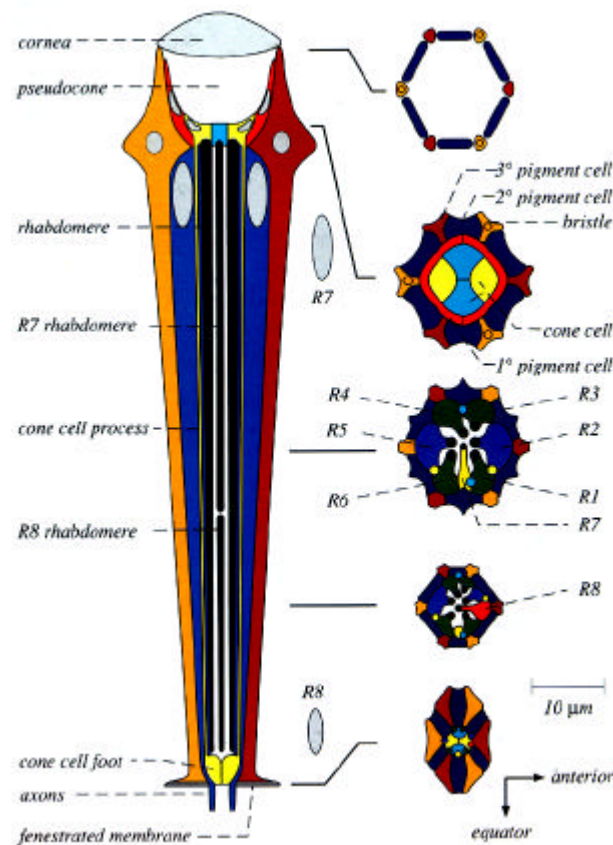
### 2.2.1 Struktur und Entwicklung des Komplexauges

Das Komplexauge von *Drosophila melanogaster* weist im Rasterelektronenmikroskop eine starre Anordnung identischer Einheiten auf, welche sich als einheitliche, konvexe Oberfläche präsentieren (Abb. 1).



**Abb. 1.: Wildtypisches Komplexauge von *Drosophila melanogaster* in einer Rasterelektronenmikroskopaufnahme.** Die Aufsicht zeigt die hochstrukturierte Anordnung ca. 750 hexagonaler Facetten, den Ommatidien. In den Facettenzwischenräumen nehmen die mechano-sensorischen Haare ihren Ursprung (Cagan und Ready, 1989).

Jede Einheit (Ommatidium) ist aus jeweils acht Photorezeptorzellen (R1-R8) und zehn Hilfszellen aufgebaut. Abbildung 2 gibt eine Übersicht über die zelluläre Architektur eines adulten Ommatidiums. Die acht Photorezeptoren gruppieren sich um ein trapezförmiges Zentrum, welches aus dem photosensitiven Rezeptoranteil, den Rhabdomeren der R1-R6 gebildet wird. Darin mittig eingegliedert befinden sich R7 und R8.

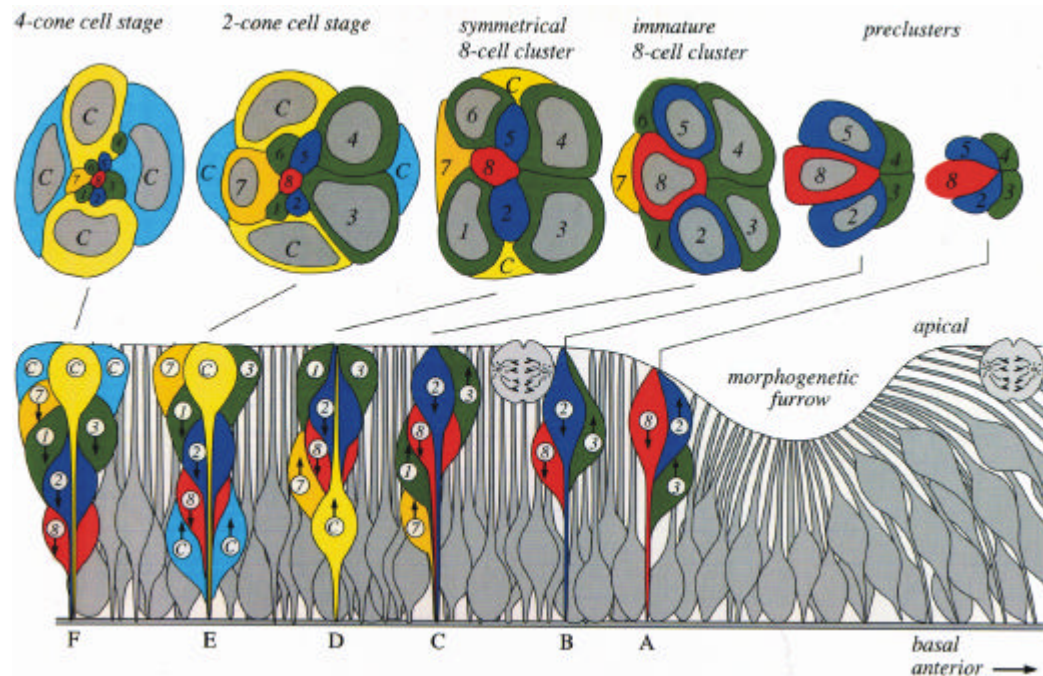


**Abb. 2: Schematische Längs- und Querschnitte eines adulten Ommatidiums.** 2A) Längsschnitt mit der Basis der mechanosensorischen Borste (*bristle shaft*), der Linse (*cornea* und *pseudocone*), primären und sekundären Pigmentzellen ( $1^{\circ}$  und  $2^{\circ}$  *pig. cell*), den Kristallkegelzellen (*cone cell*), mehreren Photorezeptorzellen und ihrer Rhabdomere (*R cell, rhabdomere*), sowie die Basalmembran (*fenestrated membrane*). 2B-F) Querschnittserie von apikal nach basal. Sichtbar sind die mechanosensorischen Borsten, Pigmentzellen, Kristallkegelzellen (*pc, eqc, ac* und *plc*) und Photorezeptorzellen mit ihren Rhabdomeren. Aus Cagan und Zipursky (1992).

Die Photorezeptoren lassen sich auf Grund der Sehpigmente (Opsine), bzw. ihrer spektralen Empfindlichkeit (Papatsenko *et al.*, 1997, Chou *et al.*, 1999), aber auch bezüglich der axonalen Projektion in den optischen Lobus unterteilen. Komplementiert werden die Sehzellen von weiteren Hilfszellen, den vier Kristallzellen, die zusammen mit den zwei primären Pigmentzellen die Linse sezernieren und den sechs sekundären und drei tertiären Pigmentzellen.

Dieses stereotype Muster beruht auf einem progressiven Entwicklungsablauf, der im Embryo mit der Entstehung der Augenscheiben seinen Anfang nimmt. Eine funktionelle Verbindung zwischen den Zellen der Augenscheibe und dem zentralen Nervensystem wird durch einen zellulären Stiel (optischer Stiel), in welchem der sogenannten Bolwig-Nerv verläuft, gewährleistet (Tix *et al.*, 1989; Schmucker *et al.*, 1997). Bis zur frühen dritten Larve proliferiert das Augenepithel zunächst, dann setzt die Differenzierung ein. Dieser Übergang wird von einer dorso-ventral gerichteten Einsenkung markiert, der sogenannten Morphogenetischen Furche (MF). Diese Struktur stellt auf molekularbiologischer Ebene eine hochkomplexe Integration und Kopplung verschiedener Signalkaskaden dar.

Die Differenzierung der Photorezeptoren vollzieht sich vom posterioren zum anterioren Ende der Augenscheibe (Ready, 1976) und wird in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

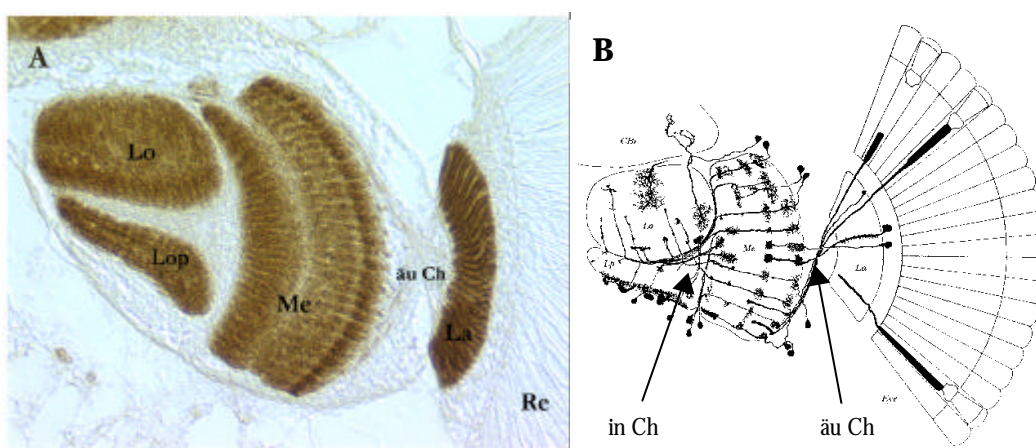


**Abb. 3: Schematische Darstellung der Photorezeptorentwicklung in der Augenscheibe.** Die Querschnitte korrespondieren zu einigen Stadien der ommatidialen Entwicklung. Die Differenzierung der einzelnen Photorezeptoren beginnt in der Morphogenetischen Furche mit der Zusammenlagerung mehrerer Zellen zu sogenannten *Preclustern* **3A-D**) Dem *Precluster* aus fünf Zellen, folgt zunächst ein frühes (*immature 8-cell cluster*) Zellstadium, dann eine symmetrische Zellgruppe aus acht Zellen (*symmetrical 8-cell cluster*). **3E, F**) zeigen die Stadien, in welchen bereits Kegelzellen zu R1-R8 hinzugetreten sind (*2-cone cell stage*; *4-cone cell stage*). Der horizontale Pfeil kennzeichnet den Verlauf der MF (*morphogenic furrow*) von anterior nach posterior. Die vertikalen Pfeile die Bewegungsrichtung der Nuclei von apikal (*apical*) basalwärts (*basal*). Aus Wolff und Ready, 1993.

Wenige Zellreihen nach der MF formieren sich synchron die ersten proneuralen Zellcluster. R2/R5 und R3/R4 werden in diesem Stadium durch R8 induziert, welche sich bereits vorher unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors *Atonal* spezifiziert hat (Jarman *et al.*, 1994). R1/R6 und R7 treten progressiv dem *Precluster* bei und durch eine weitere Abfolge von induktiven Signalen formiert sich ein komplettes Ommatidium. Neben *Atonal*, spielt die Rezeptortyrosinkinase DER, das Drosophilahomolog zum Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors EGF bei der frühen Musterbildung eine entscheidende Rolle (Xu und Rubin, 1993; Freeman, 1996). Während DER an der Induktion aller Zelltypen eines Ommatidiums beteiligt ist, müssen in späteren Stadien zusätzliche Signale für das spezifische Expressionsmuster einer Photorezeptorzelle oder einer Pigmentzelle aktiviert werden. Einer der bekanntesten Differenzierungsprozesse in der Augenentwicklung läuft über die *sevenless*-Signalkaskade, welche für die Identität von R7 zuständig ist (Rubin, 1991; Simon *et al.*, 1991; Cagan *et al.*, 1992; Hafen *et al.*, 1993).

## 2.2.2 Adultstruktur der optischen Loben

Die Projektion der Photorezeptoren endet in den optischen Loben, dem visuellen Verarbeitungszentrum. Betrachtet man diese Struktur im Querschnitt (Abb. 4A), so fallen zunächst vier säulenartig strukturierte Neuropile, Regionen dichter synaptischer Verbindungen, auf: die Lamina (erstes optisches Ganglion), hier terminieren die Axone von R1-R6, die Medulla, der Projektionsort für R7 und R8, sowie der Laminamonopolarzellen (L1-L5), und die Lobula, bzw. Lobulaplatte, welche ihre Eingänge nur noch von sekundären Neuronen erhalten.



**Abb. 4: Horizontalschnitte des optischen Lobus in *Drosophila*.** **4A)** Die Neuropile werden durch eine Färbung mit mAb 49 sichtbar. MAb 49 interagiert mit dem synaptischen Protein CSP (Cystein-String-Protein, Zinsmaier *et al.*, 1990); dadurch werden Regionen dichter synaptischer Verbindungen, wie sie für das Neuropil charakteristisch sind, erkennbar. Re: Retina, La: Lamina, äü Ch: äußeres Chiasma, Me: Medulla, Lo: Lobula, Lop: Lobulaplatte. Der Schnitt wurde freundlicherweise von J. Botella-Muñoz zur Verfügung gestellt. **4B)** Schematischer Horizontalschnitt: Es sind drei Klassen von Photorezeptoren eingezeichnet, sowie einige Neuronentypen der optischen Loben. La: Lamina, Me: Medulla, Lo: Lobula, Lp: Lobulaplatte, CBr: Zentralhirn. Die Pfeile markieren das innere Chiasma (in Ch) und das äußere Chiasma (äü Ch). Nach Fischbach und Heisenberg (1984).

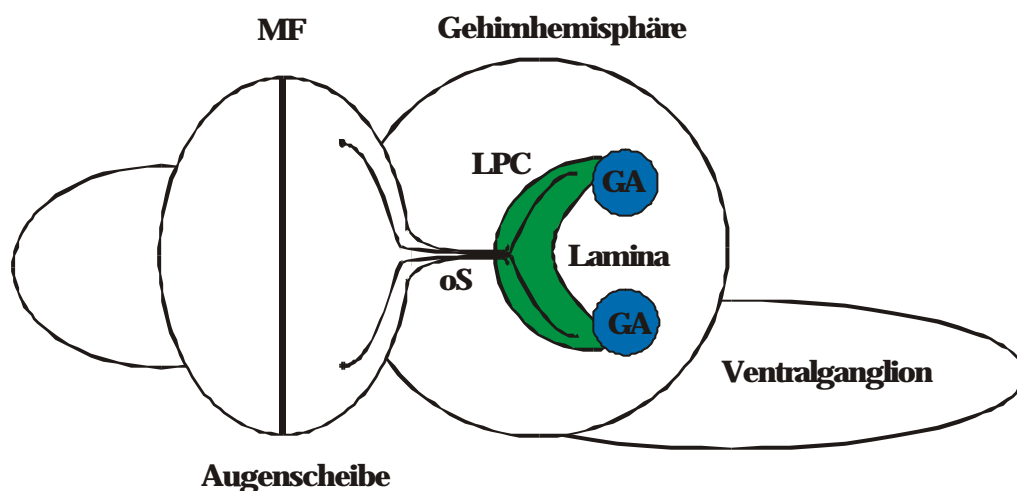
In der Lamina formen die Somata der Nervenzellen den Cortex in der Peripherie. Die Synapsen der Photorezeptoren benachbarter Ommatidien mit gleicher optischer Achse sind in säulenförmigen Strukturen, den Cartridges, zusammengefaßt. Diese Cartridgeanordnung, die sekundär in der Puppe entsteht, wird auch als Neuro-Ommatidium bezeichnet und ist die anatomische Grundlage für eine visuelle Verarbeitung nach dem Superpositionsprinzip, wie sie im visuellen System von *Drosophila* realisiert ist (Heisenberg und Wolf, 1984). Während R1-R6 bereits in der Lamina terminieren, bilden R7 und R8 mit den Laminapolarzellen die langen Sehbündel und ziehen bis in die distale Medulla weiter (Abb. 4B; Meinertzhagen und Hanson, 1993). Dort terminieren sie in unterschiedlichen Schichten: R8 terminiert noch einige Zellschichten vor R7, nahe der morphologisch gut sichtbaren Serpentinenschicht, welche die Zielregion für die Wachstumskegel von R7 darstellt (Fischbach und Dittrich, 1989). Die Säulenstruktur der Medulla entsteht durch die sogenannten Columnen, welche sich weniger klar organisiert auch in der Lobula wiederfinden.



Die Lamina ist mit der Medulla über ein äußeres Chiasma verbunden, in dem sich die anterior-posterior Achse der axonalen Projektionen umkehrt, dabei bleibt jedoch die Retinotopie bestehen. Das innere Chiasma verbindet die Medulla mit dem Lobulakomplex.

### 2.2.3 Die Neurogenese der Lamina unter dem Einfluß der einwachsenden Photorezeptoren

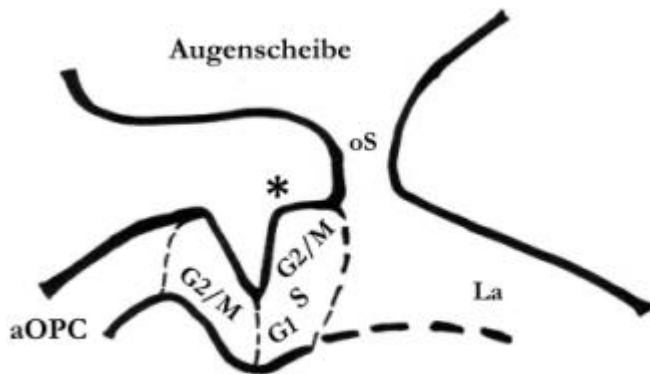
In Abbildung 5 ist der Augen-Gehirnkomplex eines Individuums im späten dritten Lavenstadium schematisch dargestellt. Die laterale Ansicht soll zunächst einen Überblick über die Augenscheibe und Gehirnhemisphäre im Ganzen geben, da verschiedene Zelltypen und Entwicklungsvorgänge des visuellen Systems, speziell der Lamina, in den nächsten Kapiteln, bzw. im Ergebnisteil im Detail erläutert werden.



**Abb. 5: Schematische Darstellung des visuellen Systems der späten dritten Larve.** In der Grafik ist die Augenscheibe mit der Morphogenetischen Furche (MF) eingezeichnet, posterior zu welcher sich die Photorezeptoren entwickeln (siehe Abb. 3). An Hand der zwei exemplarisch eingezeichneten Photorezeptoraxone läßt sich deren Projektion durch den optischen Stiel (oS) in die Lamina (grün) nachvollziehen. Die glialen Anlagen (GA, blau) befinden sich an den posterioren Enden der Lamina. Die Grafik wurde freundlicherweise von Dr. Dieter Maier zur Verfügung gestellt.

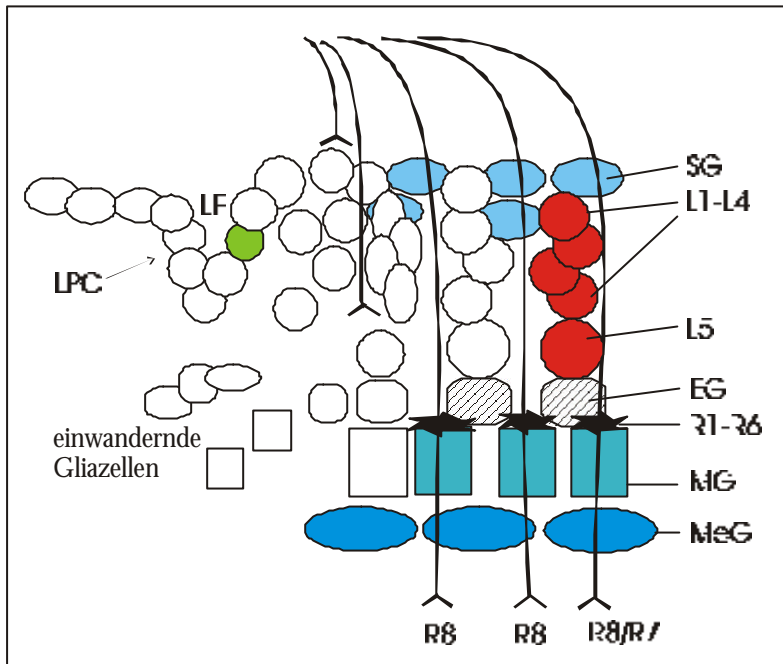
Die enge zeitliche Korrelation zwischen der Morphogenese des Auges und dem ersten optischen Lobus, der Lamina, konnte 1990 von A. Hofbauer und J. Campos-Ortega an Hand von  $[^3H]$  Thymidinmarkierungsexperimenten erstmals deutlich gezeigt werden. In einem Intervall von 15 Stunden zieht eine mitotische Welle zuerst über das Auge, dann über die Lamina. Geschwindigkeit und Richtung des Differenzierungsablaufes von posterior nach anterior entsprechen sich dabei. Um die im Folgenden diskutierten Induktionsvorgänge zwischen Auge und Lamina zu verstehen, soll die Laminaneurogenese kurz umrissen werden. Im ersten Larvenstadium entstehen durch kontinuierliche Zellteilung und einem darauf folgenden Auseinanderweichen der Vorläuferzellen die innere und äußere Anlage. Beim Eintritt in das dritte

Larvenstadium wird am medialen Rand dieser äußeren Anlage eine Proliferationszone erkennbar (*outer proliferation center*, OPC). Den Neuroblasten dieses Proliferationszentrums entstammen die Laminavorläuferzellen (*lamina precursor cells*, LPC). Selleck und Steller konnten 1991 den funktionellen Zusammenhang zwischen den Vorgängen in der Retina und dem ersten optischen Ganglion zeigen. Die LPC durchlaufen auf ihrem Weg zur Laminaanlage zwei Mitosen (Abb. 6; Hofbauer und Campos-Ortega, 1990; Selleck und Steller, 1991).



**Abb. 6: Schematisches Diagramm der Zellteilungsprozesse in der Laminavorläuferregion.** Aus dem anterioren *outer proliferation center* (aOPC) gehen die Vorläuferzellen der Lamina hervor. Diese durchlaufen eine G2-Phase, die erste Mitose (M) und arretieren in der G1-Phase. Die Innervierung der Photorezeptoraxone (gezeigt durch \*) veranlaßt die LPC in die Replikationsphase (S) einzutreten. Mit einer weiteren G2/M-Phase ist die Entwicklung der LPC beendet. La: Lamina, oS: optischer Stiel. Modifiziert nach Selleck *et al.*, 1992.

Nach der ersten Mitose invaginieren die Vorläuferzellen, arretieren in  $G_1$  und es bildet sich das Äquivalent zur morphogenetischen Furche im Auge, die Laminafurche (LF). In den letzten zehn Jahren wurde die Laminaneurogenese besonders unter dem Aspekt der Innervierung durch die Photorezeptoren, bzw. der Rolle von retrograden und anterograden Signalen, die für die Laminamorphogenese eine Rolle spielen, untersucht. Dieser Vorgang setzt ein komplexes Zusammenspiel von Photorezeptoraxonen (PRA), Laminaneuronen und -gliazellen, bzw. präzise Wegfindung und Zielerkennung der einwachsenden Axone voraus. Anhand von Abbildung 7 werden die vielfältigen Aspekte diskutiert.



**Abb. 7: Schematische Darstellung der Laminadifferenzierung.** Die Entwicklung der LPC wurde bereits in Abb. 5 beschrieben. Durch das Signalprotein Hedgehog, das von den einwachsenden retinalen Axonen sezerniert wird, treten die Zellen in die S-Phase ein (grün markiert) und durchlaufen eine weitere Mitose. Die Lamina-monopolarzellen (L1-L5) erhalten weitere Signale (siehe Text) für die Ausdifferenzierung und Anordnung innerhalb der Cartridges (rot markiert: vollständig ausdifferenzierte Laminaneuronen). Einwandernde Gliazellen können auf Grund ihrer Position in Satelliten-, Epithelial- und Marginalgia (SG, EG, MG) unterteilt werden. Zwischen den beiden letzteren terminieren die Wachstumskegel der Photorezeptoren R1-R6. Die Medullaglia (MeG) trennt das Laminaneuropil von der Medulla, der Zielregion der Photorezeptoren R7/R8.

Verändert nach Huang und Kunes (1996).

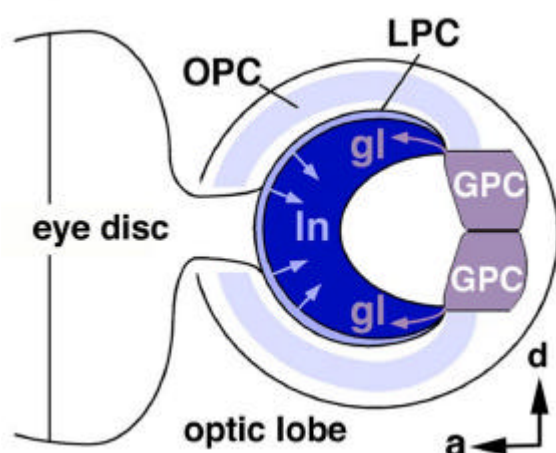
Posterior zur LF kommen die Wachstumskegel der PRA und die LPC in unmittelbare Nähe. Es wird postuliert, daß an diesem Punkt die Laminaneurogenese beginnt, die LPC gehen von der G<sub>1</sub> in die S-Phase über (Selleck und Steller, 1991). Ihre frühe neuronale Differenzierung wird durch die Expression des Kernproteins Dachshund (Mardon *et al.*, 1994) markiert. In der Laminafurche rekrutieren sich dann progressiv die postmitotischen neuronalen Vorläuferzellen zu sog. Cartridges und es kommt zur Expression eines weiteren neuronalen Markers, ELAV (Huang *et al.*, 1998). Die Formierung der Cartridge selbst verläuft sequentiell und zelltypenspezifisch: die L1 Neuronen treten als erste den Faszikeln der PRA bei, gefolgt von L2-L4. Der Beitritt von L5 in einer tieferen Zellschicht vollendet die Cartridge in der späten dritten Larve (Meinertzhagen und Hanson, 1993; Abb. 7).

Das sekretorische Protein Hedgehog (Hh), das auch innerhalb der proliferierenden Augenseibe eine Schlüsselrolle spielt, übernimmt bei der Laminaneurogenese eine wichtige Funktion (Huang und Kunes, 1996). Hh wird von den einwachsenden PRAs sezerniert, ohne selbst in der proliferierenden Lamina exprimiert zu sein. Bei *hh*<sup>1</sup> Mutanten bleiben die LPC in der G<sub>1</sub> Phase stehen. Die Transduktion des *hh* Signals findet dabei zellautonom statt (Huang und Kunes, 1998).

Für die späte Laminaneuronendifferenzierung sind zusätzliche Signaltransduktionen nötig, welche z.B. über den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors, *Epidermal growth factor receptor* (EGFR) induziert werden (Huang *et al.*, 1998).

## 2.2.4 Gliazellen des ersten optischen Ganglions

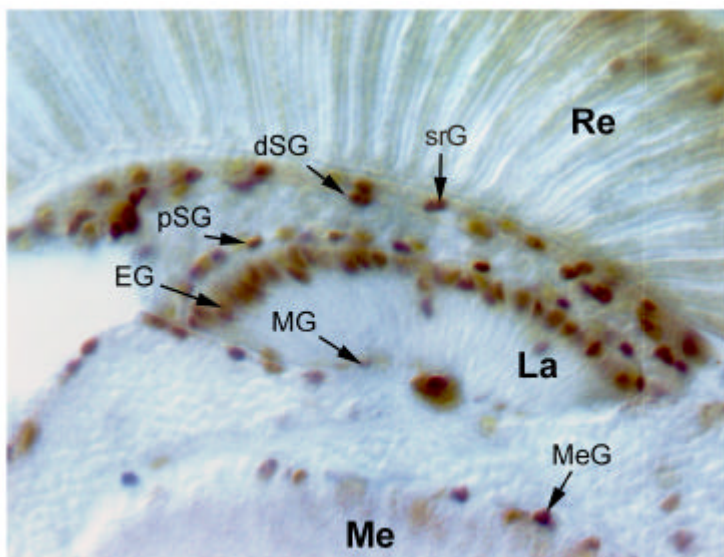
Ein Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit den Laminagliazellen und deren Funktion innerhalb des Weg- und Zielfindungsprozesses der Photorezeptoren. Daher soll in diesem Abschnitt die Proliferation und Differenzierung der Laminagliazellen kurz diskutiert werden. Hofbauer und J. Campos-Ortega konnten 1990 zeigen, daß zwischen der Proliferationsaktivität der Neuronen- und Gliavorläuferzellen eine örtlicher und zeitliche Differenz besteht. Der genaue Entstehungsort der Glia wurde von Winberg *et al.* (1992) mit dem Nachweis zweier glialer Anlagen (*glial precursor cells*) am posterioren Enden der Lamina lokalisiert (Abb. 8).



**Abb. 8: Schematische Darstellung des ontogenetischen Ursprungs der Laminazellen.** Die Proliferation der Laminavorläuferzellen (LPC) ausgehend vom *outer proliferation center* (OPC) und deren Differenzierung zu Laminaneuronen (ln) wurde bereits unter 1.3. besprochen. Die Gliazellen (gl) entstammen zwei glialen Anlagen (GPC) am dorsalen und ventralen Rand der Lamina. Von dort aus migrieren sie in die Laminavorläuferregion ein. a: anterior, d: dorsal, laterale Ansicht; aus: Poeck *et al.*, 2001.

Von hier aus wandern die Zellen in die Laminavorläuferregion ein. Die Proliferation läuft zu einem Zeitpunkt ab, zu welchem die retinalen Axone die Lamina noch nicht erreicht haben; der retinale Input und die Präsenz differenzierter Laminaneurone scheint also für diesen Entwicklungsschritt nicht entscheidend zu sein. Auch die Migration der Gliazellen verläuft weitgehend unabhängig von der Laminaneurogenese. In *eya* Mutanten hingegen, führt die Abwesenheit innervierender Photorezeptoraxone dazu, daß kaum ausdifferenzierte Gliazellen in der Laminavorläuferregion vorhanden sind (Huang und Kunes, 1998). Daraus läßt sich schließen, daß frühe Vorgänge in der Laminagliamorphogenese nicht auf Signale der einwachsenden R1-R8 angewiesen sind, die Differenzierung selbst aber die PRAs benötigt.

Abbildung 9 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Gliazelltypen im optischen Lobus. Im Laminakortex unterscheidet man zwischen distaler und proximaler Satellitenglia, im Neuropil liegt die Epithelialglia distal zur Marginalgia, welche das erste optische Ganglion vom äußeren Chiasma abgrenzt (Tix *et al.*, 1997).



**Abb. 9: Verschiedene Gliazelltypen im optischen System von *Drosophila*.**

Durch den Antikörper anti-Repo  $\beta$ -Galactosidase werden Gliazellkerne angefärbt. Proximal der Retina (Re) befindet sich die subretinale Glia (srG). Die Gliazellen der Lamina (La) können in distale und proximale Satellitenglia (dSG, pSG), Epithelialglia (EG) und Marginalglia (MG) eingeteilt werden. Ferner ist die Medullaglia (MeG) des zweiten optischen Ganglions, der Medulla (Me) zu sehen. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Dr. Botella Muñoz zur Verfügung gestellt.

Im Zusammenhang mit dem präzisen Terminieren der PRA in der Lamina wird vermutet, daß die Gliazellschichten des Neuropils die Rolle intermediärer Zielregionen übernehmen (Winberg *et al.*, 1992; Perez und Steller, 1996). Die Wachstumskegel von R1-R6 könnten von der Epithelial- bzw. Marginalglia das vorläufige Stoppsignal erhalten, um dann im Anschluß präzise mit den entsprechenden Laminamonopolarzellen synaptische Verbindung aufzunehmen. Innerhalb der funktionelle Analyse des *nonstop* Gens wird diese Theorie in Teilaspekten diskutiert.

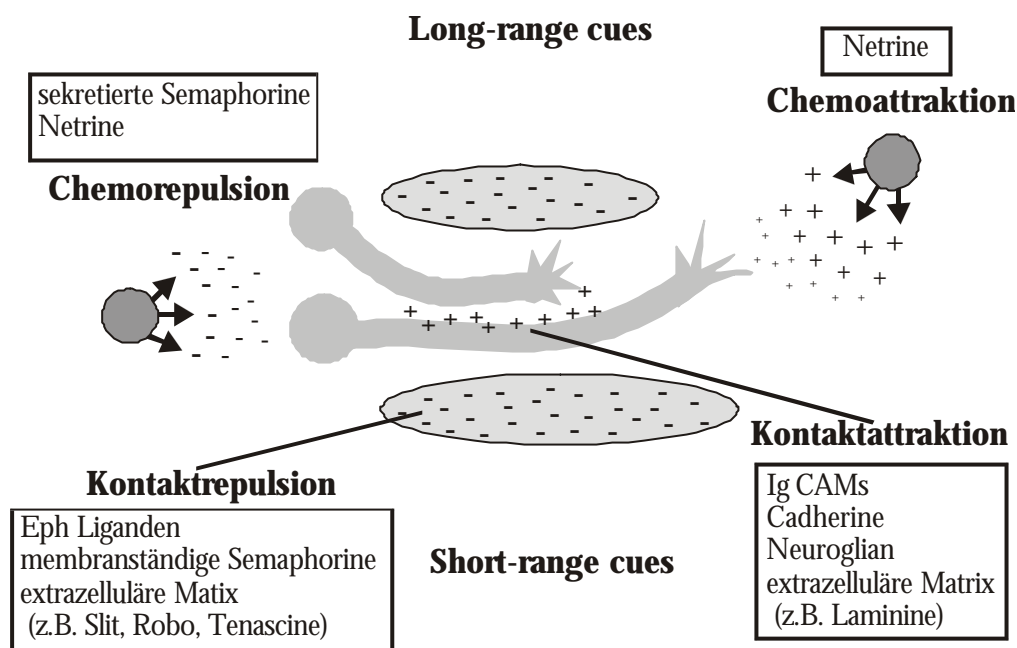
## 2.3 Axonale Wegfindung

### 2.3.1 Molekulare Grundlagen und Prinzipien

Der axonale Wegfindungsprozeß beruht auf einer Vielzahl zellulärer Mechanismen und der Integration mannigfaltiger Signale. Die meist relativ große Distanz, die ein Axon bis zu seiner Zielregion zurücklegen muß, stellt ein Spannungsfeld positiver und negativer Einflüsse dar, welche den Wachstumskegel über Attraktion und Repulsion an sein Ziel bringen. Diese beiden Mechanismen beeinflussen auch das selektive Faszikulieren der auswachsenden Neuronen zu einem gemeinsamen Nervenstrang, bzw. können bewirken, daß ein Axon vom Hauptweg abbiegt, d.h. defaszikuliert, um eine spezifische Untereinheit zu innervieren.

Welche Entscheidung ein Axon trifft, kann von frei diffusiblen Molekülen, bzw. deren Gradienten abhängen, oder durch Proteine beeinflusst werden, welche von Wegweiserzellen oder der extrazellulären Matrix präsentiert werden. Je nach Wirkungsgrad lassen sich die Signale in sogenannte *long-range cues*, welche über weite Distanz wirken oder *short-range cues*, welche

Wegfindungsmechanismen vor Ort übernehmen, einteilen. In Abbildung 10 werden exemplarisch grundlegende Mechanismen und einige damit assoziierte Proteine zusammengefaßt.



**Abb. 10: Schematische Darstellung axonaler Wegfindungsmechanismen.** Vier verschiedene Prinzipien tragen zur Wegfindung eines Axons bei: Kontaktrepulsion-, bzw. attraktion und Chemorepulsion-, bzw. attraktion. Die jeweiligen Signalmoleküle wirken entweder über direkten Kontakt (*short-range cues*) oder als diffusible Proteine über weitere Distanzen (*long-range cues*). Ein Axon kann also durch Repulsion vorwärts geschoben werden, selektiv über attraktive Moleküle mit weiteren Axonen faszikulieren und über permissives Gewebe und anziehende *long-range cues* an die Zielregion gebracht werden. Verändert nach Tessier-Lavigne und Goodman, 1996.

Erforscht wurden die genetischen Grundlagen der axonalen Wegfindung sowohl am System der Vertebraten, als auch der Invertebraten, deren wichtigste Vertreter in diesem Zusammenhang der Nematode *C. elegans* und *D. melanogaster*, für die Gruppe der Insekten, darstellen. Ein Großteil der oben beschriebenen Grundlagen innerhalb der axonalen Wegfindung ist in allen drei Phyla konserviert und ermöglicht somit einen vergleichenden methodischen Ansatz (Chisholm und Tessier-Lavigne, 1999). Eine entscheidende Rolle spielen in diesem Zusammenhang u.a. Netrine, Semaphorine, Ephrine und Slitproteine, welche bereits in Abbildung 10 den verschiedenen Vorgängen, welche beim gerichteten Auswachsen der Axone realisiert werden, zugeordnet wurden.

Überraschenderweise ergab sich bei der Charakterisierung der einzelnen Signalmoleküle, daß ein und dasselbe Protein attraktiv oder repulsiv auf ein Axon wirken kann. Diese Bifunktionalität konnte ansatzweise durch die Identifizierung der zytoplasmatischen Domänen der jeweiligen Rezeptoren (Bashaw und Goodman, 1999; Hong *et al.*, 1999), bzw. auf Grund unterschiedlicher Effekte bei der Aktivierung eines Rezeptors, je nach Konzentrationsverhältnis zyklischer Nukleotide (z.B. cAMP) innerhalb des Wachstumskegels (Ming *et al.*, 1997), erklärt werden.

### 2.3.2 Der axonale Wegfindungsprozeß im visuellen System von *Drosophila melanogaster*

Durch ungerichtete Mutagenesen und genetische Interaktionsexperimente konnten bisher eine Reihe von Genen isoliert werden, welche an der korrekten axonalen Projektion der PRA beteiligt sind. Dabei kann man generell zwischen Molekülen unterscheiden, die im Wachstumskegel selbst lokalisiert, und dort am gerichteten Auswachsen der Axone beteiligt sind und solchen Proteinen, die in der Zielregion für ein präzises Einwachsen und Terminieren der Neuronen sorgen. Im späten dritten Larvenstadium, also dann, wenn die axonale Wegfindung bereits weit fortgeschritten ist, zeigen viele dieser Mutanten eine ähnliche Störung im Projektionsmuster: die Axone beenden ihr Wachstum noch vor Erreichen der jeweiligen Zielregion, oder R1-R6 innervieren die Medulla, anstelle ihres eigentlichen Verschaltungspartners, der Lamina.

In den letzten Jahren wurde eine Gruppe von Mutanten charakterisiert, welche alle den eben beschriebenen Phänotyp in verschieden starkem Ausmaße zeigen. Die jeweils betroffenen Genprodukte werden im Wachstumskegel exprimiert, üben also innerhalb des Axons ihre Funktion bei der retinalen Innervierung des optischen Lobus aus. Vier dieser im Folgenden kurz charakterisierten Wegfindungsmutanten, *dreadlock*, *Pak*, *Trio* und *misshapen*, scheinen an einem gemeinsamen Signaltransduktionsweg beteiligt zu sein. Dort stellen sie vermutlich eine funktionelle Verbindung zwischen Signalempfang und der kontrollierten Dynamik des Zytoskelettes, die Voraussetzung für einen gerichteten Bewegungsablauf, her. Zunächst wurde *dreadlock*, das Drosophilahomolog zum human Adapterprotein Nck, identifiziert (Garrity *et al.*, 1996), dessen molekulare Funktion im Zusammenhang mit der p21 aktivierbaren Kinase *Pak* geklärt werden konnte: diese Kinase wird über *dreadlock* zur Zellmembran rekrutiert, ein wichtiger regulatorischer Schritt innerhalb des Wegfindungsprozesses der PRA (Hing *et al.*, 1999). Schon länger ist bekannt, daß *Pak* Kinasen u.a. von *Rac*-GTPasen gebunden und aktiviert werden können und daß die gesamte Familie dieser kleinen GTPasen verschiedenste morphologische Effekte auf den Wachstumskegel ausüben können (Manser und Lim, 1994; Nobes und Hall 1995). Neben *Pak* bindet das Adapterprotein *dock* eine weitere Kinase, *misshapen* (*msn*; Ruan *et al.*, 1999). Dieses Enzym zeigt eine hohe Homologie zu *Ste20* ähnlichen Kinasen, für welche neben vielen weiteren Funktionen gezeigt werden konnte, daß sie Aktin-bindende Proteine phosphorylieren (Eichinger *et al.*, 1998). *Msn* könnte also zusammen mit *Pak* direkt an der Aktin- und damit der Zytoskelettregulation beteiligt sein. Innerhalb einer weiteren ungerichteten Mutagenese wurde von Newsome *et al.* (2000) *Trio*, ein Guanidin Exchange Faktor für die *Drosophila* *Rac*-GTPase isoliert; dieser interagiert mit *dreadlock* und *Pak* und scheint zusammen mit dem Adapterprotein für die Aktivierung der Kinase verantwortlich zu sein (Newsome *et al.*,

2000). Abschließend sollte eine weitere wichtige Molekülgruppe erwähnt werden, welche eng mit der Funktion der Kinasen in Verbindung steht, die Rezeptor Tyrosin Phosphatasen. Die Dephosphorylierung spielt bei der axonalen Wegfindung eine ebenso wichtige Rolle wie die Phosphorylierung. Eine Reihe von Phosphatasen wurden bereits im embryonalen System von *Drosophila* isoliert, welche aktiv an der Axonprojektion beteiligt sind (Callahan *et al.*, 1995; Desai *et al.*, 1996; Krüger *et al.*, 1996). Auch für die retinale Projektion im visuellen System konnte eine Rezeptor spezifische Phosphatase, *Ptp69D*, mit Zielzellfindungsdefekten, ähnlich wie sie für die oben erläuterten Gene beschrieben wurden, identifiziert werden (Garrity *et al.*, 1999; Newsome *et al.*, 2000a). Noch ungeklärt ist die Identität der Rezeptoren, die *deadlock* aktivieren und weiterer Signale, welche z.B. an der Integration verschiedenster attraktiver und repulsiver Einflüsse auf den Wachstumskegel beteiligt sind. Wichtig ist, daß bei den eben beschriebenen Mutanten, weder die Determination, bzw. Differenzierung der Neurone selbst, noch das Auswachsen der retinalen Axone oder die Entwicklung der beiden zu innervierenden optischen Ganglien beeinflusst werden, sondern ganz spezifisch im Wegfindungsprozeß Störungen auftreten.

Diese Bedingung, daß eine Mutation in einem Gen, das an der retinalen Axonprojektion beteiligt ist, nicht in der Struktur selbst, in welcher es seine Funktion ausübt, zu Entwicklungsdefekten führen darf, gilt auch für die Zielregionen. Während Gene isoliert werden konnten, welchen eine Funktion im Wachstumskegel selbst zukommt, sind nur wenige Moleküle bekannt, die in der Lamina, bzw. Medulla für die axonale Wegfindung benötigt werden. Ein Grund dafür könnte sein, daß viele Gene, welche im ersten oder zweiten Ganglion exprimiert werden, im mutanten Zustand dort meist zu drastischen Entwicklungsdefekten führen und damit eine normale Projektion der PRA verhindern.

Für die bereits erwähnte Familie der *Netrine*, bzw. deren potentiellen Rezeptor *Frazzled* konnte von Gong *et al.* (2000) gezeigt werden, daß es sich hierbei um Moleküle handelt, welche von der Zielregion aus auf die retinale Axonenprojektion in das erste optische Ganglion einen Einfluß nehmen. *Netrin* und *Frazzled* werden in der Lamina exprimiert, *Frazzled* zusätzlich in den PRA, wobei diese Expression die axonale Wegfindung nicht zu beeinflussen scheint. Um die Funktion dieser beiden Gene genauer zu untersuchen, wurden Klone in der Lamina produziert, die sich durch eine Abwesenheit der entsprechenden Moleküle auszeichnen. Während die Abwesenheit von *Netrin* innerhalb eines Klons, die Projektion der R1-R6 nicht beeinflusst, vermeiden die Axone ein Gebiet, welches kein *Frazzled* Protein enthält. Im Falle von *Netrin*, läßt sich das Ergebnis dadurch erklären, daß es sich hierbei um ein diffusibles Signal handelt, welches vom benachbarten, wildtypischen Gewebe produziert wird und in den Klon eindiffundieren kann. In einer anderen Struktur von *Drosophila*, dem embryonalen Zentralnervensystem, an welchem die

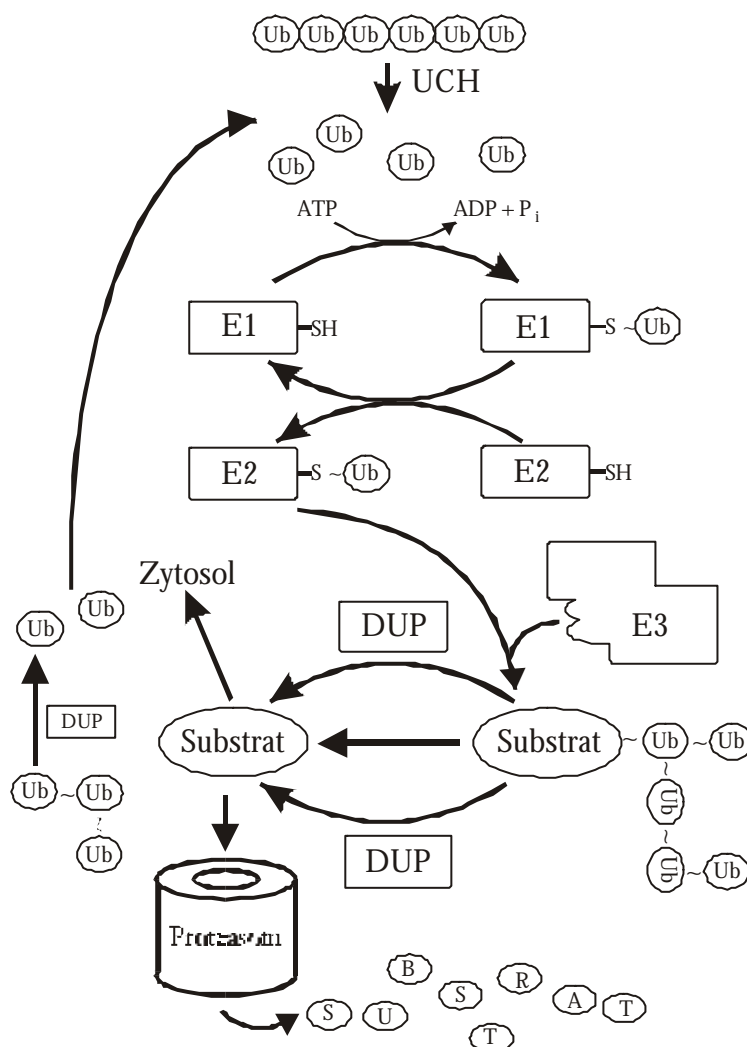


axonale Wegfindung in gleicher Weise studiert wird, konnte gezeigt werden, daß *Frazzled* für die Lokalisation von *Netrin* in den zu innervierenden Zellen verantwortlich ist (Hiramoto *et al.*, 2000). Innerhalb von *Frazzled*-Klonen in der Lamina, wird vermutlich kein *Netrin* präsentiert und die Tatsache, daß die PRA diese Klone umgehen, deutet auf ein ursprünglich refraktäres Laminagewebe hin, welches erst durch das *Netrin-Frazzled* System permissiv wird. Diese Hypothese wird gestützt von Experimenten, in welchen Klone im ersten optischen Ganglion produziert wurden, welche keine differenzierten Laminaneurone enthalten, d.h. jeglicher repulsive Einfluß aufgehoben ist.

Es wurde deutlich, daß die ersten beiden optischen Ganglien eine wichtige und komplexe Aufgabe übernehmen, molekulare Daten dabei aber noch weitgehend fehlen. Die Identifizierung weiterer Gene innerhalb der Lamina und/oder der Medulla könnte die Rolle von *Netrin* und *Frazzled* präzisieren und einen Beitrag zum Aufschluß anderer Signaltransduktionswege leisten.

## 2.4 Das Ubiquitin System

Das in dieser Dissertation untersuchte *nonstop* Gen wurde wie bereits erwähnt innerhalb einer EMS Mutagenese isoliert und kodiert für eine Ubiquitin spezifische Protease (UBP). Diese Enzymgruppe nimmt an der Proteindegradation teil, für welche den Eukaryoten, neben den Lysosomen auch das Ubiquitinsystem zur Verfügung steht (Review: Hershko, 1996; Hershko und Ciechanover, 1998). Um die Funktion von *nonstop* innerhalb der axonalen Wegfindung zu verstehen, sollen im Folgenden die wesentlichen Schritte des Ubiquitinsystems an Hand von Abbildung 11 kurz beschrieben werden.



**Abb. 11: Das Ubiquitinsystem.** Die einzelnen Schritte werden im Text ausgeführt. Ub: Ubiquitin, UCH: Ubiquitin C-terminale Hydrolasen, E1/E2/E3: Enzymkomplex 1/2/3, -SH: Thiolgruppe, DUP: Deubiquitinierende Proteasen (Die DUP lassen sich in die Ubiquitin C-terminalen Hydrolasen (UCH) und Ubiquitin spezifischen Proteasen (UBP) unterteilen; diese Klassifizierung wird im Ergebnisteil, bzw. der Diskussion noch näher erläutert.)

Vom Genom kodierte Polyubiquitine werden von sogenannten Ubiquitin-C-terminalen Hydrolasen (UCH) gespalten. Diese Hydrolasen gehören der Familie der Deubiquitinierenden Enzyme (DUP) an, welche innerhalb der Degradationskaskade weitere Aufgaben übernehmen, wie gleich noch erläutert wird. Unter ATP Verbrauch werden die Ubiquitinmonomere in einer reaktiven Form an das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) gebunden. Es folgt eine Übertragung auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2), welches alleine oder mit der Ubiquitin-Ligase (E3) das Substrat polyubiquitiniert. E3 ist für die Spezifität des Systems verantwortlich und stellt wahrscheinlich die komplexeste Komponente des Ubiquitinsystems dar. Erst in den letzten Jahren stellte sich heraus, daß es sich hierbei nicht unbedingt immer um ein Enzym handelt, sondern teilweise um ganze Proteinkomplexe (E3 Ligase Komplex), welche auf Grund ihrer Struktur und/oder der Erkennung spezifischer Signalsequenzen am Substrat, in sechs verschiedene Klassen eingeteilt werden können (Review: Ciechanover *et al.*, 2000).

Proteine, welche mit verzweigten Ubiquitinen markiert wurden, werden als potentielle Substrate vom Proteasom erkannt und degradiert. Das Proteasom stellt selbst einen großen Komplex dar, welcher sich aus einer katalytischen 20S und regulatorischen 19S Untereinheit zusammensetzt (Review: Voges *et al.*, 1999; DeMartino und Slaughter, 1999). Eine wichtige Funktion bei der Erkennung polyubiquitinerter Proteine übernimmt der 19S Komplex: Von ihm werden die abzubauenen Produkte erkannt, gebunden und entfaltet, so daß die Polypeptidkette schließlich in eine Art proteolytische Kammer, die von der Untereinheit 20S gebildet wird, eingeführt werden kann (Ciechanover *et al.*, 2000). Innerhalb dieses Proteolyseschritts spielen die bereits erwähnten Deubiquitinierenden Proteasen (DUP) eine entscheidende Rolle. Diese lassen sich in Ubiquitin C-terminalen Hydrolasen (UCH) und Ubiquitin spezifischen Proteasen (UBP) unterteilen, eine Klassifizierung die auf den jeweiligen katalytischen Domänen beruht. In manchen Fällen sind die DUP mit dem Proteasom assoziiert (Hegde *et al.*, 1997) und trennen noch vor der Hydrolyse des Proteins die Polyubiquitinseitenkette ab. In anderen Fällen editieren sie lediglich die Polyubiquitinmarkierung eines Proteins auf dem Weg zum Proteasom oder spalten die abgetrennten Ubiquitinpolymere in Monomere und ermöglichen dadurch ein Recyclen der Ubiquitine. Eine weitere wichtige Funktion der DUP kann die Deubiquitinierung markierter Proteine sein, um diese vor der Degradation zu schützen, bzw. dadurch ihre Funktion innerhalb der Zelle zu erhalten. Das Genprodukt von *nonstop* ist der Familie der Deubiquitinierenden Enzyme zuzuordnen und soll u.a. innerhalb des Ubiquitinsystems in *Drosophila* untersucht werden.

## 2.5 Ziele der Arbeit

Innerhalb dieser Dissertation wird das Gen *nonstop* analysiert, welches einer ungerichteten EMS Mutagenese entstammt, die mit dem Ziel durchgeführt wurde, Gene zu isolieren, die an der axonalen Projektion der Photorezeptoren in die optischen Loben beteiligt sind (Martin *et al.*, 1995). Neben dem EMS Allel *not<sup>1</sup>* sollen zwei neue P-Elementallele von *nonstop* charakterisiert werden und durch deren molekulare Analyse, bzw. der Untersuchung der genomischen Region von *nonstop* eine vollständige Exon-Intron Struktur des Gens erstellt werden. Durch *Rescue* Experimente soll der Nachweis erbracht werden, daß Mutationen im *nonstop* Gen für die Letalität und den axonalen Wegfindungsphänotyp verantwortlich sind. Da bekannt war, daß *nonstop* für eine Ubiquitin spezifische Protease kodiert, sollte die Funktion des Gens innerhalb des Ubiquitinsystems durch die Analyse der genetischen Interaktion mit einer weiteren Komponente dieser Enzymkaskade aufgeklärt werden.

Ziel war es außerdem, die Expression des Gens auf molekularer und histologischer Ebene zu studieren und in diesem Zusammenhang auch ein spezifisches Antiserum gegen NONSTOP herzustellen und zu analysieren. Mit Hilfe des Two-Hybrid Systems war geplant, potentielle Interaktionspartner von *nonstop* zu identifizieren.

### **3 Material und Methoden**

### 3.1 Organismen und Medien

#### 3.1.1 Fliegenstämme

Stamm	Erklärung	Herkunft	Literatur
WT CS	Wildtypstamm Canton Spezial	Stammsammlung	Lindsley und Zimm, 1992
<i>w<sup>1118</sup></i>	white Mutante	Stammsammlung	Lindsley und Zimm, 1992
<i>not<sup>1</sup>/TM6B, Hu Tb</i>	<i>nonstop<sup>1</sup></i> Allel (EMS)	B. Poeck	Martin <i>et al.</i> , 1995
<i>not<sup>2</sup>/TM6C, Sb, Tb</i>	<i>nonstop<sup>1</sup></i> Allel (EMS)	Berkeley Genomprojekt	Spradling <i>et al.</i> , 1999
89-31/ <i>TM6C, Sb Tb</i>	<i>not<sup>3</sup>: P lacW</i> Insertion: 75C	Deák <i>et al.</i> , 1997	Deák <i>et al.</i> , 1997
1384-10/ <i>TM6C, Sb Tb</i>	<i>not<sup>4</sup>: PlacW</i> Insertion: 75C	Deák <i>et al.</i> , 1997	Deák <i>et al.</i> , 1997
Df(3L) <i>WR4/TM6C, Sb Tb</i>	Defizienz für 89-31 Brpt: 75B8-11; 75C5-7	Bloomington Stock Center	Segraves und Hogness, 1990
<i>l(3)73A<sup>i1</sup>/TM6B, Hu Tb</i>	Untereinheit des Proteasomkomplexes	Bloomington Stock Center	Saville und Belote, 1993
<i>l(3)73A<sup>i1</sup> st not<sup>1</sup>/TM6B, Hu, Tb</i>	Rekombinante aus <i>l(3)73A<sup>i1</sup></i> und <i>not<sup>1</sup></i>	B. Poeck	Poeck <i>et al.</i> , 2001
P[ <i>hsp-not</i> ] <sup>XE5</sup> ; <i>not<sup>1</sup></i>	<i>nonstop</i> -cDNA (XhoI/EcoRI) in CaSpeRhs/act; auf 2.Chr. inseriert	vorliegende Arbeit	Poeck <i>et al.</i> , 2001
P[ <i>hsp-not</i> ] <sup>XE7</sup> ; <i>not<sup>1</sup></i>	<i>nonstop</i> -cDNA (XhoI/EcoRI) in CaSpeRhs/act; auf 2.Chr. inseriert	vorliegende Arbeit	Poeck <i>et al.</i> , 2001
P[ <i>hsp-not</i> ] <sup>XE8</sup> /CyO; <i>not<sup>1</sup></i>	<i>nonstop</i> -cDNA (XhoI/EcoRI) in CaSpeRhs/act; auf 2.Chr. inseriert	vorliegende Arbeit	Poeck <i>et al.</i> , 2001
P[ <i>not-myc</i> ] <sup>1911</sup> ; <i>not<sup>1</sup></i>	<i>nonstop</i> Minigen mit 2 kb upstream region und c-myc Epitop kloniert in pIndy5; auf 2.Chr. inseriert	vorliegende Arbeit	Poeck <i>et al.</i> , 2001

P[ <i>hsp-not</i> <sup>PE20-4</sup> ; <i>not</i> <sup>1</sup>	<i>nonstop</i> -cDNA (PvuI/EcoRI) in CaSpeR-hs/act; auf 2.Chr. inseriert	vorliegende Arbeit	
P[ <i>hsp-not</i> <sup>PE28-2</sup> / <i>CyO</i> ; <i>not</i> <sup>1</sup>	<i>nonstop</i> -cDNA (PvuI/EcoRI) in CaSpeR-hs/act; auf 2.Chr. inseriert	vorliegende Arbeit	
P[ <i>hps-not</i> <sup>PE703</sup> ; <i>not</i> <sup>1</sup>	<i>nonstop</i> -cDNA (PvuI/EcoRI) in CaSpeR-hs/act; auf 2.Chr. inseriert	vorliegende Arbeit	
w, P[ <i>actin5</i> -GAL4]/ <i>CyO</i>	GAL4, getrieben von einem <i>Actin</i> Promotor	Stammsammlung	Ito <i>et al.</i> , 1997
w, P[ <i>loco</i> -GAL4]/ <i>CyO</i>	GAL4, getrieben von einem Gliazellspezifischen Promotor	Stammsammlung	Granderath <i>et al.</i> , 1999

**Tab. 1: Auflistung der Fliegenstämme, die innerhalb dieser Dissertation verwendet wurden.** Referenz für Balancerchromosomen und dominante Marker: Lindsley und Zimm (1992), Brpt: zytologische Bruchpunkte der Defizienzen; Chr: Chromosom.

Die Fliegenstämme wurden auf Standard Hefe-Maismehl-Agar Drosophilamedium, versetzt mit 3g/l Nipagin, bei 25°C und 65% relativer Luftfeuchtigkeit gehalten; Kreuzungen wurden unter gleichen Bedingungen durchgeführt.

### 3.1.2 Immunreagenzien

#### 3.1.2.1 Antikörper

Antikörper	Bemerkung	Herkunft	Larve	Western	Literatur
mAB 24B10	Maus, monoklonal, gegen Chaoptin, spezifisch für Photorezeptormembran	S.Benzer	1:100		Zipursky <i>et al.</i> , 1984
mAb dac2-3	Maus, monoklonal, gegen Dachshund	DSHB*	1:100		Mardon <i>et al.</i> , 1994
anti-myc	Maus, monoklonal, gegen das <i>c-myc</i> Epitop	DSHB*	1:50		
anti-mouse IgG	Ziege, polyklonal gegen Mouse IgG, hrp-gekoppelt	Biorad	1:100		
anti-mouse IgG	Ziege, polyklonal, Cy3 -gekoppelt	Jack. Lab.	1:1000		

anti-mouse IgG	Schaf polyklonal gegen Maus Ig, hrp gekoppelt	Amersham		1:4000	
anti-rabbit IgG	Schaf polyklonal gegen Kanninchen Ig, hrp-gekoppelt	Amersham		1:4000	
anti-HIS	Maus monoklonal gegen HIS-Epitope, z.B. Expressionsvektor pQE	Qiagen		1:1000	

**Tab. 2: Antikörper.** Die Liste enthält die primären und sekundären Antikörper, die im Rahmen dieser Disseration verwendet wurden. \*DSHB: Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa; Jack.Lab.: Jackson Laboratories.

### 3.1.2.2 NONSTOP Peptid-Seren

Es wurden Antikörper gegen zwei Peptide innerhalb der NONSTOP Sequenz vom Pineda Antikörper Service hergestellt.

Serum	Peptidsequenz	Bemerkung	Herkunft	Western	Schnitte
T1P5 T2P5	NSDKQRDRV AKGHRDTK	Seren aus 2 Kaninchen, welche mit einem N-terminalen Peptid von NONSTOP immunisiert wurden	J. Pineda	1:5000	1:1000
T1P8 T2P8	KAEHESKSN SSGSGSG	Seren aus 2 Kaninchen, welche mit einem C-terminalen Peptid von NONSTOP immunisiert wurden	J. Pineda	1:5000	1:1000

Tab. 3. Anti-NONSTOP Seren. T1, T2 steht für zwei unterschiedliche Tiere (T), welche jeweils mit dem N- oder C-terminalen Peptid (P) immunisiert wurden. P5: N-terminales Peptid, P8: C-terminales Peptid.

### 3.1.3 Bakterienstämme

Für die Plasmidtransformation wurde *E. coli* XL-blue verwendet (Genotyp: siehe Sambrook *et al.*, 1989).



### 3.1.4 Bakterienmedien

Folgende Medien wurden je nach Versuchsbedingungen für die Bakterienanzucht verwendet:

LB Medium: siehe Sambrook *et al.* (1989).

LB<sup>amp</sup> Medium: 50 µg/ml Ampicillin zu autoklaviertem, abgekühltem (50°C) Medium.

LB<sup>amp</sup> Platten: 1.5% Select Agar; 50 µg/ml Ampicillin.

### 3.1.5 Plasmide

Plasmid	Verwendung	Bezugsquelle
pBluescript II SK	Suklonierungen	Stratagene
pQE	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	Qiagen
pAS2-1	Proteinexpression der <i>nonstop</i> Konstrukte in Hefezellen	Clontech
pACT2	Hefvektor mit embryonaler, bzw. adulter Drosophilabibliothek	Clontech
CaSpeR-hs/act	P-Element Transformation der <i>nonstop</i> cDNAs (XhoI/EcoRI und PvuII/EcoRI)	C.S. Thummel
pUAST	P-Element Transformation der <i>nonstop</i> cDNA (XhoI/EcoRI)	Brand und Perrimon, 1993
pIndy5	P-Element Transformation des <i>nonstop</i> Minigens mit <i>c-myc</i> Epitop	L. Seroude
pPTGAL4	P-Element Transformation einer <i>nonstop</i> GAL4 Linie	D. Eberl

### 3.1.6 Phagenklon und cDNAs

Bezeichnung	Größe	Klonierung	Vektor	Bezugsquelle
pNS1	10.5 kb	SalI/EcoRI Fragment aus DS04511	pBluescript SK	The FlyBase Consortium, 1999
pcNS1	2300 bp	EcoRI/EcoRI	pBluescript SK ( $\lambda$ gt-11 adulte Kopf cDNA)	K. Zinsmaier
pcNS2	2448 bp	XhoI/EcoRI	Uni-Zap Vektor ( $\lambda$ -ZAPII embryonale cDNA)	C.S. Thummel

## 3.2 Histologie

### 3.2.1 Immunfärbung an larvalen Gehirnen

Die Larvengehirne wurden in Formaldehyd/PBS präpariert und eine Stunde bei Raumtemperatur fixiert (Lösungen, siehe II.4.1.). Nach drei Waschschritten mit PBT wurden unspezifische Bindungsstellen mindestens 30 Minuten durch PBTS geblockt. Die Inkubation mit dem monoklonalem Antikörper 24B10 (antiCHAOPTIN, Zipursky *et al.*, 1984) erfolgte in einer Verdünnung 1:100, über Nacht. Die Präparate wurden am nächsten Tag erneut dreimal in PBT gewaschen, mit PBTS geblockt und vier Stunden mit dem sekundären peroxidasegekoppelten anti-Maus IgG Antikörper (1:100) inkubiert. Das Gewebe wurde zweimal in PBT gewaschen, mit 0.5% Glutaraldehyd in PBT eine Minute lang nachfixiert und wiederum dreimal in PBT gewaschen. Die Färbung erfolgte mit dem Sigma DAB Tablettenset und wurde durch 0.5% Glutaraldehyd in PBT abgestoppt. Präparate wurden in 70% Glycerin/PBS aufbewahrt. Für die mikroskopische Beobachtung wurden die Larvengehirne mit Kaiser's Glycergel (Merck) auf einen Objektträger transferiert (Ashburner 1989b, Protokoll 16).

### 3.2.2 Immunhistochemie an Gefrierschnitten

#### 3.2.2.1 Adulte Köpfe

Für die Immunhistochemie an Gefrierschnitten wurden die adulten Köpfe nach dem Schneiden 30 Minuten mit 2% Paraformaldehyd fixiert, und dreimal fünf Minuten mit PBT gewaschen. Die Antikörperfärbungen wurden nach dem von Buchner *et al.* (1986) beschriebenen Protokoll durchgeführt.

#### 3.2.2.2 Weiße Puppen

Für die Anti-*myc* Färbungen wurden die Puppen zunächst mechanisch perforiert und über Nacht in Mirsky bei 4°C fixiert. Nach dreimaligen Waschen mit PBS (fünf Minuten) wurden die Kryostatschnitte durchgeführt. Die Antikörperfärbungen wurden nach Hofbauer und Buchner (Ashburner, 1989) durchgeführt.

### 3.2.2.3 $\beta$ -Galactosidasefärbung

Die Färbungen wurden nach Ashburner (1989) durchgeführt.

## 3.3 Molekulare Methoden

### 3.3.1 Molekulare Standardmethoden

Alle molekularen Methoden wurden, soweit nicht anders spezifiziert, nach Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989).

#### 3.3.1.1 Plasmid-Rescue

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte nach einem Protokoll von S. Celniker am CalTec, nachzulesen in Pflugfelder *et al.* (1990). Die DNA Konzentration betrug ca. 30  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ . Nach dem Restriktionsverdau genomischer Fliegen-DNA wurde der Ansatz phenolisiert (siehe Sambrook *et al.*, 1989) und in 30  $\mu\text{l}$  TE aufgenommen. 10  $\mu\text{l}$  dieses genomischen Verdau wurden in einem Volumen von 200  $\mu\text{l}$  mit 1 U/ $\mu\text{l}$  T4 Ligase und 5  $\times$  Ligasepuffer bei 15°C über Nacht religiert. Die Ligation wurde in einem relativ großen Volumen durchgeführt, um spezifische Autoligation sicherzustellen. Maximal 200 ng wurden in elektrokompetente XL1 blue-Zellen, hergestellt nach 'Bacterial Electroporation', Manual II, Version 3.0, Invitro gene, elektrotransformiert. Die Transformation erfolgte mit dem Elektroporator 1000 der Firma Stratagene bei 1800 Volt/cm.

#### 3.3.1.2 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde mit dem Sequenzierer ALF*express* der Firma Pharmacia Biotech durchgeführt. Die Sequenzierung geht auf die Didesoxymethode nach Sanger *et al.* (1977) zurück. Es wurde das Hydrolink-Long Ranger-Gel der Firma FMC unter Mengenangaben der ALF*express* *running conditions* verwendet (ALF*express* User Manual). Die Sequenzierreaktion wurde mit dem Thermo *sequenase fluorescent labelled prime cycle sequencing* Kit der Firma Amersham life science durchgeführt (siehe Versuchsanleitung) und auf dem Cycle Sequencer Hybaid Omn-E der Firma MWG-Biotech amplifiziert. Die Konzentration der in Wasser gelösten DNA betrug etwa 500 ng pro Nukleotidreaktion. pSK subklonierte Fragmente wurden mit UNIVERSAL und REVERSE-

Primern der Firma EUROGENTEC sequenziert. Für die direkte Sequenzierung der Plasmid-Rescues, Transformations- und Expressionsvektoren wurden folgende Primer, ebenfalls der Firma EUROGENETIC, benutzt.

Primer	Sequenzieranwendung	Sequenz
P lac-seq	Rescue Plasmid	5'GTG CCA CCT GAC GTC TAA GAA ACC 3'
P-3-inr-seq	Rescue Plasmid	5'ATA CGA CAC TCA GAA TAC TAT TCC 3'
P-3-seq	Rescue Plasmid	5'AGT GGA TGT CTC TTG CCG ACG 3'
sv40-seq	pIndy5/ pUAST	5' CTT AGA GCT TTA AAT CTC TGT AGG 3'
hsp-70-seq	pIndy5/ pUAST	5'GCG CTT CGT CTA CGG AGC GAC 3'
PAS2-1	Hefevektor	5'TCA TCG GTA GAG AGT AG 3'
PACT2t	Hefevektor	5' ACC ACT ACA ATG GAT G 3'
PQE-seq	pQE	5'TAT TTG CTT TGT GAG CGG AT AAC 3'

**Tab.4: Sequenzierprimer.** Orientierung der Primer: 5'→ 3'. Mit dem Primer Plac-seq wurde vom 5' Ende des pBR322 Vektors aus sequenziert, mit den Primern P-3-inr-seq und P-3-seq vom 3'Ende des Vektors. Die Verwendung der beiden letzteren ermöglichte es, die Insertionsstelle des P-Elements und die flankierende genomische Region zu sequenzieren, da der P-3-inr-seq Primer etwas tiefer, der P-3-seq Primer hingegen weiter außerhalb des 3' Ende des P-Element gelegen ist. Für alle weiteren Primer ist unter Sequenzieranwendung jeweils angegeben, in welchem Zusammenhang die Primer benutzt wurden.

### 3.3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde durchgeführt, um die Insertion der P-Elementlinie *not*<sup>3</sup> zu analysieren. Dazu wurde das "Expand TM High Fidelity PCR System" der Firma Boehringer Mannheim und der "RoboCycler Gradient 40" der Firma Stratagene verwendet. Reaktionsbedingungen: Anfangsdenaturierung: 2 min 94°C, Denaturierung bei 94°C: 30 sec., Annealing bei 57°C: 1 min, Elongation bei 68°C: 5 min. Anzahl der Zyklen: 32. Die Primer, bzw. deren Sequenz ist im Folgenden angegeben.

Primer	Sequenz
5-N5-BamH I	5' ATA TGG ATC CGC TGC AGT TCG TCG GCG AAAC 3'
<i>not</i> -RSV3	5' TAT TCT AGA TAT GTA AGC GCT GCC GCG TCC 3'
<i>P-lac</i> 1	5' ATT GTG GGA GCA GAG CCT TGG GTG CAG CCT 3'
<i>P-ry</i> 2-30	5' TCT CGA GCT CTT GCC GAC GGG ACC ACC TTA 3'

#### 3.3.1.4 IPTG-induzierte Proteinexpression in *E. coli*

5 ml Kulturen (OD<sub>600</sub> ~0,6) wurden zur Zeit 0 mit 1 mM IPTG induziert. Es wurde über drei Stunden hinweg, alle 60 Minuten eine Probe von 100 µl entnommen, abzentrifugiert und in 50 µl Cracking Buffer (0,01 M NaPO<sub>4</sub>, 1% β-Mercaptoethanol, 1% SDS, 6M Harnstoff, 0,01% Bromphenolblau) gelöst. Vor dem Auftragen auf ein Polyacrylamidgel wurden die Proben fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Als Größenstandard wurde der „Full Range Rainbow Marker RPN 800“ der Firma Amersham verwendet. Das Gel wurde mit Coomassie-Blau gefärbt und anschließend mit einer Entfärbelösung behandelt (Sambrook *et al.*, 1989).

### 3.3.2 Immunohistochemie

#### 3.3.2.1 Western Blot Analyse

Die Präparation der *E.coli* Proteine für die Western Blotmethode erfolgte wie unter II.3.5. beschrieben.

Für die Präparation der Fliegenextrakte wurden die Fliegen in ein Eppendorfcup überführt, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und gevortext. Dadurch lösen sich Köpfe von Körperteilen und die jeweilige Anzahl an Köpfen kann auf Trockeneis abgezählt werden. Diese werden dann in 50 µl Cracking Buffer homogenisiert. Die Proben wurden vor der SDS-PAGE fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Das Blotting der 6-12% PAGE Gele erfolgte nach Sambrook *et al.*, 1989. Die Detektion der Signale erfolgte mit dem ECL Kit der Firma Amersham Pharmacia Biotech.

#### 3.3.2.2 Immunopräzipitation

Die Immunopräzipitation von NONSTOP wurde nach dem Protokoll von Lee *et al.*, 1998 durchgeführt. Für jedes Extrakt wurden 50 Fliegenköpfe in 100 µl ES2 homogenisiert und bei 4°C abzentrifugiert (Alle folgenden Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4°C). Der Überstand wurde mit ES2 auf 400 µl aufgefüllt und mit 15 µl Protein A-Agarose der Firma Boehringer Mannheim, GmbH über Nacht bei 4°C rotiert, um unspezifische Interaktionen zu eliminieren. Das Gemisch wurde am nächsten Tag abzentrifugiert und der Überstand mit dem Peptid-Antikörper T1P5 sechs Stunden auf dem Rotor inkubiert (4°C), bevor über Nacht erneut Protein A-Agarose zugeben wurde. Danach erfolgten drei Waschschrte des immunopräzipitierten, gebundenen Nonstop Proteins mit ES2. Der Extrakt wurde in 40 µl Proteinladepuffer

aufgenommen, die Agarose 10 min. bei 95°C gelöst und auf ein 6% SDS-Gel geladen. Die anschließende Western Blot Analyse erfolgte nach Sambrook *et al.*, 1989.

### 3.3.3 Yeast Two Hybrid

Das Two-Hybrid System in Hefe erfolgte nach dem CLONTECH Matchmaker GAL4 User Manual. Sämtliche Protokolle und Lösungen wurden standardmäßig durchgeführt. Für die Transformation wurde der Y190 Hefestamm benutzt. Die adulte Kopfbibliothek wurde bei der Firma Clontech erworben, ein Aliquot einer embryonalen Bibliothek von Frau Dr. Gladys Mirey zur Verfügung gestellt. Diese Bibliothek wurde nach dem Protokoll von CLONTECH Matchmaker User Manual amplifiziert.

Als sogenannte *Bait*vektoren wurden folgende NONSTOP Konstrukte verwendet:

Bezeichnung	Erklärung
NOT-Wildtyp	<i>nonstop</i> cDNA Konstrukt
NOT-Mutante	<i>nonstop</i> cDNA Konstrukt, mit Punktmutation in der Cysteindomäne (Cystein -> Arginin)
NOT-N-Terminus	N-terminaler Sequenzbereich von <i>nonstop</i> (aa 25-431)
NOT-C-Terminus	C-terminaler Sequenzbereich von <i>nonstop</i> (aa 257-753)

### 3.3.4 Keimbahntransformation

Die Keimbahntransformation wurde nach Rubin und Spradling (1982) durchgeführt, wobei die Embryonen nicht dechorioniert wurden.

### 3.3.5 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien und Chemikalien wurden von den Firmen Amersham Life Science, BioRad, Bioenzym, Boehringer, EUROGENTEC, Fluka, GIBCO BRL, Janssen Chemica, Leica, Merck, Macherey-Nagel, NEN<sup>TM</sup> Life Science, Kodak, Pall, Pharmacia, Pineda Antikörper Service, QIAGEN, Roth, Sigma, Stratagen Vector Lab und Whatman<sup>®</sup> gestellt.

Das Wasser wurde der Anionenaustauscher und Filtrieranlage Milli-Q Plus der Firma Millipore entnommen.

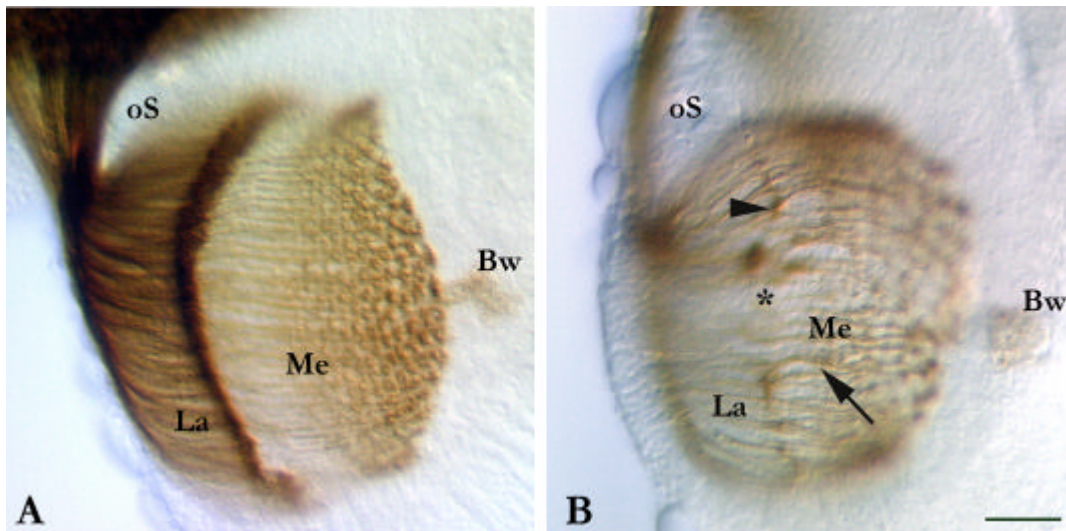
## **4 ERGEBNISSE**

## 4.1 Genetische und histologische Charakterisierung der *nonstop* Mutante

Die Ethyl Methansulfonate (EMS) induzierte Mutante *nonstop* (*not<sup>1</sup>*) entstammt der bereits erwähnten Mutagenese von Martin *et al.* (1995), die mit dem Ziel durchgeführt wurde, Gene auf dem dritten Chromosom zu isolieren, welche an der axonalen Wegfindung der Photorezeptoraxone (PRA) beteiligt sind. Kartiert wurde die Mutation durch Rekombinationsexperimente und Komplementationkreuzungen mit Defizienzstämmen, welche jeweils spezifische Deletionen innerhalb des dritten Chromosoms aufweisen. Für das *not<sup>1</sup>* Allel ergab sich eine Lokalisation bei 75C 1-4, einer Region, welche durch die Defizienz *Df* (*3L*) W4 aufgedeckt wird (Martin *et al.*, 1995). In diesem Bereich lokalisieren drei P-Element Insertionen, welche weder *not<sup>1</sup>*, noch die Defizienz komplementieren. Folglich handelt es sich hier um weitere *nonstop* Allele: *not<sup>2</sup>* wurde innerhalb des Berkley Genomprojektes identifiziert (Spradling *et al.*, 1999 – Berkeley Genom Project); *not<sup>3</sup>* und *not<sup>4</sup>* gehen auf eine Sammlung letaler P-Elementlinien zurück, die von Déak *et al.* (1997) etabliert und am Lehrstuhl auf Defekte im retinalen Projektionsmuster hin untersucht wurden (Fischer, 1998).

Alle Allele sind rezessiv letal in der frühen Puppe und zeigen mit einer Penetranz von 100% einen ähnlich stark defekten Wegfindungsphänotyp (Martin *et al.*, 1995, Abb. 12B). Mit dem photorezeptorspezifischen monoklonalen Antikörper 24B10 kann die axonale Projektion ab der späten dritten Larve gut nachgewiesen werden (Zipursky *et al.*, 1984). Wie in der Einleitung beschrieben, ziehen in einem wildtypischen Larvengehirn die Photorezeptoraxone über den optischen Stiel geordnet in die Lamina ein. Hier terminieren R1-R6 in einer halbmondförmigen Struktur, während R7 und R8 weiter in die Medulla einwachsen und dort eine regelmäßige Rasterstruktur bilden (Abb. 12A). In *nonstop* Mutanten fallen Störungen in der Laminaterminierung von R1-R6 auf: die Innervierung von R1-R6 ist lückenhaft und führt zu einer Auflösung des regelmäßigen Musters, das mit 24B10 im Wildtyp zu beobachten ist. Zudem kommt es bei *not* zu einer unregelmäßigen Anhäufung dickerer Axonfaszikel in der Medulla. Die Wachstumskegel von R1-R6 scheinen ihre Zielregion nicht zu erkennen, was zu einer Hyperinnervierung der Medulla führt.

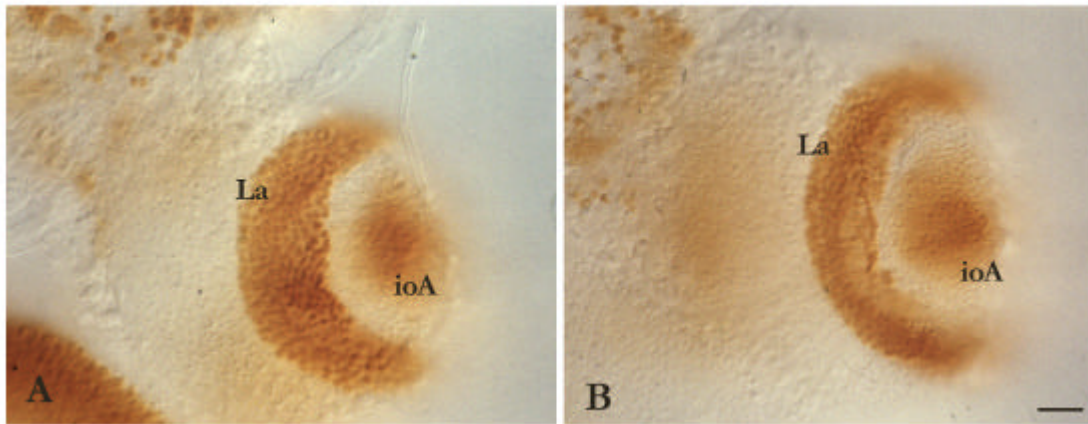




**Abb. 12: Phänotypische Analyse der *nonstop* Mutante.** Die Färbung mit dem photorezeptorspezifischen Antikörper mAB 24B10 wurde an frühen Puppengehirnen durchgeführt. **12A)** Im Wildtyp ziehen die PRA durch den optischen Stiel (oS) in das Gehirn ein. Während R1-R6 regelmäßig in der Lamina (La) terminieren, ziehen die Wachstumskegel von R7 und R8 in die Medulla (Me) weiter, wo sie ebenfalls geordnet die entsprechenden synaptischen Verbindungen aufnehmen. **12B)** In der *nonstop* Mutante [*not<sup>1</sup>/Df(3L)W4*] ist die Lamina kaum mehr erkennbar, nur noch einzelne Axone terminieren hier (Pfeilspitze), ein großer Bereich ist lückenhaft (\*). Dicke Axonbündel (Pfeil) hyperinnervieren ohne erkennbares Muster die Medulla (Bw: Bolwig Nerv; posteriore Ansicht; dorsal oben; Maßstab: 50  $\mu$ m).

Diese Störung ist eher auf einen Zielfindungsdefekt zurückzuführen, als auf ein fehlerhaftes Auswachsen der Wachstumskegel selbst; die Axone der Photorezeptoren R1-R6 wachsen vollständig in die Lamina ein, ein Großteil jedoch zieht in die Medulla weiter.

Es stellt sich die Frage, ob eine Störung in der Laminaentwicklung für die fehlerhafte Projektion der Axone verantwortlich sein könnte. Das kernlokalisierte Protein Dachshund (Dac) stellt einen Marker früher Differenzierungsschritte der Neuronen im ersten optischen Ganglion dar (Mardon *et al.*, 1994). Die Expression von Dachshund wird durch die einwachsenden PRA induziert (Huang und Kunes, 1996). Im Wildtyp erhält man bei Anti-Dachshund Färbungen larvaler Hemisphären eine sichelförmigen Expression in allen Neuronen der Lamina, sowie den neuronalen Zellen der inneren optischen Anlage (Abb. 13A). In der Mutante *not* ist kein Unterschied zum wildtypischen Expressionsmuster zu erkennen (Abb. 13B). Die beginnende Differenzierung der Laminaneuronen verläuft in *nonstop* also normal. Daher scheinen die Störungen innerhalb der axonalen Weg- bzw. Zielzellfindung der *nonstop* Mutante nicht durch eine gestörte Morphogenese der Laminaneuronen verursacht zu werden.



**Abb. 13: Analyse der frühen Laminadifferenzierung. 13A)** Die frühe neuronale Entwicklung der Lamina kann durch Anti-Dachshund Färbungen verfolgt werden. Im Wildtyp ist die Lamina (La) und die innere optische Anlage (ioA) zu erkennen. **13B)** In der *nonstop* Mutante findet eine normale frühe Laminadifferenzierung statt. Die Dachshundexpression zeigt keinen Unterschied im Vergleich zum Wildtyp. Maßstab: 25  $\mu$ m.

## 4.2 Molekulare Analyse des *nonstop* Gens

Die P-Elementstämme *not<sup>2</sup>*, *not<sup>3</sup>* und *not<sup>4</sup>* erleichterten die molekulare Analyse des *nonstop* Gens. Die gentechnisch modifizierten P-Elemente dieser Linien ermöglichen es, flankierende Gensequenzen zu klonieren (Cooley *et al.*, 1988; Steller und Pirrotta, 1986). Die Isolation einer solchen genomischen Region erlaubte es u.a. einen P1-Phagenklon der Region (DS04511) zu identifizieren. (The FlyBase Consortium, 1999). Durch die Analyse von DS04511 und der drei Allele *not<sup>2</sup>*, *not<sup>3</sup>*, *not<sup>4</sup>* konnte eine vollständige Exon-Intron Struktur erstellt, und die Insertionen der P-Elementlinien lokalisiert werden.

### 4.2.1 Molekulare Charakterisierung der P-Elementlinien

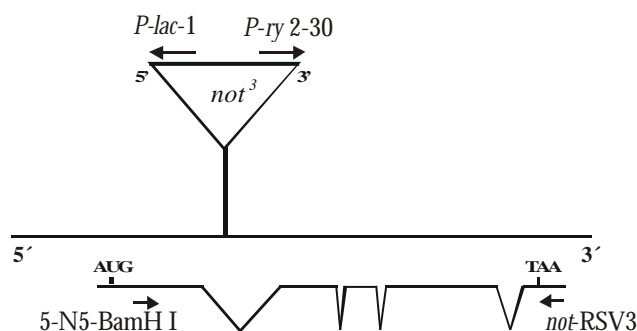
Bei *not<sup>2</sup>* und *not<sup>4</sup>* handelt es sich um Stämme, welche jeweils ein *P lacW* Element enthalten. (Abb. 14). Dieses Konstrukt wurde von der Arbeitsgruppe Deák *et al.* (1997) für die bereits erwähnte Mutagenese (I.4; III.1) auf dem dritten Chromosom benutzt.



**Abb. 14: Schematische Darstellung des *P lacW* Elements (11 191 bp).** *lacZ*:  $\beta$ -Galactosidase Reporter gen, *white*: Genprodukt, beteiligt an der Produktion und Verteilung von Farbstoffpigmenten im Komplexauge (Lindsley und Zimm, 1992), Funktion: selektierbarer Augenmarker, *amp*: Gen für Ampicillinresistenz, *ori*: Replikationsursprung des pBR322 Vektors. Nur eine Auswahl relevanter Schnittstellen ist dargestellt: EcoRI und SstII stellen den ersten Polylinker dar, bei HindIII, BamHI und SalI handelt es sich um Enzyme des zweiten Polylinkers.

Das *P lacW* Element enthält neben dem phenotypischen Marker *white* einen Plasmidanteil mit Replikationsursprung (*ori*) und Ampicillinresistenz (*amp*). Dieses Plasmid kann durch einen sogenannten *Plasmid Rescues* isoliert und amplifiziert werden und dient, wie bereits erwähnt, der Klonierung der flankierenden Gensequenzen (siehe auch Material und Methoden, II.3.2.).

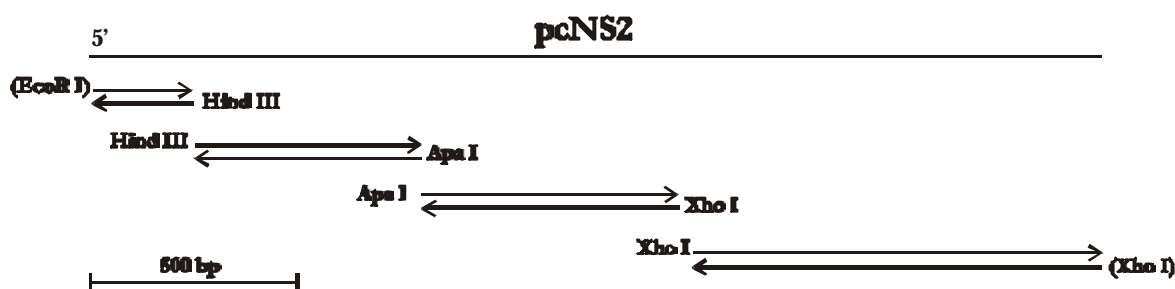
Zunächst wurde *not<sup>2</sup>* lokalisiert und charakterisiert (B. Poeck, persönliche Mitteilung). Ein 5.5 kb genomisches HindIII Rescue Fragment von *not<sup>2</sup>* wurde u.a. für die Isolation einer putativen *not* cDNA benutzt (siehe Abb. 17, III.2.2.). Die molekulare Analyse von *not<sup>4</sup>* ergab durch einen EcoRI Plasmid Rescue ein genomisches Fragment von 7.5 kb, dessen Sequenzierung zeigte, daß das P-Element nur 20 bp upstream von der *not<sup>2</sup>* Insertion liegt. Mit der Linie *not<sup>3</sup>* konnte kein erfolgreicher Plasmid-Rescue durchgeführt werden; daher diente ein PCR Experiment zur Lokalisation des Insertionslocus (Abb. 15). Primer innerhalb des 3' und 5' Endes von *P lacW* (*P-lac-1*; *P-ry 2-30*) und der präsumptiven *nonstop* cDNA (5-N5-BamH I; *not-RSV3*) ergaben in der Kombination 5-N5-BamH I/*P-lac-1* und *not-RSV3*/*P-ry 2-30* zwei PCR Produkte von 700 bp und 2.2 kb (pNS10), welche in einen pSK Vektor subkloniert und sequenziert wurden. Die Sequenzdaten zeigten, daß das P-Element des *not<sup>3</sup>* Allels im ersten Intron inseriert ist (Abb. 15).



**Abb. 15: Schematische Darstellung der *not<sup>3</sup>* Insertion.** Die Analyse der P-Elementinsertion erfolgte über ein PCR Experiment. Die Kombination der Primer *P-ry 2-30* und *not-RSV*, bzw. *P-lac-1* und 5-N5-BamHI ergab zwei PCR Produkte, die sequenziert wurden und *not<sup>3</sup>* innerhalb des ersten Introns lokalisierten. Analyse der Exon-Intron Struktur von *not*, vergleiche: Abb. 17. III.2.2.

#### 4.2.2 Struktur des *nonstop* Gens

Für die Erstellung der Exon-Intron Struktur von *not* wurden verschiedene Sequenzdaten benutzt; u.a. trug die Analyse der entsprechenden cDNAs zur Bestätigung der kodierenden *nonstop* Region bei. Es ist bereits erwähnt worden (III.2.1), daß ein 5.5 kb genomische Rescue Fragment aus der P-Elementlinie *not*<sup>2</sup> als Sonde für die Isolation zweier *nonstop* cDNAs benutzt wurde. Mit diesem Fragment wurde eine adulte Kopf ( $\lambda$ gt-11)- und eine embryonale ( $\lambda$ -ZAPII)- Bibliothek analysiert (freundlicherweise von K. Zinsmaier, bzw. C.S. Thummel zur Verfügung gestellt). Sowohl ein Klon der adulten Kopfbibliothek, pcNS1 (2300 bp), wie auch der embryonale pcNS2 (2448 bp)-Klon enthalten ein offenes Leseraster und repräsentieren ein vollständiges 3' Ende, gekennzeichnet durch ein Poly-A Ende. Innerhalb dieser Dissertation wurde die embryonale cDNA subkloniert und doppelsträngig durchsequenziert (Abb. 16).



**Abb. 16: Sequenzstrategie der *nonstop* pcNS2 cDNA.** Die cDNA der Länge 2448 bp wurde in vier Fragmente subkloniert, welche doppelsträngig sequenziert wurden (Pfeile). Die Schnittstellen EcoRI am 5' Ende und Xho I am 3' Ende entstammen dem Klonierungsvektor pSK und sind nicht in der ursprünglichen pcNS2 Sequenz enthalten.

Die Sequenzergebnisse von pcNS1 konnten dadurch bestätigt werden. Keine der beiden cDNAs repräsentiert ein vollständiges 5' Ende. Das offene Leseraster von pcNS1, als auch das von pcNS2 ist am 5' Ende offen; d.h. 5' ist kein Tripletts enthalten, das für ein Methionin kodiert. Northern Blot Analysen, durchgeführt mit einer *not* cDNA Probe, ergaben ein Signal bei 2.7 kb (Abb. 19), woraus ersichtlich wurde, daß den beiden cDNA Klonen ca. 400 bp am 5' Ende fehlen. Das Ergebnis zeigt außerdem, daß nur ein *nonstop* Transkript vorliegt, da keine alternativen Spliceformen des Gens detektiert wurden. Erst über 5' RACE Experimente und die Sequenzierung unmittelbar anschließender genomischer Regionen konnte die Sequenz komplementiert werden (B.Poock, persönliche Mitteilung). Die vollständige *nonstop* cDNA (pcNS-XE; 2626bp) ist in Abbildung 17 durch die rot markierten Sequenzenabschnitte gezeigt. Das Gen kodiert für ein 735 aa großes Protein (siehe Abb. 22).

1 agtattttta tttgtgcgcg caaacccgct gcttgctgtc gataacacat aagctgggcg  
61 actttaaccg ttttataata aaatggacca gtctaaaaat aaagaatggt tactggtata  
121 caaaattgta tcccatata aaettgagga ataagtagct cgtaattatc cgaatatgga  
181 tgcatttcaa tatttgggct gctagaacct tttattgttc ctataacccg aatagagatt  
241 ccatttcaat ataaactttat cttgaatggt ttagtttact ttctatttaa actaatattc  
301 cgttttaaat gtttcaatac tcttatatta gaaaaatacc aatgccaaca tctgagtacg  
361 atttogcaac tggtcacact gacagctgtc ttctaccaac acatagcgc gcgtgtgtat  
421 gtgtttgctg gcagtgcgaa ataataaaca gaaaagcaag cgaaaaatca cagaaattca  
481 caaaaaaaaa gcccaactac ttccaaaatt gggccgcccg gcgagaacc gcaaaagtgg  
541 ccaaaattcg gcgaaaacag cgcaagtgtg acaaagcatt cgtgcccgtg catcgtcgg  
601 cgaaacgggc gaaaacaaaa gagaatagtg ttgatagtaa tacgagcgta tttagcagta  
661 gcagcagcag cagcagtggc cgaagcttcg gcaggggaac ggaacgggtg gcggtgggtg  
721 cagaagcggg ccggggaacg gccgagaacg aaacactagc agtagcagca gcagcagcga  
781 caacaacaaa tgcgggtcgc tttatcaccg ccgatctaata caaacagtt aacagcgaca  
841 agcagcgaga cagagtagca aagggccaca gggcacgaa aaaccctta gatgccacca  
901 aaaaattgcg cctatcggac tgcttgctgta ccgtgcaaaa acttgctatt gaacttgaga  
961 gcgcgcgacg ccgcagcgac gccagcgcgc aagccaacgc tagcgcgcgac gacagcagcg  
1021 ccgtcatgtc cgagacgggt tgtggcact atcaaaagcta tgtgaaggag cacagctacg  
1081 atacattccg ggcatcgcac gcctacttcg ctgcttgctg caacagagat gcgcgcgagc  
1141 gaaagggtgag ttcagaggcg tgaagagag tgggagctag aatgagtgcg ctactggcgt  
1201 ggtgaggtga gaatgtgcga gtgtgcgaag gggagaacgg aattacaatc agaggtgcgc  
1261 cgtgagtcac gtgaaaggtc actgacacc ccgctgtggg atgacagtgg cagacaacgc  
1321 accgttctca ccacaaagca gtgcgacttt tttgaatggg taaagcatgc aacagctgtt  
1381 tttaacagct gacaaattgg cactgtgaaa aatacttttg catcgaaaaa gttttgtttt  
1441 cattacgggt gaaattacat atcaagaaaa atatattcaa aatatttaat attgttacat  
1501 ggcttttgta tttttagctt catattgatt atatattata ttttgcttac gagatttaga  
1561 gttttcaaat ttttgttaca ctttatgcat tagtatggga cgtatttttt gtaaagttaa  
1621 tgggattaga aaaaaaacga atataatttt ttatcagctg ccattttaaa atctacctcc  
1681 gccaggctat tcaactgcaac tgcttcgagt gcggcagcta cggcatccag ttgtacgctt  
1741 gcctgcactg catctacttc ggatgtcggg gggcccacat cacgagtcac ctgcatcca  
1801 agaagcaciaa tgtggccctg gagctgtccc acggaacgct ctactgctac gcctgcagag  
1861 atttcatcta cgacgcgagg agtgcgagat atgcgctgat caaccgcaag ctggaggcga  
1921 aggatctgca gaagagcadc ggctgggtgc cgtgggttcc cacaaccaag gagaccaatc  
1981 tgctgctggc caatgcgagg cgtggcttag tgaggcccaa tcaaacgatc ggactgaggg  
2041 gtctgcttaa tctgggcgcc acttgcttca tgaactgcat cgtccagggt ggcaaatcca  
2101 attaaactgg cgagtctcct ctcaactgact tactcctgtc tcctctagc tctggttcac  
2161 acgcccctgc tcagcgatta ctttatgtca gatcgtcacg actgcggcag caagtcatcg  
2221 cacaaatgtc tcgtttgtga agtgtcacgt ctctccagg tgagttcaat atgctgtggg  
2281 gtttatgagg agtcttttct attcgatatg ctatcccccc tttgtaggag ttctattccg  
2341 gctcccgctt gccgctgtcg ctgcaccggc tactgcattt aatctggaac catgcgaagc  
2401 acttgcccg ctacgagcag caggatgcgc acgagttctt catcgccact ctggacgtgc  
2461 tgcacggca ctgctgaag gcaaaggcgg agcacgaaag caagagcaac agctctggct  
2521 cgggaagtgg aaccaattcc agcaactcga gcagctcga ttgctacggc cagtgtatt  
2581 gcatcattga ccagatcttc acgggcagtc tgcagagcga tgtggtgtgc caggcctgca  
2641 acggagtgtc caccacgtac gatccgtttt gggacatttc gctggacctg ggcgaaacaa  
2701 caacgcagtg tgggttact ccaaaaacgc tgatagactg cctggagcgg tacactcggg  
2761 ccgagcatct cggatcggcg gccaaaatca agtgcctctac ctgcaaatcc taccaggagt  
2821 ccaccaaaca gttcagcctg cgcactctgc ccagcgtggg tgcgttccat ttgaaacgct  
2881 tcgagcactc agctctgatc gatcgcaaga tctcctcgtt cattcaatc cccgtggagt  
2941 tcgacatgac gccctttatg tcggagaaga agaacgccta cggcgacttc cggttctctc  
3001 tgtacgccgt ggtcaatcat gtgggcacca tcgacaccgg ccactatacg gcgtatgtgc  
3061 ggcaccagaa ggacacgtgg gtcaagtgcg atgatcatgt gataacgatg gcatcgctca  
3121 agcaggtgct ggacagcgag ggtaagaat ggccaatata tctcagcttt atcaccgcaa  
3181 aagcagcatt caatgttagc ttacttaagt tgatttatcc tatcttaaat tcatatacaa  
3241 cgttatttag ctttttattc ggattatcaa atcattatta actaactact tattttcact  
3301 tctttcagtt atttattggt ctaccataaa aatgtgctgg aatacagata agaaaatccg  
3361 ctgagatcga ttaaagcagc gactgcatcc ctcaaaaaac aaaaacagaa aacagaagtc  
3421 aatgcattac gaattacgaa taaacacaaa atacagacaa ggacgcggca gcgcttacat  
3481 attaagtaat attaacacaa acacgaaagc aatcctacaa tttgaggagt gttcatttga

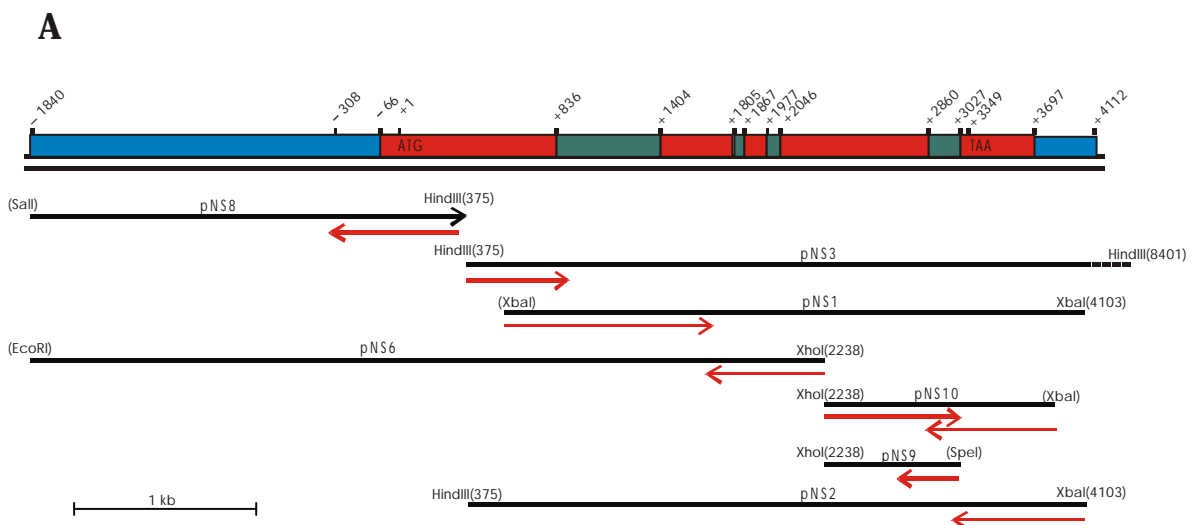
```

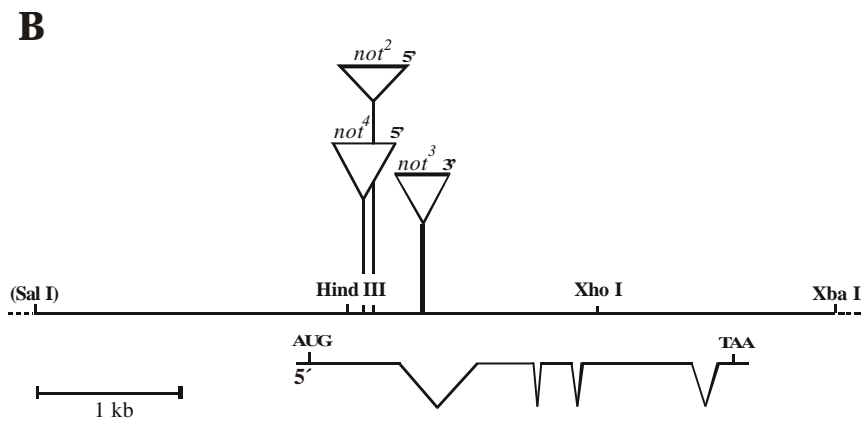
3541 ttcgattggg gttattcaag ctcaaaact caaacattg gaacgaacaa tggagaacaa
3601 aaaaaaagga aattaatgaa aatgtaatca atctgaacac tcgatttgtg gagatacccg
3661 ttttgctcta agtatttcaa atccataata ctaaaaacaa atcaaaaacaa caagcagatg
3721 acttatacat ttatatttaa aatcaaaaca agggatattc tacaacgcc gtattacaaa
3781 tggaaagcga atttttatca tttttcttga aatgcctttt attgaaaaaa aaaatgttaa
3841 aaacacattt tcagacacat cgtttagaac tgaacaaaa tccaaatcat gcttatgaat
3901 gtcattggatt tttttatttc gtcttcattt aaataaggag atcaataatt gtaaatttaa
3961 ataactacat ttttgggggc tcaggcaact gggattaaga tacattgcaa ttatttaaaa
4021 acgaaaaaaa attacaaccg acgtcaactt gggtcgtcc gg

```

**Abb. 17: Die genomische Region von *nonstop*.** Die genomische *nonstop* Region umfasst 4062 bp und ist in der Flybase unter AF179590 einzusehen. Farbkode: rot: cDNA (pcNS-XE); grün: Intronsequenzen; blau: 5', bzw. 3' genomische Region. Die TATA Box bei 137-142 bp ist schwarz umrahmt, das Initiatorähnliche Signal bei 171-179 bp unterstrichen. Gelb hinterlegt sind am 5' Ende die drei potentiellen Translationsstarts, am 3' Ende das TAA- Stoppsignal. Die beiden schwarz umrahmten G-Nukleotide markieren den ursprünglichen Start der cDNAs pcNS1 (bei 593 bp) und pcNS2 (bei 443 bp). Die schwarzen Pfeilspitzen zeigen die Insertionsloci der P-Elemente: *not<sup>2</sup>*: 1069 bp, *not<sup>3</sup>*: 1168 bp und *not<sup>4</sup>*: 1049 bp.

Die Sequenzierstrategie der gesamten genomischen *nonstop* Region, gezeigt in Abbildung 18A, beruht vor allem auf genomischen Subklonen des P1 Phagen und genomischen PCR Produkten (pNS10 aus *not<sup>2</sup>*, siehe Abb. 15). Die durch Plasmid Rescues erhaltenen Sequenzen von *not<sup>2</sup>* und *not<sup>4</sup>* wurden ebenfalls in die Strukturanalyse integriert. Das Gen setzt sich aus 5 Exons und 4 Introns zusammen (Genbank: AF179590). Innerhalb der *upstream* Region des *nonstop* Gens befindet sich bei 137-142 bp eine TATA-Box und bei 171-179 bp eine Initiatorähnliche Sequenz (Abb. 17; Arkhipova, 1995). Noch vor der Publikation des gesamten Genoms von *Drosophila melanogaster* im März 2000, wurde die Exon-Intron Struktur von *nonstop* fertiggestellt. Die veröffentlichten Daten bestätigten die in Abbildung 18A zusammengefassten Ergebnisse. 18B zeigt die endgültig genaue Insertion der einzelnen P-Elementlinien in der genomischen Region von *nonstop*.



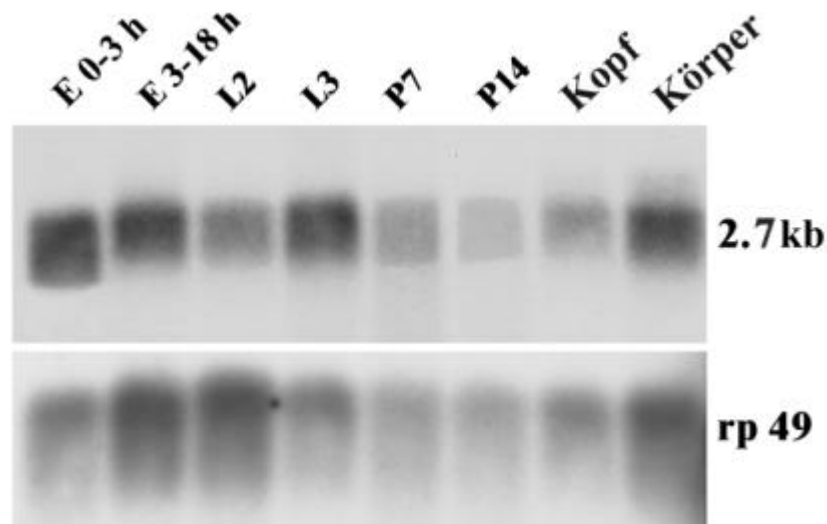


**Abb. 18: Genomische Region des *nonstop* Gens, Sequenzstrategie und Insertionsloci der P-Elemente. 18A)** Die genomische *nonstop* Region ist mit ihrer Exon- (rote Abschnitte) und Intron-(grüne Abschnitte) Struktur oben angegeben. +1 markiert den Transkriptionsstart mit ATG, das Stopkodon (TAA) befindet sich bei Basenpaar 3349. In blau sind 3' und 5' die nicht transkribierten Regionen eingezeichnet; bei -308 bp beginnt die cDNA pcNS-XE (siehe Abb. 17). Die dem P1 Phagen entnommenen Subklone werden als pNS bezeichnet, pNS10 geht auf die genomische PCR von *not3* zurück (III.2.1.). In Klammern angegebene Restriktionsenzyme sind artifiziell, d.h. nicht in der genomischen Region vorhanden. Die roten Pfeile markieren die Sequenzierstrategie, nicht angegeben sind weitere überlappende Subklone, sowie die genomischen Regionen der Plasmid Rescues von *not2* und *not4*, welche ebenfalls in die Sequenzanalyse miteinbezogen wurden.

**18B)** Gezeigt sind die drei P-Elementlinien und die Exon-Intronstruktur von *nonstop*. Während *not2* und *not4* im ersten Exon inserieren, lokalisiert das P-Element von *not3* innerhalb von Intron I. Die Orientierung der P-Elemente ist jeweils angegeben.

#### 4.2.3 Entwicklungs-Northern Blot Analyse der *nonstop* Expression

Um das Expressionsmuster des *nonstop* Gens zu analysieren, wurden mRNA Extrakte verschiedener Embryonen-, Larven-, und Puppenstadien, bzw. adulter Köpfe und Körper mit der cDNA pcNS1 geprobt. In allen Entwicklungsstadien konnte das *nonstop* Transkript mit 2.7 kb detektiert werden (Abb. 19). Wie bereits diskutiert wurde, liegen also keine weiteren Spliceformen vor. Vergleicht man das *not* Signal in der dritten Larve mit *rp 49*, einem ribosomalen Protein, welches als Ladekontrolle dient, so fällt eine stärkere Expression des *nonstop* Transkripts in diesem Stadium auf. Das *nonstop* Transkript könnte zu diesem Zeitpunkt eine entscheidende Rolle innerhalb der Entwicklung spielen, bzw. die Letalität der *nonstop* Allele im späten dritten Larvenstadium verursachen. Die Präsenz von *not* in frühen Embryonen (0-3 Stunden) ist auf maternale Kontribution zurückzuführen, da zu diesem Zeitpunkt noch keine zygotische Transkription stattfindet, sondern die gesamte mRNA von maternaler Seite zur Verfügung gestellt wird.

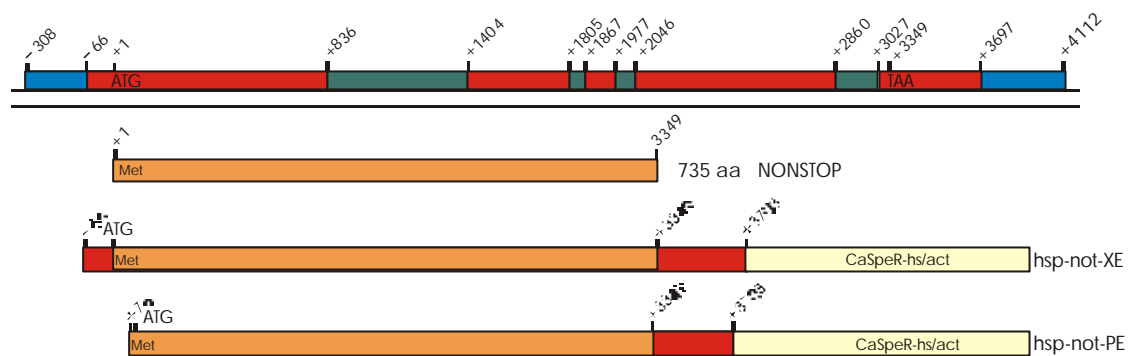


**Abb. 19: Northern Blot Analyse der *nonstop* mRNA.** Der Blot wurde mit pcNS1 geprobt. In jeder Spur wurden ~10 µg mRNA Extrakte von Embryonen (E 0-3 h, E 3-18 h), zweiten und dritten Instarlarven (L2, L3), Puppen nach 40 h und 80 h Verpuppungszeit (P7, P14; Bainbridge und Bownes, 1981) und adulten Köpfen, bzw. Körpern aufgetragen. Eine cDNA Probe des ribosomalen *rp49* Protein *Drosophila* diente als Ladekontrolle (O'Connell und Rosbash, 1984). B. Poeck, persönliche Mitteilung.

#### 4.2.4 Expression der *not* cDNA rettet die Phänotypen der *nonstop* Mutante

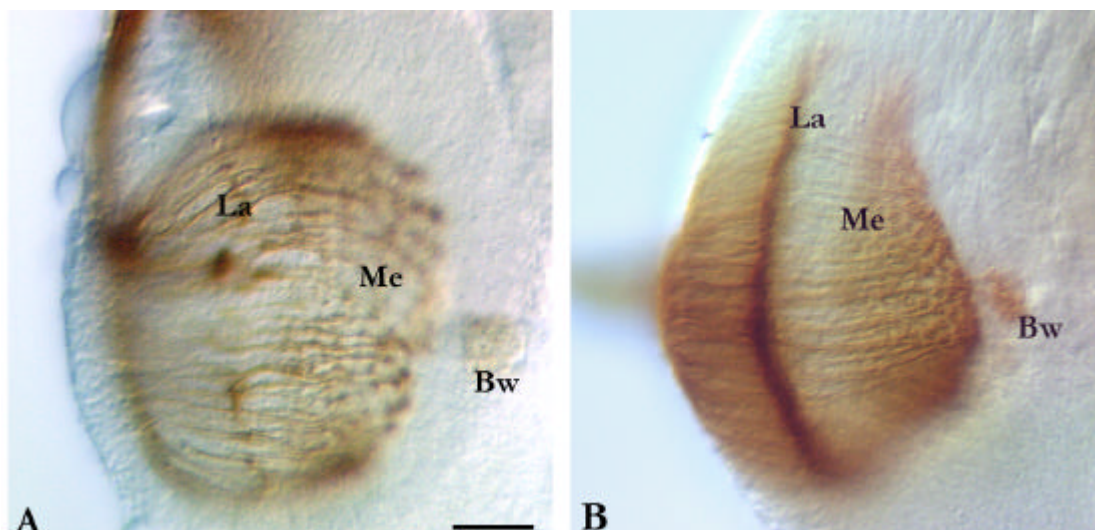
Um zu zeigen, daß die Störungen in der axonalen Photorezeptorprojektion und die Letalität auf eine Mutation im *nonstop* Gen zurückzuführen sind, wurden sogenannte *Rescue* Experimente durchgeführt. Durch P-Elementtransformation ist es möglich, in einer Mutante die Genfunktion wieder herzustellen, d.h. den mutanten Phänotyp zu einem wildtypischen zu revertieren, bzw. die Mutante zu retten (daher die Bezeichnung *Rescue* Experiment). Neben dieser Rettung, sollte bei *nonstop* noch eine weitere Frage geklärt werden: Innerhalb des 5' Region von *not* sind drei mögliche Startkodons vorhanden, die am 5' Ende alle das Leseraster öffnen (siehe Abb. 17). Um zu klären, welches Methionin den relevanten Translationsstartpunkt repräsentiert, wurden verschiedene *Rescue* Experimente der *nonstop* Phänotypen durchgeführt. Hierzu wurden zwei cDNA Konstrukte in den Transformationsvektor CaSpeR-hs/act (Thummel und Pirrotta, 1992) kloniert, welcher unter Hitzeschockbedingungen die Expression des jeweiligen *nonstop* Transkriptes ermöglicht. (Abb. 20). Das Konstrukt *hsp-not-XE* repräsentiert die cDNA, welche alle drei Methioninkodons enthält, *hsp-not-PE* hingegen besitzt nur den dritten möglichen Translationsstart, 32 aa *downstream* (siehe Abb. 16: ATG bei 405 bp).





**Abb. 20: *nonstop* Rescue Konstrukte.** Die genomische Region von *nonstop* wurde bereits in Abb. 17 und 18A) beschrieben. Das Nonstop Protein von 735 aa wird von den orangenen Balken gezeigt, die Ziffern beziehen sich jeweils auf die genomische Region. Das *hsp-not-XE* Konstrukt enthält alle drei Methionine und 66 bp *upstream* Region (rot eingezeichnet). *hsp-not-PE* beginnt bei Basenpaar 78 des offenen Leserasters und enthält nur das dritte ATG. Die rot eingezeichneten Sequenzen 3' zum Protein zeigen 354 bp der cDNA, die zusätzlich in den Vektor kloniert wurden. Der Transformationsvektor CaSpeR-hs/act (Thummel und Pirrotta, 1992) wird von den gelben Balken schematisch (d.h. nicht in seiner ursprünglichen Größe) repräsentiert.

Bei den innerhalb des *Drosophila* Genom Projektes isolierten *nonstop* cDNAs reicht interessanterweise kein Klon über dieses dritte Methionin hinaus, soweit die Sequenz am 5' Ende vollständig ist. Von den Transformanten wurden stabile Stämme etabliert und für beide Konstrukte drei unabhängige Insertionslinien getestet. In einem genetisch homozygoten Hintergrund für *nonstop*, sollte nur das dem echten Leseraster entsprechende Konstrukt sowohl die Letalität, als auch den axonalen Wegfindungsphänotyp retten. Bereits bei 25°C, d.h. bei einer Temperatur, bei der *Drosophila* unter Standardbedingungen gehalten wird (siehe Material und Methoden, II.1.) war es sowohl mit *hsp-not-PE*, als auch mit *hsp-not-XE* möglich die Letalität von *not<sup>1</sup>* und *not<sup>2</sup>* zu beheben. Die Rettung des Projektionsphänotyps wurde mit Hilfe von 24B10 Färbungen an larvalen Gehirnen untersucht. Mit dem Konstrukt *hsp-not-XE* ergab sich eine wildtypische Projektion der PRA in durchschnittlich über 98% der untersuchten Gehirnhemisphären (Abb. 21; Tabelle 5). *hsp-not-PE* hingegen zeigt nur zu 76% ein normales Einwachsen der retinalen Axone in den optischen Lobus (Tabelle 5).



**Abb. 21: Rettung des axonalen Wegfindungsphänotyps der *nonstop* Mutante. 21A)** Retinaler Projektionsphänotyp der *nonstop* Mutante (für Beschreibung, siehe Abb. 12B). **21B)** Mit dem Konstrukt *hsp-not-XE* konnte bereits bei 25°C eine wildtypische Projektion der PRAs wiederhergestellt werden. Die Photorezeptoren ziehen regelmäßig in das Gehirn ein, R1-6 terminieren einheitlich in der Lamina (La), R7 und R8 innervieren die Medulla (Me) in einer wildtypischen Rasterstruktur. (Genotyp des Rescue Konstrukts:  $P[hsp-not]^{XE5}; not^l$ ; Bw: Bolwig Nerv; posteriore Ansicht; dorsal oben; Maßstab: 50  $\mu$ m).

Genotyp	Anzahl der getesteten Hemisphären	Anzahl (%) eines wildtypischen Projektionsmusters
$P[hsp-not]^{PE20-4}; not^l$	56	44 (78.6)
$P[hsp-not]^{PE28-2} / CyO; not^l$	54	49 (90.7)
$P[hsp-not]^{PE703}; not^l$	116	69 (59.5)
$P[hsp-not]^{XE5}; not^l$	62	60 (96.8)
$P[hsp-not]^{XE7}; not^l$	130	125 (96.2)
$P[hsp-not]^{XE8} / CyO; not^l$	86	86 (100)

**Tab. 5: Ergebnisse des Rettungsexperimentes.** Unter Genotyp sind jeweils drei unabhängige Insertionslinien der Konstrukte *hsp-not-XE* und *hsp-not-PE* angegeben. *CyO*: Curly of Oster; Balancer für das 2. Chromosom; Lindsley und Zimm, 1992.

Obwohl beide cDNA Konstrukte die Letalität der Mutante in der dritten Larve retten können, wird ein wildtypischer axonaler Wegfindungsphänotyp nur von *hsp-not-XE* wiederhergestellt. *hsp-not-PE* ermöglicht lediglich einen partiellen Rescue der axonalen Projektionsdefekte. Aus diesen Ergebnissen läßt sich schließen, daß einerseits die präpupale Letalität und der retinale Projektionsphänotyp durch eine Mutation im *nonstop* Gen verursacht werden, andererseits das erste Methionin den Translationsstart für Nonstop darstellt, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, daß auch das zweite Methionin benutzt werden könnte.

Um festzustellen, ob eine Überexpression von *nonstop* einen Entwicklungsdefekt verursacht, wurde die Transkription von vier Kopien des *hsp-not-XE* Konstrukts über die gesamte Entwicklung hinweg durch Hitzeschock induziert ( $P[hsp-not]^{4XE}$ ). Diese ektopische Expression führte zu keinem sichtbaren Störung innerhalb der axonalen Wegfindung. mAB 24B10 Färbungen an adulten Gefrierschnitten zeigten ein wildtypisches Projektionsmuster der Photorezeptoraxone (Daten nicht gezeigt). Ferner gab es keine Auswirkung auf Fertilität oder Letalität, bzw. es war kein äußerer, vom Wildtyp abweichender Phänotyp zu beobachten.

#### 4.2.5 *nonstop* kodiert für eine Ubiquitin spezifische Protease

Mit Hilfe von Datenbanken und Sequenzvergleichen ergab sich eine hohe Homologie des *nonstop* Proteins zur Familie der Ubiquitin-spezifischen Proteasen. Diese Enzymfamilie gehört zu den Deubiquitinierenden Proteasen (DUP), welche an der Proteindegradation beteiligt ist, für welche den Eukaryoten das Ubiquitinsystem zur Verfügung steht (siehe Einleitung Abb. 11). Ubiquitin spezifische Proteasen (UBP) übernehmen die Deubiquitinierung der Multiubiquitinkette vom Substrat, bzw. können auch Isopeptidbindungen zwischen einzelnen Ubiquitinen spalten und zeichnen sich durch zwei hoch konservierte Bereiche in der C-terminalen Hälfte aus: eine Cysteindomäne, welche 18 Aminosäuren umfaßt, und eine Histidindomäne, welche sich über 55 Aminosäuren erstreckt (Abb. 22); zusammen bilden sie das aktive Zentrum einer UBP (Wilkinson, 1997). *Nonstop* zeigt in beiden katalytischen Domänen Homologie zu Ubiquitin Proteasen von *Schizosaccharomyces pombe* und *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Mus*, *Homo sapiens* und innerhalb *Drosophila* u.a. zu *fat facet* (Fischer-Vize *et al.*, 1992).

#### A

```

MFQYSYIRKIPMPTSEYDFATGHTDSCLLPTHMRACVCVCVQCEIETRKA    50
SEKSQKF'TKKKPNYFQNWAARRRTAKVAKIRRKQRKCDKAFVPLQSSAKR   100
AKTKENSVDSENTSVFSSSSSSSSGRSFGRGTERWAVGAEAGRGTAEENETL   150
AVAAAAATTTNAGRFITADLIKTVNSDKQRDRVAKGHRDTKNPLDATKNL    200
RLSDCLRTVQKLAIELESADAGSDASAQANASADDSSAVMSETGCRHYQS    250
YVKEHSYDTRVIDAYFAACVNRDARERKA IHCNCFECGSYGIQLYACLH    300
CIYFGCRGAHITSHLRSKKHVALELSHGTLICYACRDFIYDARSREYAL     350
INRKLEAKDLQKSIGWVPWPVPTTKE'TNLLL ANARRRLVVRPNQTIGLRGLL  400
NLGATCFMNCIVQALVHTPLLSDYFMSDRHDCGSKSSHKCLVCEVSRLFQ    450
EFYSGSRSPSLSHRLLHLIWNHAKHLAGYEQQDAHEFFIATLDVLRHRCV    500
KAKAEHESKSNSSGSGSGTNSNSNSSSSSHCYGQCNCIIDQIFTGMLQSDVV  550

```

CQACNGVSTTYDPFWDISLDLGETTTTHGGVTPKTLIDCLERYTRAEHLGS 600  
 SAAKIKCSTCKSYQESTKQFSLRTLPSVVSFHLKRFEHSALIDRKISSFI 650  
 QFPVEFDMTPFMSEKKNAYGDFRFSLYAVVNHVGTIDTGHYTAYVRHQKD 700  
TWVKCDDHVITMASLKQVLDSEGYLLFYHKNVLEYE

**B**

\*

<i>not Drome</i>	398	GLNLGATCFMNCIVQAL	415
<i>H. sapiens</i>	245	GLINLGNTCFMNCIVQAL	262
<i>UBPY Mouse</i>	740	GLRNLGNTCYMNSILQCL	757
<i>FAF Drome</i>	1669	GLKNA GATCYMNSVLQQL	1686
<i>C. elegans</i>	493	GLVNYGNFCYRNAGIQCL	510
<i>UBPA Schpo</i>	146	GIQNLGATCFMSVILQSI	163
<i>UBP8 S.c.</i>	138	GLINMGSTCFMSSILQCL	155

GL.NLG.TCFMN.IIQ.L

**C**

\*                    \*

<i>not Drome</i>	673	FS YAVVNHVGTIDTGHYTAYVR.....HQK	698
<i>H. sapiens</i>	531	YSLFAVVNHQGTLES GHYTSFIR.....QHK	556
<i>UBPY Mouse</i>	1013	YNLFSVSNHYGGLDGGHYTAYCKN...AAR	1039
<i>FAF Drome</i>	1970	YELTGI VVHSGQASGGHYFSYILSKNPANGK	2000
<i>C. elegans</i>	981	YECIALANHYGGLSCGHFIAYAK.....SNE	1006
<i>UBPA Schpo</i>	379	YQLYSVVCHKGTLDTGHYIAYTY.....YYQ	403
<i>UBP8 S.c.</i>	411	YELIGIVSHKGTVNEGHYIAFCK.....ISG	436

Y.L..VVNH GTL..GHY AY..

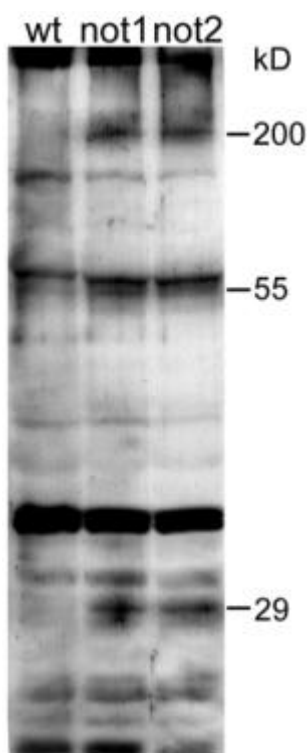
<i>not Drome</i>	699	DTWVKCDDHVITMASLKQVLDS.EGYLLFY	727
<i>H. sapiens</i>	557	DQWFKCDDAIITKASIKDVLDS.EGYLLFY	585
<i>UBPY Mouse</i>	1040	QRWFKFDDHEVSDISVSSVRS.AAYLLFY	1068
<i>FAF Drome</i>	2001	CQWYKFDDGEVTECKMHEDEEMANAYMLFY	2059
<i>C. elegans</i>	1007	DKWLLLNDCSVREVSEEEVDKQ.GAYLLFY	1035
<i>UBPA Schpo</i>	404	NQWFLLD DTTIVEVKESVLS.QAYLLFY	432
<i>UBP8 S.c.</i>	437	GQWFKFND SMVSSISQEEVLKE.QAYLLFY	465

QWFK DD. V...S..EVL.S .AYLLFY

**Abb. 22: Nonstop Protein und Homologievergleich der konservierten Domänen** **22A)** *nonstop* kodiert für eine Ubiquitin spezifische Protease (UBP) mit 735 aa. Die konservierten Domänen sind blau (Cystein~) und rot (Histidin~) unterstrichen; die Aminosäuren der jeweiligen aktiven Zentren (C; H) in rot hervorgehoben. Das erste und dritte Methionin, welche die Startpunkte für die jeweiligen Rescue Konstrukte (Abb. 19) darstellen, sind fett eingezeichnet. **22B-C)** Homologieanalyse der konservierten Domänen. Schwarz hinterlegt sind sequenzidentische, grau sequenzähnliche Aminosäuren. **B)** Cysteindomäne. **C)** Histidindomäne. Die Sequenzen stammen von *Homo sapiens* (KIAA 1063; AB02986), *Mus* (UPBY; AF057146.1), *Drosophila melanogaster* (Fat facet [FAF]; P55824), *Caenorhabditis elegans* (hypothetisches Protein ZK328.1; T29010), *Schizosaccharomyces pombe* (UBPA; Q09738) und *Saccharomyces cerevisiae* (UBP8p; NP\_013950). 30 Aminosäuren der FAF Sequenz sind nicht gezeigt (Δ).

Der N-terminale Bereich ist bei den einzelnen Mitgliedern der UBP nicht konserviert. Lediglich zu der humanen cDNA (KIAA1063; Kikuno *et al.*, 1999), zeigt Nonstop auch im N-Terminus eine hohe Homologie. KIAA1063 ist nicht vollständig, zeigt aber über die Aminosäuren 154 – 735 hinweg zu Nonstop eine Identität von 51% (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich zu anderen UBP läßt sich aus der Konservierung dieser beiden Proteinen schließen, daß KIAA1063 das humane Ortholog zu *nonstop* darstellt.

Die Sequenzdaten und Homologievergleiche weisen auf eine Funktion von Nonstop als spezifische Protease (UBP) innerhalb des Ubiquitinsystems hin, welche die Deubiquitinierung von Proteinen übernimmt. In der *nonstop* Mutante könnte daher eine erhöhte Anzahl ubiquitiniertes Proteine im Zytosol vorliegen. Diese Hypothese wurde mit einem Western Blot nachgewiesen, auf welchem larvale Extrakte von Wildtyp und zwei *not* Allelen aufgetragen und mit einem anti-Ubiquitin Antikörper (Haas *et al.*, 1985) getestet wurden (B. Poeck, persönliche Mitteilung). Abbildung 23 zeigt, daß im Vergleich zum Wildtyp drei ubiquitinierte Proteine der Größe 29 kD, 55 kD und 200 kD in *not<sup>1</sup>* und *not<sup>2</sup>* akkumulieren. Zusammen mit der Homologieanalyse konnte somit gezeigt werden, daß *nonstop* für eine funktionelle UBP kodiert.



**Abb. 23: Anti-Ubiquitin Immunoblotanalyse von wildtypischen und *nonstop* Larven.** Durchschnittlich wurde eine Larve pro Spur auf ein 8% PAGE Gel für die Western Blot Analyse geladen. Drei zusätzlich ubiquitinierte Proteine der Größe 29 kD, 55 kD und 200 kD können in den Spuren *not<sup>1</sup>* und *not<sup>2</sup>* detektiert werden.

#### 4.2.6 NONSTOP interagiert mit Komponenten des Ubiquitinsystems

Die genetische Interaktion von *nonstop* mit dem Ubiquitinsystem wurde mit einer Mutation im Proteasomenkomplex von *Drosophila* getestet. In Tieren des Genotyps *l(3)73Ai* ist das Gen für die 20S Proteasomenuntereinheit  $\beta 2$  rezessiv letal mutiert, was zu einer funktionellen Störung des gesamten Degradationskomplexes führt (Saville und Belote, 1993; Smyth und Belote, 1999). Es wurden *l(3)73Ai* Mutanten in einem für *nonstop* mutanten Hintergrund [*not<sup>1</sup>/Df(3L)W4*] sowohl auf Effekte bezüglich der Letalität, als auch des retinalen Projektionsmusters untersucht. Wie bereits erwähnt ist *not* in der späten dritten Larve, bzw. frühen Puppe homozygot letal. Um festzustellen, ob sich die Mutation des Proteasomenkomplexes auf diese Letalität auswirkt, wurde folgendes Experiment durchgeführt: Der Balancer *TM6* für das dritte Chromosom enthält einen larvalen, dominanten Marker, *Tubby* (*Tb*), welcher zu einer zusammengestauchten Puppenform führt, die sich deutlich von den wildtypischen Puppen unterscheiden läßt (Lindsley und Zimm, 1992). Kreuzt man *not<sup>1</sup>/TM6,Tb* zu *Df(3L)W4/TM6,Tb*, so repräsentieren alle nicht *Tubby* Puppen (*Tb<sup>+</sup>*) den Genotyp *not<sup>1</sup>/Df(3L)W4*. Da *TM6,Tb/TM6,Tb* Individuen embryonal letal sind, ist zu erwarten, daß von 1/3 der Nachkommen der *Tb<sup>+</sup>* Genotyp repräsentiert wird. An Hand der Puppenform lassen sich also die heterozygoten Balancerindividuen von der homozygoten *not* Mutante [*not<sup>1</sup>/Df(3L)W4*] unterscheiden. Es konnte gezeigt werden, daß 399 von 1325 Puppen, die aus der Kreuzung *not<sup>1</sup>/TM6,Tb* x *Df(3L)W4/TM6,Tb* hervorgingen nicht *Tubby* (*Tb<sup>+</sup>*) waren. Dieser Anteil repräsentiert 90.3% der zu erwartenden 441 *Tb<sup>+</sup>* Tiere, bzw. spiegelt eine Letalität von 9.7% wider. (Tabelle 6). Im Vergleich dazu gingen aus der Kreuzung der Doppelmutante [*not<sup>1</sup>; l(3)73Ai*] mit der Defizienz [*Df(3L)W4*] 123 *Tb<sup>+</sup>* Puppen aus einer Gesamtzahl von 1714 hervor. In diesem Fall gleicht das 21.5% der zu erwartenden 571 *Tb<sup>+</sup>* Puppen (bzw. 78% präpupale Letalität; Tabelle 6). Eine verringerte Aktivität des Degradationskomplexes führt also zu einer Verstärkung der Letalität der *nonstop* Mutante.

Genotyp	präpupale Letalität
<i>not<sup>1</sup>/Df(3L)W4</i>	9.7 %
<i>not<sup>1</sup>; l(3)73Ai/ Df(3L)W4</i>	78.5 %

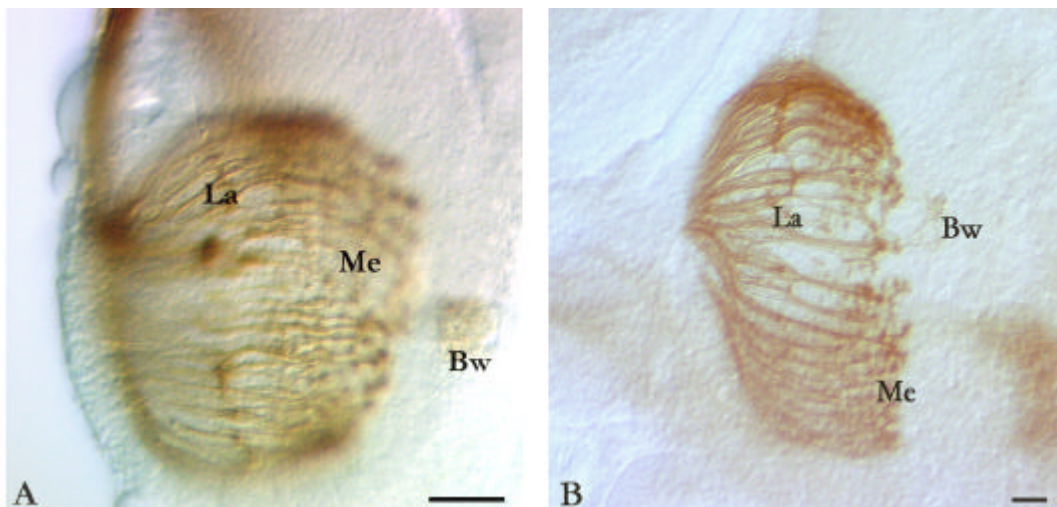
**Tab. 6: Verstärkung der präpupalen Letalität von *nonstop* durch eine Mutation im Proteasomenkomplex.** Erklärung der Kreuzung und Auswertung: siehe Text.

Um die Auswirkungen des mutierten Proteasomenkomplexes auf die retinale Projektion der *nonstop* Mutante zu untersuchen, wurden larvale Gehirne mit dem Antikörper 24B10 gefärbt und in einem sogenannten Blindtest ausgewertet. Verglichen wurden wiederum Individuen des Genotyps *not<sup>1</sup>/Df(3L)W4* mit *not<sup>1</sup>;l(3)73Ai/Df(3L)W4*. Die larvalen Gehirne wurden bei dieser

Auswertung in zwei Gruppen unterteilt: mehr als ~50% der Photorezeptoren R1-R6 wachsen durch die Lamina hindurch und hyperinnervieren die Medulla, bzw. weniger als ~50%. Bei 36 untersuchten Hemisphären ergab sich für *not* in 19,4% der Fälle eine starke Hyperinnervierung der Medulla (>50%), bei *not<sup>1</sup>;l(3)73Ai/Df(3L)W4* in 69,4% (Tabelle 7). Im Vergleich zu *not<sup>1</sup>* ist der Konnektivitätsphänotyp der PRA bei der Doppelmutante um ein dreifaches verstärkt (Abb. 24).

Genotyp	starke Hyperinnervierung der Medulla
<i>not<sup>1</sup>/Df(3L)W4</i>	19,4 % (n=36)
<i>not<sup>1</sup>;l(3)73Ai/Df(3L)W4</i>	69,4 % (n=36)

**Tab. 7: Verstärkung des retinalen Wegfindungsdefekts von *nonstop* durch eine Mutation im Proteasomenkomplex.** Die genetische Interaktion mit *l(3)73Ai* zeigt, daß die Hyperinnervierung der Medulla durch mehr als ~50% der PRA in der Doppelmutante verstärkt wird (69%) im Vergleich zu *not* (19,4%). n: Anzahl der untersuchten Hemisphären; der Projektionsphänotyp wurde in einem Blindtest ausgewertet, wobei die larvalen Hemisphären in zwei Gruppen unterteilt wurden: entweder sind mehr als ~50% der PRA am Durchwachsen der Lamina, bzw. der Hyperinnervierung der Medulla beteiligt, oder weniger als ~50%.



**Abb. 24: Verstärkung des retinalen Wegfindungsdefekts in *not<sup>1</sup>;l(3)73Ai/Df(3L)W4*.** **24A)** Retinaler Projektionsphänotyp der *nonstop* Mutante (für Beschreibung, siehe Abb. 12B). Maßstab: 50 µm. **24B)** In der Doppelmutante *not<sup>1</sup>;l(3)73Ai/Df(3L)W4* ist eine Verstärkung der Störungen des axonalen Projektionsmusters zu erkennen: Die Struktur der Lamina (La) ist fast vollständig aufgehoben, da die Hyperinnervierung der Medulla (Me) im Vergleich zur *nonstop* Mutante um ein dreifaches verstärkt ist. (Bw: Bolwig Nerv; posteriore Ansicht; dorsal oben, Maßstab: 50 µm).

Aus diesen Ergebnissen läßt sich schließen, daß durch die Reduktion der Proteasomenaktivität in einem mutanten *nonstop* Hintergrund sowohl die Letalität, als auch der retinale Wegfindungsphänotyp verstärkt werden. Zusammen mit den Sequenzdaten und den Ergebnissen des Anti-Ubiquitinwesterns bestätigt die genetische Interaktion die Funktion von *nonstop* als UBP innerhalb des proteasomabhängigen Proteindegradationssystems. Ferner könnte man schließen,

daß die Akkumulation von einem oder mehreren ubiquitinierten *nonstop* Substraten zu den präpupalen Phänotypen führt (siehe Diskussion).

### 4.3 Expressionsanalyse von *nonstop*

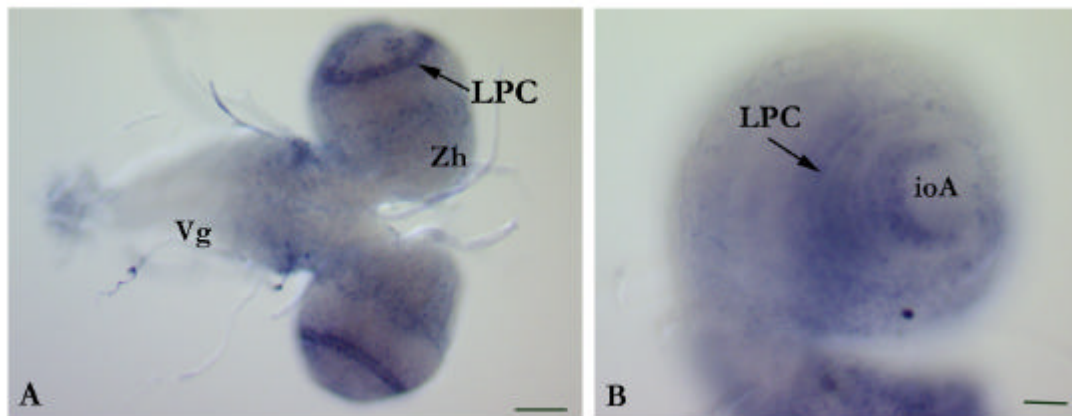
Nach den bisherigen Ergebnissen stellt sich die Frage, wo *nonstop* seine Funktion innerhalb des axonalen Wegfindungsprozesses ausübt. Die ersten Expressionsergebnisse des Entwicklungs-Northern Blots weisen bereits auf eine besondere Funktion des *not* Transkripts in der späten dritten Larve (L3; Abb. 19) hin. In diesem Stadium konnte ein starkes Signal detektiert werden, welches mit der Letalität der Mutante zu diesem Zeitpunkt in Verbindung stehen könnte. Ferner kommt es in L3, bzw. der frühen Puppe auch zu einer vollen Ausprägung des axonalen Projektionsphänotyps der Photorezeptoren. Um herauszufinden, ob das *not* Transkript innerhalb der PRA oder in den zu innervierenden Geweben lokalisiert sein muß, um auf die korrekte retinale Projektion der Photorezeptoren einzuwirken, wurden genetische Mosaikanalysen im Auge durchgeführt. Mit dieser Methode konnte gezeigt werden, daß die Genfunktion von *not* nicht in den Photorezeptoren selbst, sondern in deren Zielregion benötigt wird (Martin *et al.*, 1995).

Um im Folgenden die Expression des Gens zu charakterisieren, wurden verschiedene Ansätze gewählt: *in situ* Hybridisierungen, eine P-Elementtransformation mit einem *myc*-Epitop markierten *nonstop* Minigen und die Konstruktion einer *nonstop*-GAL4 Linie. Im Zusammenhang mit den durch die Expressionsversuche erhaltenen Daten, wurde auch eine spezifische Rettung des retinalen *nonstop* Phänotyps angestrebt.

#### 4.3.1 *in situ* Hybridisierung

Die *in situ* Hybridisierungen von *nonstop* wurden an präpupalen Gehirnhemisphären und Augenscheiben durchgeführt. Die präparationsmikroskopische Auswertung erlaubt Aussagen über die Lokalisation des *nonstop* Transkripts in diesem kritischen Entwicklungsstadium (Abb. 25).





**Abb. 25: *in situ* Analyse der *nonstop* Mutante.** Die larvalen Hemisphären wurden mit einer cRNA Sonde geprobt. **25A)** In der Übersicht ist die Färbung des Kortex des Zentralhirns und der Thorakalganglien, bzw. die starke Expression von *not* in den Laminavorläuferzellen (LPC) zu sehen. Vg: Ventralganglion, Zh: Zentralhirn (anterior ist links; Maßstab: 50  $\mu$ m) **25B)** Die Vergrößerung zeigt nochmals die positiven Signale der LPC und der inneren optischen Anlage (ioA). Laterale Ansicht; Maßstab: 20  $\mu$ m.

In Abbildung 25A fällt die relativ starke Expression von *not* in den Laminavorläuferzellen (LPC) auf, welche, in differenzierter Form, die Zielregion für R1-R6 darstellen. Diese Expression könnte in engem Zusammenhang mit dem mutanten *nonstop* Projektionsmuster der PRAs stehen und stimmt mit den Ergebnissen der genetischen Mosaikanalysen überein, da sich zudem keine Expression in den Augenscheiben detektieren ließ. Interessanterweise ergab sich bei der histologischen Analyse des Markers Dachshund keine Störungen innerhalb der frühen Laminaentwicklung (siehe Abb. 13). Das *nonstop* Gen scheint also nicht an der Differenzierung der neuronalen Zielregionzellen beteiligt zu sein.

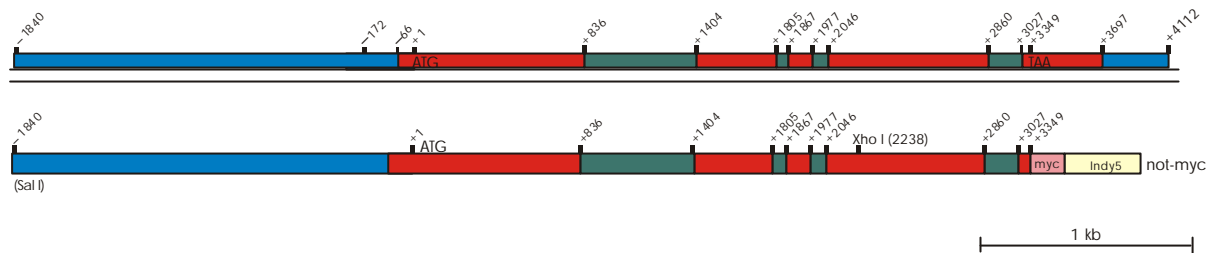
Weiterhin ist eine schwache Expression der *not* mRNA im Kortex des Zentralhirns und der Thorakalganglien sichtbar (Abb. 25A) Betrachtet man das visuelle System in der Vergrößerung (Abb. 25B), so zeigt sich neben den LPC, ein positives Signal innerhalb des U-förmigen Zentrums der inneren optischen Anlage, aus welcher Zellen des Lobulakomplexes und der proximalen Medulla hervorgehen (Meinertzhagen und Hanson, 1993). Martin *et al.* (1995) konnten zeigen, daß die Lobulaentwicklung in *not* Mutanten verzögert ist, ein Prozeß, der aber nicht mit der retinalen Projektion in Verbindung steht.

#### 4.3.2 Das Transgen P[*not-myc*]: molekulare und histologische Charakterisierung

Um weitere Informationen über das Nonstop Protein zu erhalten, sollte eine P-Elementtransformation mit einem Konstrukt durchgeführt werden, welches die gesamte Promotorregion von *nonstop* enthält und dadurch in seinem Expressionsmuster der Expression

und Lokalisation des endogenen Proteins entsprechen sollte. Das Konstrukt enthält ein *c-myc* Epitop, welches mit Hilfe einer Anti-*myc*-Färbungen nachgewiesen werden kann.

Für das Minigenkonstrukt P[*not-myc*] wurde eine artifizielle SalI Schnittstelle, 2 kb *upstream* des Startkodons und die interne XhoI Schnittstelle in Exon 4 (2238 bp) benutzt, um die gesamte genomische 5' Region von *nonstop* in den Transformationsvektor pIndy5, welcher ein *c-myc* Epitop enthält, zu klonieren (Abb. 26).

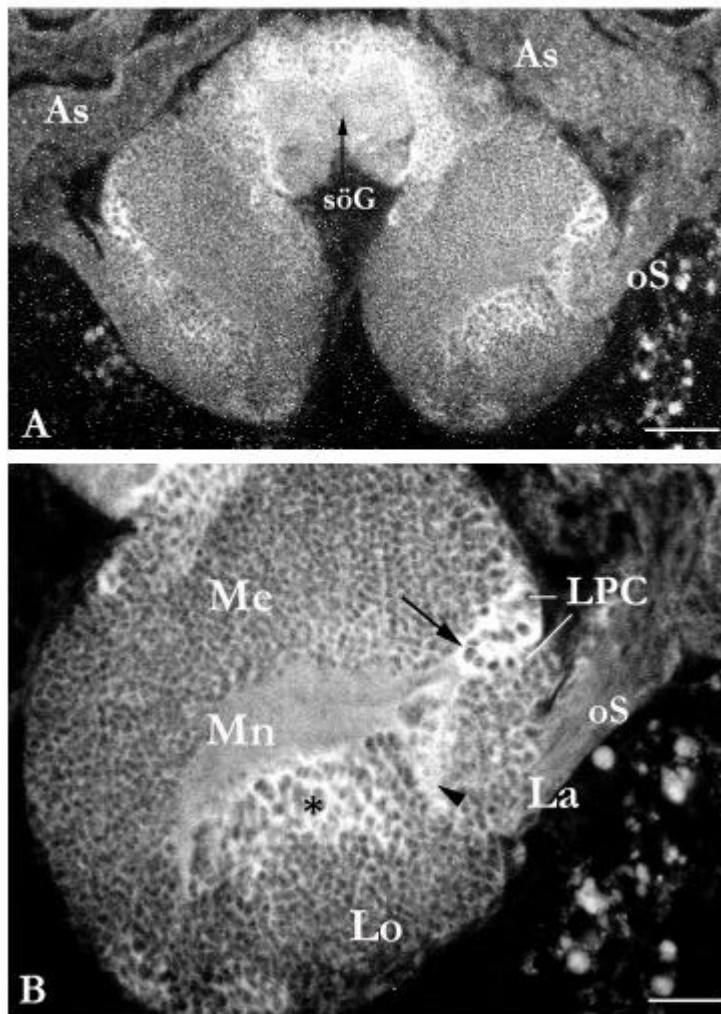


**Abb. 26: Schema der genomischen *nonstop* Region und des P[*not-myc*] Konstrukts.** Die Daten zu der genomischen *nonstop* Region wurden bereits in Abb. 17 und 18A erklärt. Für die Klonierungsstrategie: siehe Text. *myc* bezieht sich auf das *c-myc* Epitop, das für 11 aa kodiert. *Indy5* ist ein Transformationsvektor, der auf dem bereits erwähnten CaSpeR Vektor basiert.

Mit Hilfe von PCR wurde das 3' Ende, ausgehend von XhoI bis zu dem modifizierten Stopkodon in ein offenes Leseraster mit dem *c-myc*-Epitop prozessiert. Um die Funktionalität des Minigens zu überprüfen, wurden zunächst Fliegenstämme mit stabil integrierten P-Elementen etabliert und Rettungsversuche wie unter III.2.4. beschrieben, durchgeführt (Tabelle 8). Das Konstrukt P[*not-myc*]<sup>1911</sup> auf dem zweiten Chromosom konnte in 100% die Letalität von *not*<sup>1</sup> und *not*<sup>2</sup> retten und zu 90.6% den retinalen Projektionsphänotyp von *not*<sup>1</sup>. Im Folgenden wurde mit P[*not-myc*]<sup>1911</sup> die histologische Expressionsanalyse durchgeführt.

Genotyp	Anzahl der getesteten Hemisphären	Anzahl (%) eines wildtypischen Projektionsmusters
P[ <i>not-myc</i> ] <sup>717</sup> ; <i>not</i> <sup>1</sup>	77	62 (80.5)
P[ <i>not-myc</i> ] <sup>1911</sup> ; <i>not</i> <sup>1</sup>	64	58 (90.6)

**Tab. 8: Ergebnisse des Rescue Experiments mit dem *not-myc* Konstrukt.** Zwei unabhängige Insertionslinien des transformierten Minigens wurden getestet.



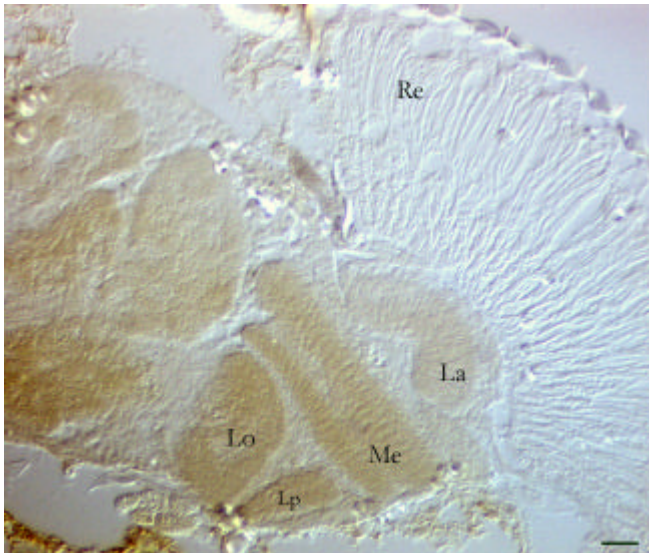
**Abb. 27: Expression des P[*not-myc*]<sup>191</sup> Konstrukts in präpupalen Hemisphären.**

**27A)** Der horizontale Schnitt durch das Gehirn einer weißen Puppe zeigt im Überblick eine starke Expression von *nonstop* im Kortex des subösophagealen Ganglions (söG) und der optischen Loben. In den Augenscheiben (As) wurde keine Färbung detektiert. oS: optischer Stiel. Maßstab: 50  $\mu$ m.

**27B)** In einer Vergrößerung desselben Schnitts ist zu sehen, daß *nonstop* verstärkt in den Laminavorläuferzellen (LPC; weiße Balken) innerhalb der Laminafurche (schwarzer Pfeil) in Gliazellen der Lamina (Pfeilspitzen) und einer Gruppe von Lobulazellen (Stern) exprimiert wird. Maßstab: 20  $\mu$ m.

Die Anti-*myc* Färbung zeigt eine zytoplasmatische Lokalisation von NONSTOP im Kortex des subösophagealen Ganglions (Abb. 27A) und der optischen Loben (Abb. 27B). Eine starke Expression fällt in den Laminavorläuferzellen auf (LPC, Abb. 27B). Die Expression ist auf die Zellen in der Laminafurche beschränkt, d.h. sobald die LPC aus der LF austreten und differenzieren, ist keine Färbung mehr zu detektieren. Nonstop wird auch verstärkt innerhalb der Laminagliazellen und einer Gruppe von Lobulazellen exprimiert. Von Poeck *et al.*, 2001 konnte gezeigt werden, daß die Lokalisation der *nonstop* Expression innerhalb der Gliazellen für den axonalen Wegfindungsphänotyp relevant ist. In der Diskussion wird dieser Zusammenhang näher erläutert werden.

In adulten Kopfpräparaten zeigte sich eine Expression des Minigens innerhalb des Neuropils (Abb. 28). Diese Lokalisation könnte eine andere Funktion des *nonstop* Proteins widerspiegeln als in der dritten Larve, bzw. frühen Puppe. Dieselben Färbungen konnten mit einem spezifischen Peptid-Antikörper gegen NONSTOP erzielt werden (Abb. 36).

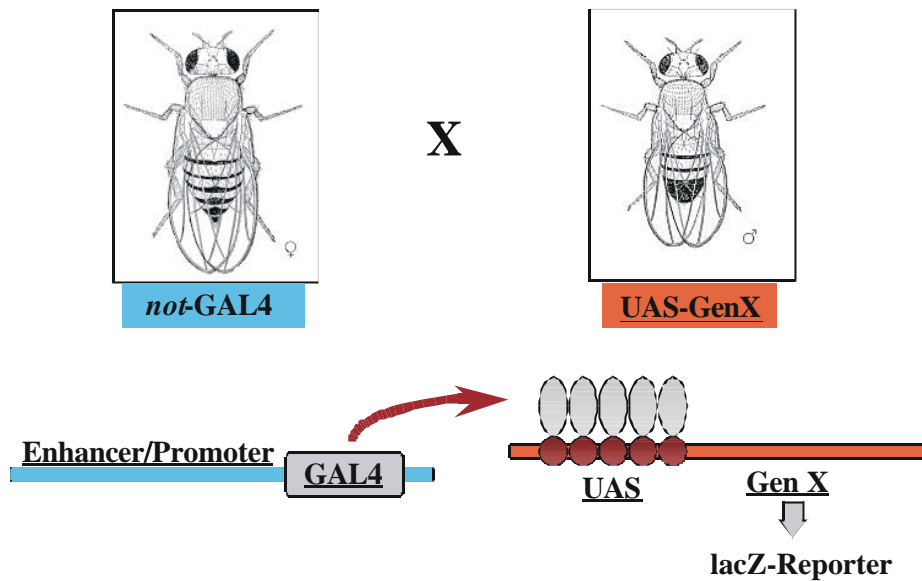


**Abb. 28: Expression des P[not-myc]<sup>1911</sup> Konstrukts im optischen Lobus.** Die Anti-myc Färbungen zeigen eine einheitliche Expression des Minigens im Neuropil des optischen Systems: Lamina (La), Medulla (Me) Lobula (Lo) und Lobulaplatte (Lp). In der Retina (Re) war kein positives Signal zu dedektieren. Maßstab: 50  $\mu$ m.

Kein positives Signal konnte in den Augenscheiben nachgewiesen werden (Abb. 27A). Diese Ergebnisse stimmen mit den *in situ* Hybridisierungen überein und lassen eine Funktion von *not* in der Zielregion der PRA, genauer, der Lamina vermuten.

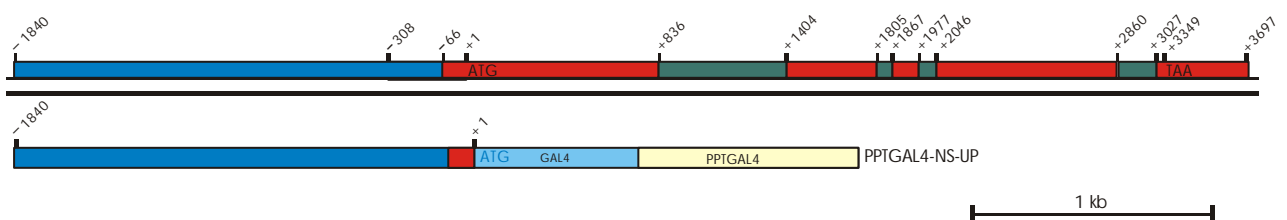
#### 4.3.3 Das *nonstop* GAL4 Konstrukt

Das GAL4-UAS System ist eine effiziente Methode, um ein Gen unter der Kontrolle eines spezifischen Promotors zu exprimieren (Brand und Perrimon, 1993). In *Drosophila* wird dieser Ansatz genutzt, um das Expressionsmuster eines Gens zu studieren, oder um das Gen ganz spezifisch in einem bestimmten Gewebe zu exprimieren, z.B. im Zusammenhang mit der Durchführung eines Rescue Experiments (siehe III.4). Die Expression des Transkriptionsfaktors GAL4 der Hefe wird unter dem Promotor/Enhancer eines bekannten Gens in einem für das Transkript spezifischen Muster induziert. GAL4 wiederum verursacht die Transkription eines GAL4-abhängigen (UAS) Zielgens in eben diesem Muster. Ein wichtiges Merkmal des GAL4 Systems ist die Trennung der beiden Elemente, des GAL4 Gens und des UAS Zielgens, in zwei verschiedene transgene Fliegenlinien. Nur wenn die GAL4 Linie, die sogenannte Treiberlinie, zu einer Linie, die ein Zielgen X unter UAS Kontrolle enthält, gekreuzt wird, kann spezifisch die Expression von X erfolgen. Diese Expression ist normalerweise äußerst Zell- bzw. Gewebespezifisch. Unser Ziel war es eine *nonstop* spezifische GAL4 Treiberlinie herzustellen, welche die Promoter/Enhancer Region von *nonstop* enthält (Abb. 29). Kreuzt man *not*-GAL4 transgene Fliegenstämme mit einem UAS-lacZ Reporter Gen, sollte der Reporter in einem für *nonstop* spezifischen Muster exprimiert werden.  $\beta$ -Galactosidase Färbungen sollten die histologischen Ergebnisse der *in situ* Experimente und der transgenen P[not-myc]<sup>1911</sup> Linie bestätigen.



**Abb. 29: Schematische Darstellung des GAL4-UAS Systems.** In dem *not-GAL4* Stamm wird der Transkriptionsfaktor GAL4 durch die *nonstop* spezifische Enhancer und Promotoregion exprimiert. Kreuzt man diese Linie, mit einem Stamm, in welchem ein beliebiges Gen X, z.B. ein lacZ Reporter gen unter der Kontrolle einer *upstream activating sequence* (UAS) steht, so aktiviert GAL4 die Transkription von Gen X, hier lacZ, in einem *nonstop* spezifischen Expressionsmuster (Das Schema wurde freundlicherweise von Dr. R. Stanewsky zur Verfügung gestellt).

Zunächst wurde die gleiche nicht kodierende 5' Region von *nonstop*, die schon das Minigen enthielt, in einen GAL4 Vektor (pPTGAL4) kloniert und stabile transgene Stämme etabliert (pPTGAL4-NS-UP; Abb. 30). In 12 unabhängigen Insertionslinien konnte jedoch nach Einkreuzen eines UAS-lacZ Reporters keine Expression detektiert werden. Lediglich eine äußerst schwache Färbung des Ventralganglions war in 2 von 16 untersuchten larvalen Präparaten der Linie pPTGAL4[NS-UP]<sup>40-1</sup> zu beobachten (Daten nicht gezeigt).



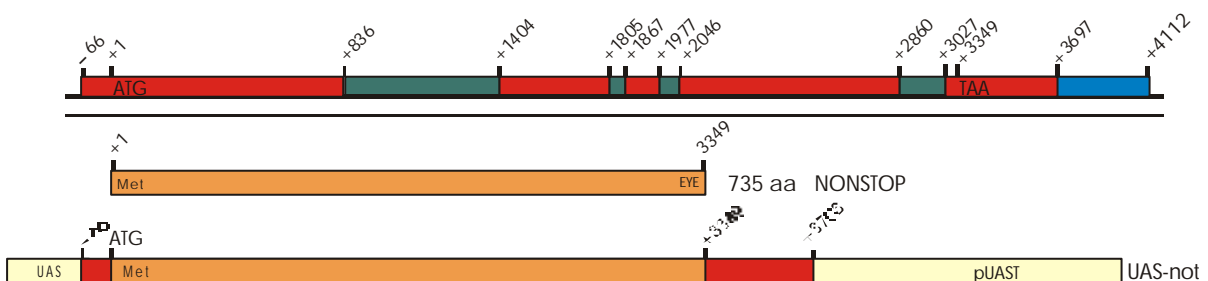
**Abb. 30: Schematische Darstellung der genomischen *nonstop* Region und der pPTGAL4 Konstrukte.** Für die genomische *nonstop* Region: siehe Abb. 18A. Das Konstrukt pPTGAL4-NS-UP enthält eine 1.8 kb Region (NS-UP) upstream von *nonstop*. Das in blau markierte ATG des GAL4-Transkriptionsfaktors wurde mit der Promotor/Enhancer Region von *nonstop* in ein offenes Leseraster kloniert. Weder die Sequenz des Transkriptionsfaktors GAL4, noch die des pPTGAL4 Vektors entsprechen der realen Größe.

Auf Grund der mangelnden lacZ Expression, lag die Vermutung nahe, daß nicht alle nötigen regulatorischen Einheiten des *nonstop* Gens erfasst wurden. Es ist bekannt, daß Enhancer

Elemente eines Gens eine variable Position zum Promotor einnehmen können, d.h. auch *downstream* desselben liegen können. Auch können Enhancersequenzen in einem Intron enthalten sein, wie z.B. bei *eyeless (ey)*, dem Drosophila Homolog des PAX-6 Gens (Hauck *et al.*, 1999). Um die Ergebnisse der *in situ* Hybridisierung, bzw. des *not-myc* Epitops zu reproduzieren, wären weitere *nonstop* GAL4 Konstrukte nötig, welche z.B. intronische Elemente oder die kodierende Region umfassen.

#### 4.4 Versuch einer spezifischen Rettung des *nonstop* Phänotyps

Die eigentlich interessante Expression von *not* liegt wie schon erwähnt in den Laminavorläuferzellen, bzw. Laminagliazellen, da diese in direkter Verbindung mit den einwachsenden Photorezeptoren stehen. Es ist jedoch nicht klar, ob es sich in diesem Bereich bei der *nonstop* Mutante um eine mangelnde Expression des Transkripts in neuronalen oder glialen Zellen handelt, welche den axonalen Projektionsphänotyp verursacht. In diesem Zusammenhang wurde wieder mit Hilfe des GAL4-UAS Systems ein Zelltyp-spezifischer *Rescue* versucht. Das Konstrukt für die P-Elementtransformation enthält die pcNS-XE cDNA in einen Vektor, welcher eine UAS Sequenz enthält (Abb. 31).



**Abb. 31: Schematische Darstellung der genomischen *nonstop* Region und des UAS-*not* Konstrukts.** Für die genomische *nonstop* Region: siehe Abb. 17 und 18A. In orange ist das Nonstop Protein (735 aa) angegeben. Das UAS-*not* Konstrukt setzt sich aus der gesamten kodierenden Region und der 66 bp *upstream* Region zusammen (rot eingezeichnet). Am 3' Ende wurden weitere 354 bp in den pUAST Vektor kloniert (rot gekennzeichnet). 5' zum ORF von *nonstop* liegt die UAS Sequenz des Vektors. Die gelbe Vektorregion von pUAST entspricht nicht der Originalgröße.

Die Expression von *not* ist also nur in solchen Zellen möglich, in welchen der Transkriptionsfaktor GAL4 exprimiert wird (siehe Abb. 29). Für das visuelle System stehen verschiedenste GAL4 Linien zur Verfügung. Theoretisch sollte die Expression von UAS-*not* mit einer spezifischen glialen GAL4 Linie oder einem neuronalen Laminatreiber Aufschluß über die Funktionalität von *nonstop* innerhalb der Lamina geben. Die vollständige Ausführung dieses

Experiments war leider nicht möglich, da das UAS-*not* Konstrukt in einem mutanten homozygoten *not* Hintergrund bereits die Letalität und den retinalen Projektionsphänotyp aufheben konnte, ohne daß eine spezifische Treiberlinie eingekreuzt werden mußte. Diese Rettung scheint von einem minimalen Hitzeschockpromotor, welcher in dem Vektor pUAST enthalten ist, auszugehen. Betrachtet man die Hitzeschockergebnisse (III.2.4.), bei welchen eine Rettung des *nonstop* Phänotyps bereits bei Raumtemperatur, d.h. ohne Einsatz des Hitzeschockpromotors möglich war, so scheint es sich im allgemeinen bei *nonstop* um ein Gen zu handeln, das seine Funktion bereits bei minimaler Expression ausübt.

#### **4.5 Gewinnung eines Peptid-Antikörpers gegen das Nonstop Protein**

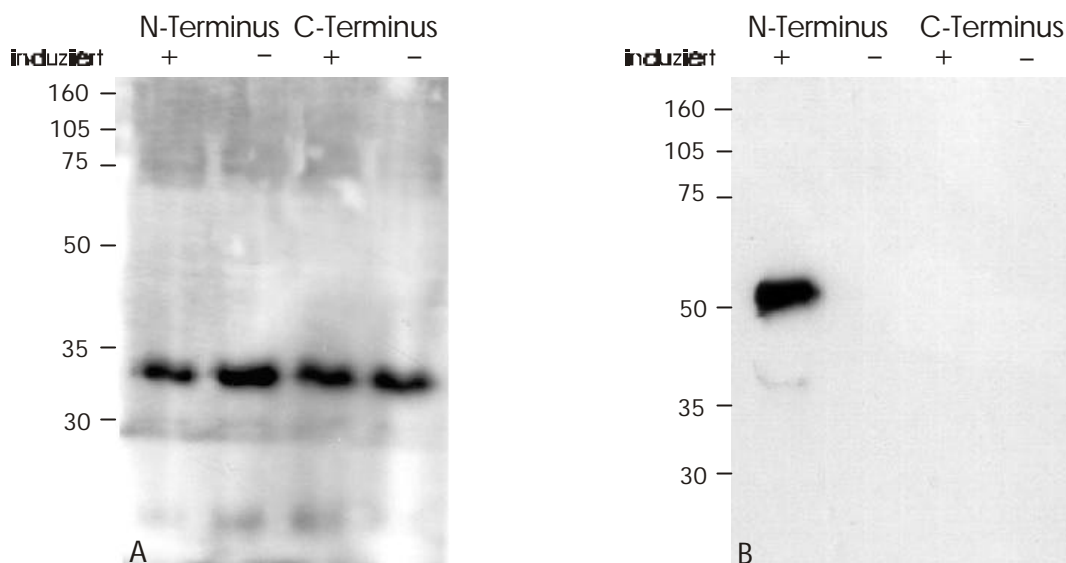
Unser Ziel war es einen Antikörper gegen NONSTOP herzustellen, mit welchem sowohl auf Immunoblots als auch in der Immunhistologie ein spezifischer Nachweis des Proteins möglich ist. Ferner könnte eine Immunopräzipitation als Ansatz für die Isolierung eines potentiellen Interaktionspartners dienen. Zunächst mußte eine Epitopanalyse von NONSTOP erstellt werden, um relevante Sequenzbereiche für die Gewinnung eines Peptidantikörpers zu ermitteln. Die Charakterisierung antigener Abschnitte innerhalb des Gens und die Peptidgewinnung wurde vom *Pineda Antikörper Service* übernommen. Die Peptid-Antikörper sind jeweils gegen eine Aminosäuresequenz innerhalb des N-Terminus und eine innerhalb des C-Terminus gerichtet (Abb 32, gelb hinterlegte Sequenzen).

MFQYSYIRKIPMPTSEYDFATGHTDSCLLP~~THMRACVCVC~~  
 VQCEIETRKASEKSQKF~~TKKKPNYFQ~~NAARRRTAKVAKI  
 RRKQRKCDKAFVPLQSSAKRAKTKENSVD~~SNTSVFSSSS~~  
 SSSGRSFGRGTERWAVGAEAGRGTAE~~NETLAVAAAAATTT~~  
 NAGRFITADLIKT~~VNSDKQRDRVAKGHRDTKN~~PLDATKNL  
 RLS~~DCLRTVQKLAI~~ELESADAGSDASAQANASAD~~SSAVM~~  
 SETGCRHYQSYVKEHSY~~DTFRVIDAYFAACVNRDARERKA~~  
IHCNCFEGCSYGIQLYACLHCIYFGCRGAHITSHLRSKKH  
NVALELSHGTYCYACRDFIYDARSREYALINRKLEAKDL  
QKSIGWVPWVPTTKETNLLLANARRRLVRPNQTIGLRGLL  
NLGATCFMNCIVQALVHTPLLSDYFMSDRHDCGSKSSHKC  
LVCEVSRLFQEFYSGSRSPLSLHRLHLIWNHAKHLAGYE  
QQDAHEFFIATLDVLRHRCVKA~~KAEHESKSNSSGSGS~~GTN  
SSNSSSSHCYGCNCIIDQIFTGMLQSDVVCQACNGVSTT  
YDPFWDISLDLGETTTHGGVTPKTLIDCLERYTRAEHLGS  
AAKIKCSTCKSYQESTKQFSLRTLPSVVSFHLKRFEHSAL  
IDRKISSFIQFPVEFDMTPFMSEKKNAYGDFRFSLYAVVN  
HVGTIDTGHYTAYVRHQKDTWVKCDDHVITMASLKQVLDS  
EGYLLFYHKNVLEYE

**Abb. 32: Analyse des Nonstop Proteins zur Gewinnung eines spezifischen Peptidantikörpers.** Gezeigt ist das vollständige Nonstop Protein (735 aa). Gelb hinterlegt sind im N- und C-Terminus die jeweiligen Epitope, welche für die Anti-Peptid Antikörpergewinnung benutzt wurden. Der N-terminale Anteil von NONSTOP, welcher in den Expressionsvektor subkloniert wurde ist in fetter Schrift gekennzeichnet, der C-terminale Teil unterstrichen hervorgehoben. Die beiden Subklone überlappen über 265 Aminosäuren hinweg.

Je zwei Kaninchen wurden mit den beiden Peptiden immunisiert, wobei im Folgenden nur das Kaninchen-Anti Peptid Serum des Tieres 1 gegen den N-Terminus (T1P5) exemplarisch diskutiert werden soll. An Hand von rekombinantem Nonstop Protein konnten die Antiseren mittels Western Blot Analyse auf ihre Spezifität getestet werden. Dazu wurde ein N-terminaler und ein C-terminaler Teil von *nonstop* so in einen prokaryontischen Expressionsvektor (pQE) kloniert, daß sie mit einem Histidintag fusionieren. Abbildung 33 zeigt die Spezifität des affinitätsgereinigten Peptidantikörpers, T1P5, 120 Tage nach der Immunisierung (Abb. 33B) im Vergleich zum Präimmunserum (Abb. 33A).





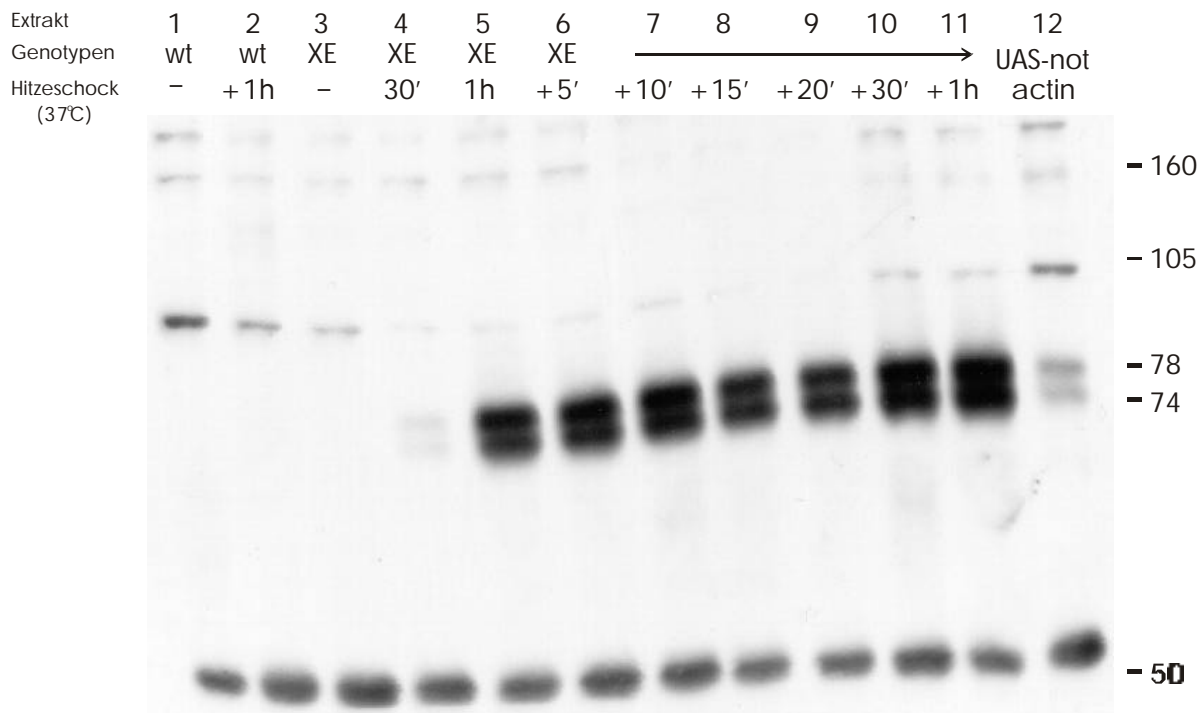
**Abb. 33: Western Blot Analyse des Peptid-Antikörpers T1P5. 33A)** Das Präimmenserum des Antikörpers wurde als Kontrolle in einer Verdünnung von 1:500 getestet. N- und C-Terminus (siehe: Abb. 27) wurden in den Proteinexpressionsvektor pQE kloniert und die Expression des jeweiligen Proteinanteils durch IPTG induziert (+). Als Kontrolle wurde auch eine nicht induzierte Fraktion aufgetragen (-). Das Präimmenserum von T1P5 zeigt eine unspezifische Kreuzreaktion bei ~34 kD. **33B)** Die gleichen induzierten (+) und nicht induzierten (-) Fraktionen wie in 33A wurden mit dem affinitätsgereinigten Serum T1P5, 120 Tage nach der Immunisierung getestet. Das Serum erkennt im induzierten N-terminalen Extrakt eine Bande bei ~52 kD, welche dem induzierten N-Terminus von NONSTOP entspricht (theoretische Größe: 55 kD).

Das Serum erkennt in einer Verdünnung von 1:10.000 eine Bande bei ~52 kD (Abb. 33B), welche dem N-Terminuspeptid entspricht (55 kD). Die Membran wurde gewaschen und erneut mit einem monoklonalen Antikörper, der gegen das Histidin-Epitop gerichtet ist, geprobt. Wiederum erhält man eine Bande bei ~52 kD, welche dem rekombinanten N-Terminus mit Histidintag entspricht (Daten nicht gezeigt). Das Serum identifiziert also spezifisch den rekombinanten N-Terminus des Nonstop Proteins. Dieses Ergebnis konnte mit dem Serum des Tier 2 gegen den N-Terminus reproduziert werden; auch die beiden Kaninchen Anti-Peptid Seren gegen den C-Terminus erkennen spezifisch das C-terminale Peptid von NONSTOP bei 54 kD (Daten nicht gezeigt).

#### 4.5.1 Immunoblotanalyse von NONSTOP

Das Serum sollte als nächstes in Immunoblotexperimenten auf seine Spezifität und Sensivität gegen das Nonstop Protein der Fliege überprüft werden. Dazu wurden Proteinextrakte verschiedener Genotypen auf ein SDS-Gel aufgetragen, geblottet und mit dem Serum T1P5 geprobt. Zunächst wurde versucht, NONSTOP in Wildtypfliegen nachzuweisen. Für Nonstop ist theoretisch ein positives Signal bei 82 kD zu erwarten. Wie aus Abbildung 34 (Spur 1) ersichtlich wird, konnte kein endogenes Protein in diesem Größenbereich detektiert werden. Die positiven

Signale in Spur 1 entsprechen NONSTOP nicht in ihrer Größe und können daher als unspezifische Kreuzreaktionen betrachtet werden.



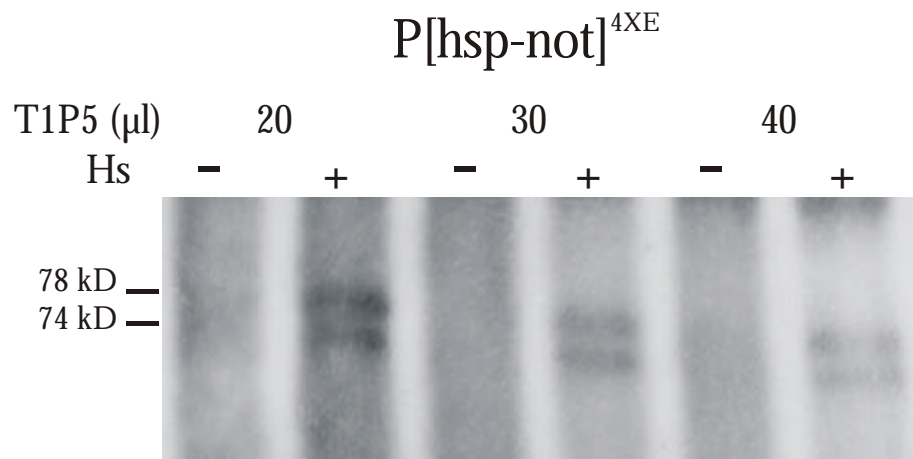
**Abb. 34: Western Blot Analyse verschiedener Genotypen, bzw. Hitzeschockbedingungen geprobt mit dem Serum T1P5.** Aufgetragen wurden jeweils Extrakte 10 adulter Köpfe pro Genotyp. Weder im Wildtyp (wt -), noch im nicht induzierten Hitzeschockkonstrukt  $P[hsp-not]^{4XE}$  (XE -) kann endogenes Nonstop Protein detektiert werden. Setzt man die Fliegen 30' einem 37°C Hitzeschock aus, so beginnt in XE Tieren eine leichte Expression des Proteins, das in einer Doppelbande (74 kD und 78 kD) nachweisbar ist. Die Expression wird nach 1h Hitzeschock, bzw. 5', 10', etc. nach dem Hitzeschock, (+5', +10' etc.) stärker. Das Signal stellt keine unspezifische Kreuzreaktion, die durch Hitzeschock induziert wird dar, da keine Bande derselben Größe in der wildtypischen Fraktion, welche 1h nach einem einstündigen Hitzeschock prozessiert wurde (+1h), zu sehen ist. Im ubiquitär exprimierte UAS-*nonstop* Konstrukt (UAS-*not*/*actin*-GAL4) lässt sich NOT, bzw. die Doppelbande ebenfalls nachweisen. Die Kreuzreaktion bei 51 kD stellt eine interne Ladekontrolle dar. Die gleichmäßig stark exprimierte Bande in allen Spuren weist darauf hin, daß jeweils gleich viel Fliegenextrakt geladen wurde. Verdünnung des Peptid-Serums (1:1000).

Mit Hilfe von Hitzeschock, bzw. dem UAS-GAL4 System wurde NONSTOP in allen weiteren Proben ektopisch exprimiert. Für die Gewinnung der Extrakte 4-11 wurde die Expression des Proteins in der transgenen Linie  $P[hsp-not]^{4XE}$  (Abb. 34; XE) durch einen einstündigen Hitzeschock (37°C) induziert. Die ersten Tiere wurden noch während des Hitzeschocks entnommen und prozessiert (30', 1h); alle weiteren Extrakte entstanden nach fünf, zehn, etc. Minuten (+5', +10', etc), zu einem Zeitpunkt, zu dem die Fliegen bereits wieder bei Raumtemperatur gehalten wurden. Spur 3 stellt die nicht induzierte Kontrolle dar (XE -). Das Hitzeschockexperiment mit dem induzierten *hsp-not*-XE Konstrukten führt bereits nach einer halben Stunde (30') zu einem positiven Signal bei 74 kD und 78 kD. Überraschenderweise erhält man eine Doppelbande, welche später noch kurz diskutiert werden soll. Weder das nicht induzierte XE Konstrukt (Spur 3), noch die Wildtypkontrolle (n.1h), die unter den gleichen

Bedingungen wie *hsp-not-XE* (n.1h) prozessiert wurde, führten zu einem Signal gleicher Größe. Es handelt sich bei dieser Doppelbande also um das ektopische Nonstop Protein. Dieselbe positive Reaktion kann mit dem UAS-*not* Konstrukt erzielt werden, bei welchem es mittels einer eingekreuzten *actin-GAL4* Linie (Ito *et al.*, 1997) zur Überexpression von *nonstop* kommt. Die ubiquitär ektopische Expression von *nonstop* (UAS-*not/actin-GAL4*) stimmt mit dem Bandenpaar des *hsp-not-XE* Konstrukts überein, wobei der Hitzeschock eine weit stärkere Expression des Proteins verursacht, als die genetisch induzierte Überexpression. Das Serum T1P5 erkennt also spezifisch das Nonstop Protein, wenn es ektopisch exprimiert wird. Nicht zu detektieren war das endogene Protein in wildtypischen Extrakten. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß die Menge an exprimiertem Protein unter der Nachweisgrenze des Immunoblots liegt.

#### 4.5.2 Immunopräzipitation von NONSTOP mit T1P5

Mit dem Serum T1P5 wurde im Anschluß Immunopräzipitation durchgeführt, eine Methode, die eine Anreicherung, und somit einen spezifischeren Nachweis des Proteins erlaubt. Die Immunopräzipitation wurde nach Lee *et al.*, 1998 in modifizierter Form (siehe Material und Methoden) durchgeführt. Hierzu wurde ein Hitzeschock Extrakt der Linie P[*hsp-not*]<sup>4XE</sup> mit Protein A Agarose inkubiert und das Nonstop Protein nach Zugabe von T1P5 an die Sepharose gebunden. In einer anschließenden Western Blot Analyse zeigt sich wiederum eine Doppelbande bei 74 kD und 78 kD, während das nicht induzierte P[*hsp-not*]<sup>4XE</sup> Konstrukt in der Kontrolle zu keinem positiven Signal führte (Abb. 35). Bei einer Nullkontrolle wurde die Präzipitation ohne Fliegenextrakt durchgeführt, um sicherzustellen, daß das Signal keine Kreuzreaktion der im Extrakt vorhandenen Immunglobulinketten darstellt; die Detektion der Doppelbande in diesem Extrakt war nicht möglich (Daten nicht gezeigt).

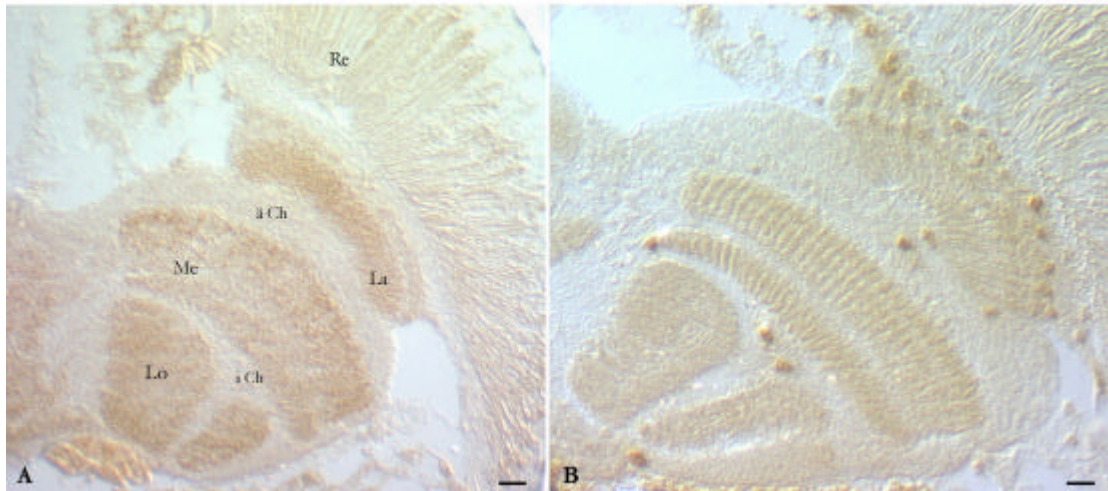


**Abb. 35: Immunopräzipitation von NONSTOP.** Es wurde von Hitzeschock induzierten (Hs +) und nicht induzierten (Hs -) P[hsp-not]<sup>4XE</sup> Fliegen jeweils 50 Köpfe für die Immunopräzipitation prozessiert. Die Extrakte wurde mit verschiedenen Mengen Serum (T1P5; µl) inkubiert. Immunopräzipitiertes NONSTOP kann wiederum als Doppelbande bei 74 kD und 78 kD detektiert werden.

Ausgehend von diesem Ergebnis lassen sich weitere Immunoblotanalysen durchführen, welche z.B. eine Aussage über die Doppelbande ermöglichen würden. Mit einem Phosphatase Assay an immunopräzipitiertem NONSTOP könnte z.B. gezeigt werden, ob es sich bei der größeren der beiden Banden um eine mögliche phosphorylierte Form von Nonstop handelt. Es wäre auch denkbar, mit Hilfe dieses Ansatzes Koimmunopräzipitationen durchzuführen, welche eventuell die Isolierung eines oder mehrerer potentieller NONSTOP Substrate ermöglichen.

#### 4.5.3 Immunohistochemische Analyse mit dem Serum T1P5

Um die Ergebnisse der Expressionsanalysen zu bestätigen, bzw. das Serum auf seine Spezifität im Gewebe zu überprüfen, wurde T1P5 an larvalen Ganzhirnpräparaten getestet. Bei dieser Versuchsdurchführung zeigte sich leider, daß es mit dem Serum zu keiner Färbung kommt. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß der Antikörper nicht in das Gewebe eines Ganzhirnpräparates zu penetrieren vermag. Daher wurde die Analyse auf adulte Gefierschnitte verlegt, um einen Nachweis für exprimiertes Nonstop Protein *in vivo* zu ermöglichen. In Abbildung 36A ist eine einheitliche Expression im Neuropil wildtypischer Fliegen zu erkennen.



**Abb. 36: Immunohistochemie an adulten Gefrierschnitten mit T1P5. 36A)** In wildtypischem Gewebe ist eine einheitliche Neuropilfärbung zu erkennen. Re: Retina, La: Lamina, ä Ch: äußeres Chiasma, Me: Medulla, Lo: Lobula, i Ch: inneres Chiasma. Maßstab: 30  $\mu\text{m}$ . **36B)** Die ectopische Expression von NONSTOP mit einer Gliazell-spezifischen Linie (*lco-Gal4*; Granderath *et al.*, 1999) führt zu einem positiven Signal in Gliazellen der Lamina und des äußeren, bzw. inneren Chiasmata. Maßstab: 50  $\mu\text{m}$ .

Dieses Expressionsmuster stimmt mit den Ergebnissen des *myc*-markierten Minigens  $P[not-myc]^{1911}$  (Abb. 28) überein. Auch hier erhielt man bei adulten Kopfpräparaten ein positives Signal in den optischen Ganglien, der Lamina, Medulla und Lobula. Wie bereits erwähnt wurde, könnte die Lokalisation von NONSTOP im Neuropil eine andere Funktion des Proteins widerspiegeln, als in der dritten Larve. Um auszuschließen, daß es sich bei der Neuropilfärbung um ein Artefakt handelt, müßte eine Negativkontrolle an adulten Köpfen durchgeführt werden. Dies ist jedoch nicht möglich, da die *nonstop* Mutante in der frühen Puppe letal ist. Daher wurde ein weiterer Ansatz gewählt, um zu zeigen, daß das Serum T1P5 NONSTOP immunohistochemisch spezifisch identifiziert. Obwohl bekannt ist, daß *nonstop* im larvalen Stadium in Gliazellen exprimiert wird, zeigen Färbungen an wildtypischen adulten Köpfen kein Signal in glialen Zellen (Abb. 36A). Daher war es möglich, *nonstop* mit Hilfe des UAS-GAL4 Systems ectopisch mit einer Gliazell-spezifischen Linie (*lco-GAL4*; Granderath *et al.*, 1999) zu exprimieren. Wie in Abbildung 36B zu sehen ist, kann mit dem Serum T1P5, neben der endogenen Expression im Neuropil, auch die ectopische Expression von NONSTOP in vereinzelt Gliazellen im Laminakortex und im äußeren und inneren Chiasma nachgewiesen werden. Es ist also möglich mit T1P5 NONSTOP ectopisch zu erkennen, und somit die Spezifität des Peptid-Antiköpers zu zeigen.

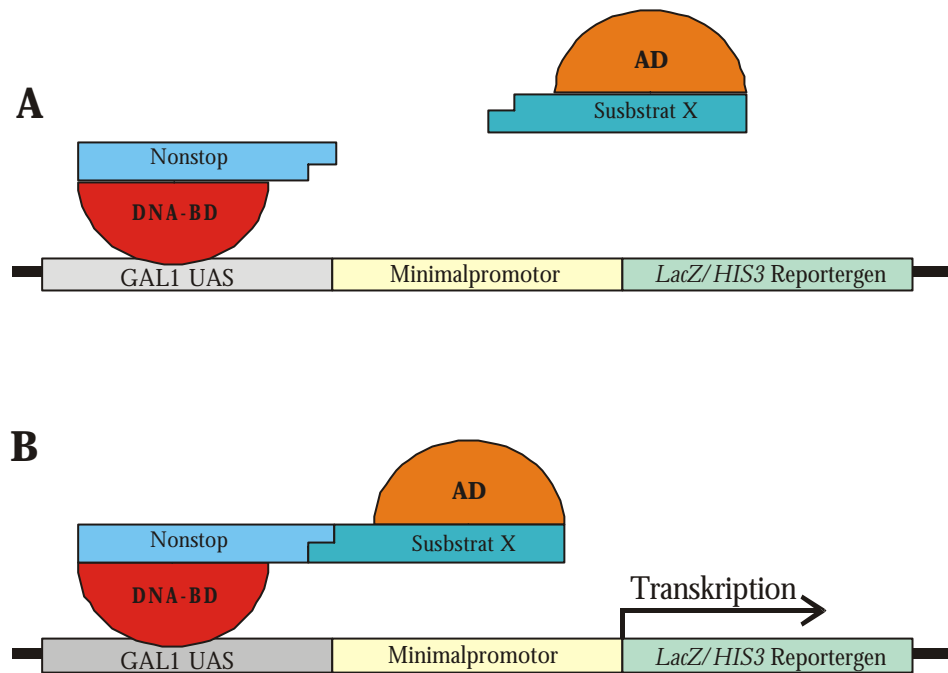
## 4.6 Das Two Hybrid System – Identifizierung spezifischer Interaktionspartner von NONSTOP

### 4.6.1 Allgemeines zum Two Hybrid System

Das Yeast Two Hybrid System stellt innerhalb der Molekularbiologie eine wichtige Methode für die Identifizierung spezifischer Protein-Proteininteraktionen dar. Der Ansatz basierte zunächst auf der Tatsache, daß sich viele der eukaryontischen Transkriptionsfaktoren aus Untereinheiten zusammensetzen, welche in Struktur und Funktion unabhängig voneinander sind; d.h. in vielen dieser Transkriptionsregulatoren findet man eine DNA-bindende Domäne (DNA-BD), welche mit spezifischen Enhancersequenzen interagiert und eine oder mehrere sogenannte Aktivierungsdomänen (AD), die den RNA Polymerase II Komplex zur Transkription der jeweiligen *downstream* des Promotors gelegenen Gene rekrutieren.

### 4.6.2 Das GAL4 Two Hybrid System

Das in dieser Dissertation angewandte Two Hybrid System beruht auf dem GAL4-UAS System der Hefe und soll im Folgenden kurz beschrieben werden. Das GAL4 Protein von *S. cerevisiae* besitzt im nativen Zustand die oben beschriebenen Domänen: Eine DNA-BD, welche mit der *upstream activation site* (UAS) in Verbindung tritt und eine AD, die mit Komponenten der Transkriptionsmaschinerie interagiert (Keegan *et al.*, 1986; Hope und Struhl, 1986). Trennt man die beiden Untereinheiten physikalisch voneinander, exprimiert sie aber gemeinsam in einer Zelle, so findet keine Transkription des unter UAS Kontrolle stehenden Gens statt. Werden die beiden Domänen jedoch durch eine Interaktion der fusionierten Hybridproteine wieder in Kontakt gebracht, so ist die vollständige Aktivität des Transkriptionsfaktors wiederhergestellt. Abbildung 37 zeigt schematisch, wie dieser Ansatz im Zusammenhang mit *nonstop* für die Identifizierung eines potentiellen Interaktionspartners angewandt wurde.



**Abb. 37: Schematische Übersicht über das GAL4-UAS Two Hybrid System. 37A)** Das Nonstop Hybridprotein bindet über die fusionierte DNA-Bindungsdomäne (DNA-BD) an die *upstream activation sequence* GAL1 UAS der entsprechenden Reportergene, kann aber ohne die Aktivierungsdomäne (AD) keine Transkription initiieren. **37B)** Bindet ein potentieller NONSTOP Interaktionspartner (Substrat X), so entsteht ein funktionsfähiger Transkriptionsfaktor (GAL4), welcher zur Aktivierung der Transkription der Reportergene LacZ und HIS3 (im Text erklärt) führt.

Verschiedene *nonstop* Konstrukte wurden mit der DNA Bindungsdomäne fusioniert und jeweils mit zwei *Drosophila* cDNA Bibliotheken, die mit der Aktivierungsdomäne in den sogenannten *fish* Vektor (pACT2) kloniert wurden, in Hefezellen koexprimiert. Theoretisch sollte aus einer positiven Interaktion zwischen NONSTOP und einem Protein der Bibliothek ein funktioneller Transkriptionsfaktor entstehen, welcher die Transkription beliebiger Reportergene, die unter UAS Kontrolle stehen, initiieren sollte. Im Folgenden ist es möglich einen, oder mehrere erfolgreiche Interaktionspartner an Hand der transkribierten Markergene zu isolieren. Das GAL4 MATCHMAKER System stellt zwei Reportergene, die unter der Kontrolle einer UAS Sequenz stehen zur Verfügung: einen lacZ Reporter, welcher nach einer positiven Interaktion zu einer Blaufärbung der jeweiligen Zellen führt (Blautest; siehe: MATCHMAKER User Manual Kapitel VI.C) und den HIS3 Selektionsmarker. Dieser Marker basiert auf Wachstumsselektion, die nach der Kotransfektion der Hefezellen mit den beiden rekombinanten Hybridproteinen durchgeführt wird: Der Vektor, welcher für die DNA-BD kodiert (pAS2-1) enthält das TRP1 Gen, der AD-Vektor (pACT2) ein LEU2 Gen. Transfiziert man Hefestämme, die bezüglich dieser beiden Aminosäuren nicht auxotroph sind erfolgreich mit pAS2-1 und pACT2, so sollte auf einem Minimalmedium (-Trp/-Leu) trotzdem ein Wachstum der Zellen möglich sein. Kommt es darüber hinaus zu einer funktionellen Interaktion der Hybridproteine, wird der Reporter HIS3

transkribiert und theoretisch sollten nur positive Interaktionsklone auf einem -Trp/-Leu/-His Minimalmedium sichtbar werden.

#### 4.6.3 Die rekombinanten *nonstop* Konstrukte

Für die Ausführung des Two Hybrid Screens wurden vier verschiedene *nonstop* cDNA Konstrukte in den pAS2-1 Vektor kloniert. Für das Konstrukt NOT-Wildtyp wurde direktional ein Fragment aus der cDNA pcNS-XE entnommen, welches das komplette 3' Ende umfasst und 5' Ende mit dem dritten ATG bei 405 bp (siehe Abb. 17) in den Transformationsvektor subkloniert wurde. Dieses Konstrukt rettet, wie schon unter III.2.4. erwähnt, die Letalität zu 100%, den retinalen Phänotyp zu 76%.

Da theoretisch die Möglichkeit besteht, daß die Expression von *nonstop* auf Grund seiner Funktion zur Deubiquitinierung essentieller Proteine in der Hefe führt und dadurch mit der Funktionalität des Systems interferiert, wurde ein mutantes Konstrukt hergestellt. Papa und Hochstrasser (1993) konnten zeigen, daß eine Mutation des konservierten Cysteins die Proteaseaktivität einer Hefe UBP aufhebt. Auch in *fat facet*, einer Drosophila Ubiquitinprotease führt der Austausch von Cystein gegen Serin zu einem nicht funktionellen Enzym (Huang *et al.*, 1995). Über PCR wurde innerhalb der NONSTOP Cystein Domäne eine Punktmutation gesetzt, welche zu einer Inaktivierung des aktiven Zentrums führen sollte, da Cystein zu Arginin umgewandelt wurde. Die Sequenzen am 5' und 3' Ende stimmen mit dem NOT-Wildtyp Konstrukt überein.

Um ferner auszuschließen, daß innerhalb des Hybridproteins ein potentieller Interaktionsbereich von *nonstop* auf Grund von Proteinfaltung stereotypisch gestört wird, wurde das Protein in zwei Peptide getrennt. Ein offenes Leseraster des N-Terminus und des C-Terminus wurde in den pAS2-1 Vektor kloniert (Aminosäuresequenz: siehe Abb. 32). Um zu zeigen, daß es zu einer Expression der beiden Peptide kommt, wurden die jeweiligen Sequenzanteile in den bereits erwähnten Expressionsvektor pQE kloniert (III.2.7.4). Nach drei stündiger IPTG Induktion ergab sich sowohl für den N-Terminus bei 55 kD, als auch für den C-Terminus bei 54 kD ein positives Signal auf einem Anti-Histidin Western Blot, welches jeweils den beiden Peptiden entspricht (Daten nicht gezeigt).

Alle vier Konstrukte wurden in den Hefestamm Y190 transformiert. Dieser Stamm enthält die Reportergene HIS3 und lacZ, ist defizient für die Aminosäuren TRP und LEU und besitzt außerdem eine Cycloheximidresistenz. Nach einer Transformation mit pAS2-1 und dem



jeweiligem Insert, sollte es zu einem Hefezellwachstum auf einem –Trp Minimalmedium kommen. Y190 konnte mit allen Konstrukten erfolgreich transformiert werden. Zur Kontrolle wurden transfizierte Hefezellen auch auf einem –Trp/-Leu Medium ausgestrichen; hier fand jedoch, wie zu erwarten, kein Wachstum statt. Ferner wurden die entsprechenden Kontrolltransformationen, welche im MATCHMAKER Protokoll angegeben sind, durchgeführt.

#### 4.6.4 Kotransformation der *nonstop* Konstrukte mit einer adulten und einer embryonalen Drosophila cDNA Bibliothek – der Two Hybrid Screen

Nachdem der Hefestamm Y190 mit den entsprechenden Vektoren transfiziert wurde, erfolgte die Kotransformation mit verschiedenen Drosophila cDNA Bibliotheken, welche potentielle Interaktionspartner von *nonstop* enthalten sollten. Es standen zwei Bibliotheken zur Verfügung: eine adulte Kopf- und eine embryonale Bibliothek. Die Durchführung der Kontrformationen erfolgte wie in MATCHMAKER User Manual angegeben (siehe auch Material und Methoden). Nach 10 Tagen waren die ersten potentiellen positiven Klone sichtbar, welche zunächst erneut auf dem entsprechenden Minimalmedium (-Leu/-Trp/-His) ausgestrichen wurden. Wuchsen die vereinzelt Kolonien erneut heran, so wurde der Test auf lacZ Expression durchgeführt (Blautest), welcher erlaubt die Kolonien zu identifizieren, in welchen eine Interaktion zwischen *nonstop* und einem Hybridprotein der Bibliothek stattgefunden hat. Es wurden jeweils zwei Blautests durchgeführt und nur Klone, die in beiden Experimenten ein positives Signal gaben weiter prozessiert (In die Auswertung wurden auch die Klone eingeschlossen, die nur eine schwache Färbung zeigten). Tabelle 9 gibt eine Übersicht über die durchgeführten Transformationen und die potentiellen positiven Klone, welche in den folgenden Kapiteln näher diskutiert werden.

DNA-BD Konstrukt in pAS2-1	Adulte cDNA Kopfbibliothek in pACT2 (Transformationsrate)	Embryonale cDNA Bibliothek in pACT2 (Transformationsrate)
NOT-Wildtyp	3 Klone ( $4.1 \times 10^6$ )	15 Klone ( $0.5 \times 10^6$ )
NOT-Mutante	1 Klon ( $7.7 \times 10^6$ )	3 Klone ( $8.9 \times 10^6$ )
NOT-N-Terminus	n.d.	n.d.
NOT-C-Terminus	10 Klone ( $5 \times 10^6$ )	2 Klone ( $1.9 \times 10^6$ )

**Tab. 9: Übersicht über die durchgeführten Kotransformationen.** Es wurden vier verschiedene *nonstop* Konstrukte sowohl mit einer adulten, als auch einer embryonalen cDNA Bibliothek kotransformiert. Die jeweiligen positiven Klone sind mit den entsprechenden Transformationsraten des Screens angegeben (n.d.: nicht durchgeführt).

Um Aufschluß über die cDNA Klone, die eventuelle Interaktionspartner von *nonstop* darstellen, zu bekommen, wurde das pACT2 Plasmid mit dem jeweiligen Insert der Bibliothek isoliert, in *E.coli* Zellen transformiert und nach Standardmethoden bis zur Sequenzierung weitergeführt. In den folgenden Tabellen sind die positiven Klone unter den verschiedenen *nonstop* Konstrukten, die jeweils als *bait* Vektoren benutzt werden, angegeben. Mit dem N-Terminus konnte keine Kotransformation durchgeführt werden, da sich Y190 Zellen mit diesem Konstrukt unter verschiedensten Versuchsbedingungen zwar auf Platten, aber nicht in der für die Transformation notwendigen Flüssigmedien kultivieren lassen.

<b>NOT-Wildtyp</b>			
<b>Klon</b>	<b>Sequenzergebnis</b>	<b>Blautest</b>	<b>Sequenz in frame</b>
Adulte Kopfbibliothek			
2.2	Mitochondriales 16S ribosomales RNA Gen	schwach	-
12.1	RpS20; ribosomales Protein	+	-
14.1	Histon Deacetylase dHDAC3	+	-
Embryonale Bibliothek			
38.3	rpa1; mRNA für ein Ribosomales Protein	schwach	-
39.1	Ribosomales Protein RpL27a	+	-
39.2	CG11642	schwach	-
39.4	Rp122	+	-
40.2	CG13176	+	-
41.3	Tropomyosin I gen, Exons 2-5	+	-
43.1	CG10603	+	-
43.2	Ribosomales Protein S3a	+	-
43.3	CG5789; organischer Anionentransporter	+	+
44.1	CG8295	+	-
44.2	mRNA für ein Rab5 Protein	+	-
44.4	CG15081	+	-
45.1	CG4026	schwach	-
45.3	60S ribosomales Protein L29	+	-
46.2	CG9047	+	-

NOT-Mutante			
Klon	Sequenzergebnis	Blautest	Sequenz in frame
Adulte Kopfbibliothek			
9.1	Histon H2A	+	-
Embryonale Bibliothek			
3.2	CG1780, Idgf4	+	+
4.2	Proteinkinase POLO	+	+
15.1	NAD-abhängige Methylentetrahydrofolat Dehydrogenase	+	-

NOT -C-Terminus			
Klon	Sequenzergebnis	Blautest	Sequenz in frame
Adulte Kopfbibliothek			
6.1	40S ribosomales Protein S14	+	-
17.1	60S ribosomales Protein L11	+	+
19.1	Alkohol Dehydrogenase	+	-
15.1	60S ribosomales Protein L11	schwach	-
24.1	40S ribosomales Protein S14	schwach	+
33.1	ATP Synthase A Kette	schwach	-
39.1	Caudal	+	-
45.1	Adenosin Kinase	+	-
46.1	60S ribosomales Protein L11	+	+
47.1	NADH-Ubiquinone Oxidasereduktase Kette 5	schwach	-
Embryonale Bibliothek			
43.1	CG2791	+	-

**Tab. 10: Auflistung der positiven Two Hybrid Klone.** In den Tabellen ist in der ersten Zeile das jeweilige *nonstop* Konstrukt, das mit der DNA-GAL4 Bindungsdomäne fusioniert wurde, angegeben. Die Klone wurden unterteilt, je nach cDNA Bibliothek, aus der sie isoliert wurden. Die gelb hinterlegten Zeilen sollen die Klone, deren cDNA mit der Sequenz der Aktivierungsdomäne *in frame* ist, hervorheben.

Für beide cDNA Bibliotheken konnten mit dem wildtypischen, mutanten und C-terminalen Konstrukt Klone isoliert werden, welche sowohl auf dem Selektionsmedium -Trp/-Leu/-His ein deutliches Wachstum zeigten, als auch durch die Transkription des lacZ Reporters (wie oben beschrieben) bei wiederholten Blautests ein positives Signal gaben. Bei diesen Klonen, sollte es also zu einer Interaktion zwischen dem Hybridprotein NONSTOP/DNA-GAL4-

Bindungsdomäne und dem Substrat, das mit der Aktivierungsdomäne fusioniert wurde, gekommen sein (Abb. 36). Nach der Sequenzierung der 33 potentiellen Kandidaten, zeigte sich, daß die cDNA von 6 Klonen *in frame* mit der Sequenz der Aktivierungsdomäne vorliegt (Tabelle 10: gelb markierte Klone). Warum es bei den weiteren Klonen trotzdem zu einer scheinbar funktionellen Interaktion gekommen ist, läßt sich eventuell dadurch erklären, daß es in fast allen Fällen zu einer Translation kurzer Peptidstücke kommt, welchen eine unspezifische Bindung an NONSTOP oder die DNA-Bindungsdomäne möglich ist. Diese Klone wurden als falsche Positive klassifiziert.

Betrachtet man die Sequenzdaten im Überblick, so fällt eine große Anzahl an cDNAs auf, welche für ribosomale Proteine kodieren, von denen jedoch nur drei *in frame* sind: Klon 17.1 und 46.1 kodieren für ein 60S, Klon 42.1 für ein 40S ribosomales Protein (Tabelle 10). Obwohl diese ribosomalen Proteine potentielle Interaktionspartner von NONSTOP darstellen, muß die Interaktion noch weitläufig verifiziert werden. Ein weiteres Two Hybrid Experiment, bei welchem *nonstop* gezielt mit einem der ribosomalen Proteine kotransformiert und getestet wird, würde weitere Informationen über die Spezifität der Interaktion geben. Um die Interaktion auf genetischer Ebene zu überprüfen, müßten ribosomale Protein Mutanten oder Defizienzen, welche die jeweilige Region aufdecken mit *nonstop* gekreuzt werden. Läßt sich bei den Nachkommen, welche eine Mutationen in beiden Genen besitzen, z.B. eine Verstärkung oder Abschwächung der *nonstop* Phänotypen beobachten, wäre dies ein erster Hinweis auf eine Interaktion *in vivo*. Es ist jedoch auch möglich, daß es sich bei diesen drei Klonen nicht um wirkliche Interaktionspartner von *nonstop*, sondern um falsche Positive handelt, welche, wie die acht weiteren ribosomalen Protein cDNAs, die nicht *in frame* mit der Aktivierungsdomäne vorliegen, unspezifisch mit NONSTOP oder der DNA Bindungsdomäne interagieren.

43.3, 3.2 und 4.2. stellen die anderen drei Klone *in frame* dar, welche mit einem wildtypischen und mutanten NONSTOP Konstrukt aus der embryonalen cDNA Bibliothek isoliert wurden (Tabelle 10): Ein organischer Anionentransporter, der Imaginalscheiben Wachstumsfaktor 4 (*imaginal disc growth factor 4*, *Idgf4*) und die Proteinkinase *Pola*. Für den Anionentransporter ist bis jetzt nur bekannt, daß er den Transport kleiner Moleküle über die Plasmamembran hinweg reguliert. *Idgf4* gehört einer neuen Familie von Wachstumsfaktoren an, welche für die Proliferation, Polarisation and die Motilität der Zellen innerhalb der Imaginalscheiben verantwortlich sind (Kawamura *et al.*, 1999) und die Proteinkinase *Polo* reguliert die Chromosomenkondensation während der Mitose (Llamazares, 1991). Wie bereits erwähnt, müßten diese Gene, bzw. ihre mögliche genetische Interaktion mit *nonstop* noch intensiver untersucht werden.

Grundsätzlich wäre zu erwarten, einen echten Interaktionspartner mehrmalig aus einer Bibliothek zu isolieren. Bei den sechs verschiedenen Two Hybrid Ansätzen mit den zwei cDNA Bibliotheken, trat keiner der cDNA Klone, vorallem nicht der Klone *in frame*, öfters auf. Dies deutet darauf hin, daß wir es bei dem Anionentransporter, *Idgf4* und *Polo* vermutlich nicht mit Proteinen zu tun haben, welche mit NONSTOP *in vivo* funktionell interagieren.

Eine mögliche Erklärung für die geringe Effizienz bei der Isolierung eines potentiellen Interaktionspartners von *nonstop* könnte auf die Notwendigkeit der Ubiquitinierung der Substrate zurückzuführen sein. Es wäre möglich, daß das potentielle Substrat für *nonstop* für eine funktionelle Interaktion, in einer ubiquitinierten Form vorliegen muß. Das System der Hefe stellt eventuell nicht die adequate Ubiquitinierung bereit und für die Ubiquitin spezifische Protease *nonstop* wäre es daher nicht möglich mit einem, oder mehreren Substraten zu interagieren.

## **5 Diskussion**

Im Rahmen dieser Arbeit soll ein Beitrag zum Verständnis der axonalen Wegfindungsmechanismen im optischen System von *Drosophila melanogaster* geleistet werden. Die Entwicklung der Photorezeptoren ist bereits gut verstanden, bzw. beschrieben (siehe Einleitung; Wolff und Ready, 1993; Dickson und Hafen 1993) und gewährleistet die Grundlage für neue Fragestellungen bezüglich der retinalen Projektion in ihre Zielregion. In den letzten Jahren wurden bei *Drosophila* ungerichtete Mutagenesen im visuellen System durchgeführt, um Moleküle zu identifizieren, welche bei der axonalen Wegfindung eine Rolle spielen. Die Charakterisierung dieser Mutanten auf molekularer Ebene erlaubt erste Aussagen über Zusammenhänge und mögliche Singaltransduktionsvorgänge, welche eine korrekte, retinotopie Verschaltung der Axone mit der Zielregion ermöglichen.

In der vorliegenden Dissertation wurde eine umfassende histologische, genetische und molekulare Analyse der axonalen Wegfindungsmutante *nonstop* vorgelegt. Im Folgenden sollen die Ergebnisse unter verschiedenen Aspekten diskutiert werden, und die möglichen Funktionen von *nonstop* innerhalb der axonalen Wegfindung bzw. Zielerkennung der Photorezeptoren erläutert werden.

## 5.1 Die axonale Wegfindungsmutante *nonstop*

Die EMS induzierte *nonstop* Mutante (*not*<sup>1</sup>) entstammt einer Mutagenese, welche mit dem Ziel durchgeführt wurde, Gene zu isolieren, die am gerichteten Einwachsen und Verschalten der Photorezeptoraxone (PRA) in die optischen Loben beteiligt sind (Martin *et al.*, 1995). Das Gen konnte in 75C 1-4 kartiert und drei P-Element induzierte Allele (*not*<sup>2</sup>, *not*<sup>3</sup>, *not*<sup>4</sup>) isoliert werden, welche in der genomischen *nonstop* Region inserieren und *not*<sup>1</sup> nicht komplementieren. Alle Allele sind präpupal letal und zeigen embryonal keinen sichtbaren Wegfindungsphänotyp, weder im peripheren, noch zentralen Nervensystem (Daten nicht gezeigt). Erst in der späten dritten Larve, also dann, wenn die axonale Projektion der Photorezeptoren weitgehend abgeschlossen ist, weist die Mutante drastische Störungen bei der Laminaterminierung von R1-R6 auf. Ein Großteil dieser PRA scheint ein potentielles Stoppsignal im ersten optischen Ganglion, der eigentlichen Zielregion, nicht zu erkennen und zieht in die Medulla weiter. Diese Hyperinnervierung der Medulla führt zu einer lückenhaften Laminastruktur und einer unregelmäßigen Anhäufung dickerer Axonfaszikel in der Medulla. Um auszuschließen, daß es sich nicht um Störungen beim Auswachsen von R1-R6 handelt, d.h. daß die lückenhafte Lamina nicht auf ein Fehlen von Axonen zurückzuführen ist, wurde die retinale Projektion in der *not* Mutante mit einem

spezifischen Marker für R1-R6 untersucht. Es zeigte sich, daß R1-R6 vollständig in die Lamina einwachsen, ein Großteil dann aber anstatt dort zu terminieren, in die Medulla weiterzieht (Poeck *et al.*, 2001). Es wäre denkbar, daß die Morphogenese der Zielregion selbst gestört ist und dadurch eine korrekte Innervierung von R1-R6 verhindert wird. Untersucht man jedoch die Differenzierung der Laminaneuronen, so sind keine Abweichungen vom Wildtyp festzustellen (Abb. 13). Das Gen ist daher nicht an der Entwicklung der Laminaneurone selbst beteiligt, sondern scheint spezifisch auf die korrekte Terminierung der PRA einzuwirken. Grundsätzlich wäre es möglich, daß NONSTOP in den Photorezeptoren, der Zielregion oder innerhalb beider Strukturen benötigt wird. Wie später noch diskutiert wird, übt NONSTOP seine Funktion in der Zielregion von R1-R6 aus. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es sich bei *nonstop* um eine spezifische axonale Wegfindungsmutante handelt, deren weitere Analyse zum allgemeinen Verständnis der vielfältigen Mechanismen, die an der retinalen Projektion der Photorezeptoren beteiligt sind, beiträgt.

Die Klonierung der genomischen *nonstop* Region und die Erstellung einer vollständigen Exon-Intron Struktur war mit Hilfe eines P1-Phagen und der molekularen Charakterisierung der P-Elementlinien möglich (Genbank: AF179590). Die vollständige *nonstop* cDNA (2626bp) kodiert für ein 735 aa großes Protein. Aus den Daten verschiedener Sequenzvergleiche ergab sich, daß *nonstop* für eine Protease kodiert, welche für die Deubiquitinierung Ubiquitin gebundener Proteine verantwortlich ist. Die P-Elementlinien *not<sup>2</sup>* und *not<sup>4</sup>* stellen wahrscheinlich funktionelle Nullallele dar, da die P-Elemente jeweils im ersten Exon inserieren. Es wäre möglich, daß bei diesen Stämmen eine verkürzte Form von NONSTOP vorliegt, welche aber auf Grund der fehlenden aktiven Domäne der Protease im C-terminalen Bereich keine Funktion ausüben kann. Die Insertion von *not<sup>3</sup>* im ersten Intron verhindert vermutlich das korrekte Prozessieren des *not* Gens selbst. Aus der Entwicklungs-Northern Blot Analyse wurde ersichtlich, daß nur eine Spliceform von *nonstop* vorliegt und das 2.7 kb Transkript in allen Entwicklungsstadien exprimiert wird (Abb. 19). Die starke Expression von *not* im dritten Larvenstadium könnte im Zusammenhang mit der Letalität der Mutante zu diesem Zeitpunkt stehen. Tatsächlich zeigen *in situ* Hybridisierungen und die histologische Analyse des *myc* markierten *not* Minigens, daß *nonstop* auch im Kortex des Zentralhirns und im subösophagealen Ganglion exprimiert wird (Abb. 25A; Abb. 27A). Dies zeigt, daß NONSTOP außerhalb des visuellen Systems essentielle Funktionen auszuüben scheint und daß es daher in der *not* Mutante zu drastischen Störungen im Organismus kommt, die zum Abbruch der Ontogenese führen. Die Lebensfähigkeit der *nonstop* Mutanten bis zum späten dritten larvalen Stadium kann durch die maternale Kontribution erklärt werden. Die *nonstop* mRNA, die in frühen Embryonen (Abb. 19; 0-3 Stunden) detektiert werden kann, wird von



maternalen Seite zur Verfügung gestellt. Diese Menge an *nonstop* Transkript scheint für eine Entwicklung bis in das dritte Larvenstadium ausreichend zu sein.

Die Phänotypen der *nonstop* Mutante konnten durch ein transgenes Konstrukt, bei welchem die Expression der *not* cDNA durch einen Hitzeschockpromotor induziert wird, revertiert werden (*Rescue* Experimente). Die Rettung der Letalität und der Projektionsstörungen der PRA war ohne Hitzeschockbedingungen bereits bei 18°C möglich. Auch die Revertierung des axonalen Wegfindungsphänotyps mit einem UAS-*not* Transgen konnte ohne die Verwendung einer GAL4-Linie durchgeführt werden; d.h. in diesem Fall war die Expression von *nonstop* durch einen minimalen Hitzeschockpromotor im UAS Konstrukt ausreichend. Daher war es uns nicht möglich mit Hilfe des GAL4-UAS Systems ein Gewebe- oder Zelltyp spezifisches *Rescue* Experiment durchzuführen. Zusammen zeigen diese Ergebnisse, daß prinzipiell nur eine geringfügige Menge des Proteins benötigt wird, um Lebensfähigkeit und die korrekte Innervierung der Lamina durch R1-R6 zu gewährleisten. Diese Annahme wird durch die Immunoblot- und Histologieanalysen unterstützt. Mit einem NONSTOP spezifischen Antiserum sollte das Protein in adulten Fliegen nachgewiesen werden. Zwar war es möglich rekombinantes NOT Peptid in *E. coli* (Abb. 33B) und ektopisch exprimiertes Nonstop Protein in *Drosophila* zu detektieren, nicht aber die endogene Form in wildtypischen Kopffextrakten adulter Fliegen (Abb. 34). Auch bei dem Versuch, NONSTOP auf dem Westernblot bei Extrakten wildtypischer dritter Larve nachzuweisen, konnte kein positives Signal detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Vermutlich liegt die Menge an exprimiertem Protein unter der Nachweisgrenze des Immunoblots, d.h. wie schon bei den *Rescue* Experimenten erläutert wurde, haben wir es mit einem Protein zu tun, das nur in minimalem Level exprimiert zu werden scheint. Diese geringfügige Expression erschwerte vermutlich auch die histologische Analyse larvaler Ganzhirnpräparate mit dem NONSTOP Antiserum; in der Tat konnte keine Färbung innerhalb des optischen Systems, des Zentralhirns oder der subösophagealen Ganglien erzielt werden, Regionen, wo *nonstop*, wie bereits diskutiert wurde, exprimiert wird. Es ist nicht auszuschließen, daß das Antiserum nicht in das Gewebe einzudringen vermag.

## 5.2 Die Funktion von *nonstop* wird in der Zielregion benötigt

In der Einleitung wurde bereits eine Gruppe von Mutanten erwähnt, welche alle in der dritten Larve eine der *nonstop* Mutante ähnliche Störung im Projektionsmuster zeigen: Die Photorezeptoren R1-R6 innervieren die Medulla, anstelle der Lamina. Während jedoch fast alle der jeweilig betroffenen Genprodukte im Wachstumskegel aktiv sind, scheint NONSTOP seine

Funktion in der Zielregion von R1-R6 auszuüben. Erste Hinweise dafür kommen von genetischen Mosaikanalysen. Hier werden in einem für die Mutation heterozygoten Hintergrund (*not<sup>1</sup>/TM6*) mutante homozygote Klone (*not<sup>1</sup>/not<sup>1</sup>*) im Auge produziert. Wird die Funktion eines Gens für die korrekte Projektion in den Photorezeptoren selbst benötigt, so sollten Axone des homozygot mutierten Klons Störungen bei der axonalen Wegfindung zeigen. In homozygot mutierten *not* Klonen war die Projektion der Photorezeptoreaxone in die optischen Loben jedoch wildtypisch. Dies deutet darauf hin, daß NONSTOP nicht innerhalb der Axone benötigt wird, sondern eher in der Zielregion funktionell ist. Expressionsstudien, wie die *in situ* Hybridisierungen und die Charakterisierung des *myc*-markierten *nonstop* Minigens bestätigen diese Annahme. In beiden Experimenten war an larvalen, bzw. präpupalen Ganzhirnpräparaten eine auffallend starke Expression in den Laminavorläuferzellen zu beobachten, welche die Zielregion für R1-R6 darstellen. Neben den neuronalen Zellen, zeigten die Anti-*myc* Färbungen auch eine Expression von NONSTOP in den Gliazellen der Lamina. In keiner der beiden Expressionsanalysen konnte das *nonstop* Produkt in den Augenscheiben dedektiert werden, ein Ergebnis, das mit den Mosaikexperimenten übereinstimmt: *nonstop* übt seine Funktion nicht in den PRA aus.

Auf Grund der ExpressionsErgebnisse könnte *nonstop* also entweder innerhalb der Neuronen oder der Gliazellen (oder beiden) auf die korrekte Terminierung von R1-R6 seinen Einfluß nehmen. Wie bereits in der Einleitung diskutiert wurde, erreichen die PRA das erste optische Ganglion noch vor der völligen Ausdifferenzierung der Laminavorläuferzellen (LPC). Die LPC sind zu diesem Zeitpunkt noch nicht dort lokalisiert, wo sie später mit den retinalen Axonen synaptische Verbindungen aufnehmen. Da die Laminavorläuferzellen für den Fortlauf ihrer Morphogenese die retinale Innervierung benötigen, wurde von Selleck und Steller (1991) die Vermutung angestellt, daß die LPC nicht gleichzeitig die korrekte Positionierung, bzw. Terminierung der retinalen Axone übernehmen können. Tatsächlich konnte gezeigt werden, daß es den Axonen R1-R6 trotz Abwesenheit der Laminaneuronen möglich ist, die Zielregion in einem wildtypischen Muster zu innervieren (Poeck *et al.*, 2001). Dies deutet darauf hin, daß es die glialen Zellen im ersten optischen Ganglion sind, welche aktiv auf die korrekte Innervierung der retinalen Axone einen Einfluß nehmen. Von den Gliazellen der Lamina ist bekannt, daß sie zwei glialen Anlagen am posterioren Ende der Lamina entstammen und unabhängig von der retinalen Projektion in die Laminavorläuferregion einwandern; diese Migration findet ca. 20 h vor der Innervierung der PRA statt, so daß zum Zeitpunkt des ersten Kontaktes der Wachstumskegel R1-R6 mit der Laminavorläuferregion, dort bereits gliale Zellen vorhanden sind (Selleck und Steller, 1991). Die Laminaglia könnte also als ein sogenannter *intermediate target* eine instruktive Aufgabe innerhalb des Zielzellfindungsprozesses der PRA übernehmen. An *Manduca sexta* wurde

die Rolle der Gliazellen bei der Entwicklung der antennalen Loben intensiv untersucht (Tolbert und Oland, 1989). Es stellte sich heraus, daß die einwachsenden sensorischen Axone auf bereits proliferierende Gliazellen treffen, welche sich an der Morphogenese der olfaktorischen Glomeruli beteiligen und für die Axone eine Zwischenstation darstellen, bevor diese mit den Neuronen des antennalen Lobus synaptischen Kontakt aufnehmen (Oland *et al.*, 1988; Oland und Tolbert, 1989). Auch wenn die Laminaglia in *Drosophila* in der dritten Larve zum Zeitpunkt der einwachsenden PRA noch nicht vollständig differenziert ist (Perez und Steller, 1996), könnten diese Zellen trotzdem bereits partiell funktionell sein. Aus dem Vertebratensystem ist bekannt, daß noch nicht vollständig differenzierte Zellen vom optischen Nerv zu einer vorläufigen Kontaktaufnahme benutzt werden, um später von dort aus eine korrekte Projektion in die Zielregion vorzunehmen (Silver und Rutishauser, 1984).

Histologische Untersuchungen zeigten, daß die retinalen Wachstumskegel der PRA zunächst mit der epithelialen und marginalen Laminaglia in Kontakt treten; diese beiden Gliazelltypen sind in der dritten Larve dort lokalisiert, wo die Photorezeptoren R1-R6 im Anschluß ihre synaptischen Verbindungen zu den Laminaneuronen aufnehmen (Winberg *et al.*, 1992; Perez und Steller, 1996). Eine offensichtliche Voraussetzung für die Gliazellen den PRA in diesem Zusammenhang als *intermediate target* zu dienen ist ein Auswandern aus den glialen Anlagen, bzw. die anschließende korrekte Positionierung in die Zielregion. In der *nonstop* Mutante konnte gezeigt werden, daß der Prozess der Migration und damit der Lokalisation eines Großteils der Laminagiazellen gestört ist (Poeck *et al.*, 2001). *Nonstop* scheint also direkt oder indirekt an der Progression der Gliazellen von der glialen Anlage aus in die Laminavorläuferregion beteiligt zu sein. Interessanterweise existiert in *Drosophila* eine Ubiquitin spezifische Protease, *Ubp-64*, welche indirekt an der Zellmigration während der Oogenese beteiligt ist; in diesem Fall stabilisiert das Enzym den Transkriptionsfaktor C/EBP (Rorth *et al.*, 2000). Es läßt sich eine gewisse Parallele zu den Abläufen, die in der *nonstop* Mutante stattfinden ziehen: Während ein Mangel an *Ubp-64* die Funktion eines Substrats unterbindet und damit auf die Zellwanderung Einfluß nimmt, so wird auch in der *nonstop* Mutante der Prozeß einer korrekten Migration von, in diesem Fall glialer, Zellen verhindert.

Während *nonstop* in der dritten Larve neben der glialen Expression auch im Zytoplasma der Laminavorläuferzellen und dem subösophagealen Ganglion lokalisiert ist (Abb. 25, Abb. 27), wird das Protein im adulten Gehirn im Neuropil der optischen Loben und des Zentralhirns exprimiert (Abb. 28). In diesem Zusammenhang müssen noch weitere Experimente unternommen werden, um die Funktion von *nonstop* im zentralen Nervensystem von *Drosophila* zu klären.

### 5.3 *nonstop* kodiert für eine Ubiquitin spezifische Protease und interagiert mit dem Ubiquitinsystem

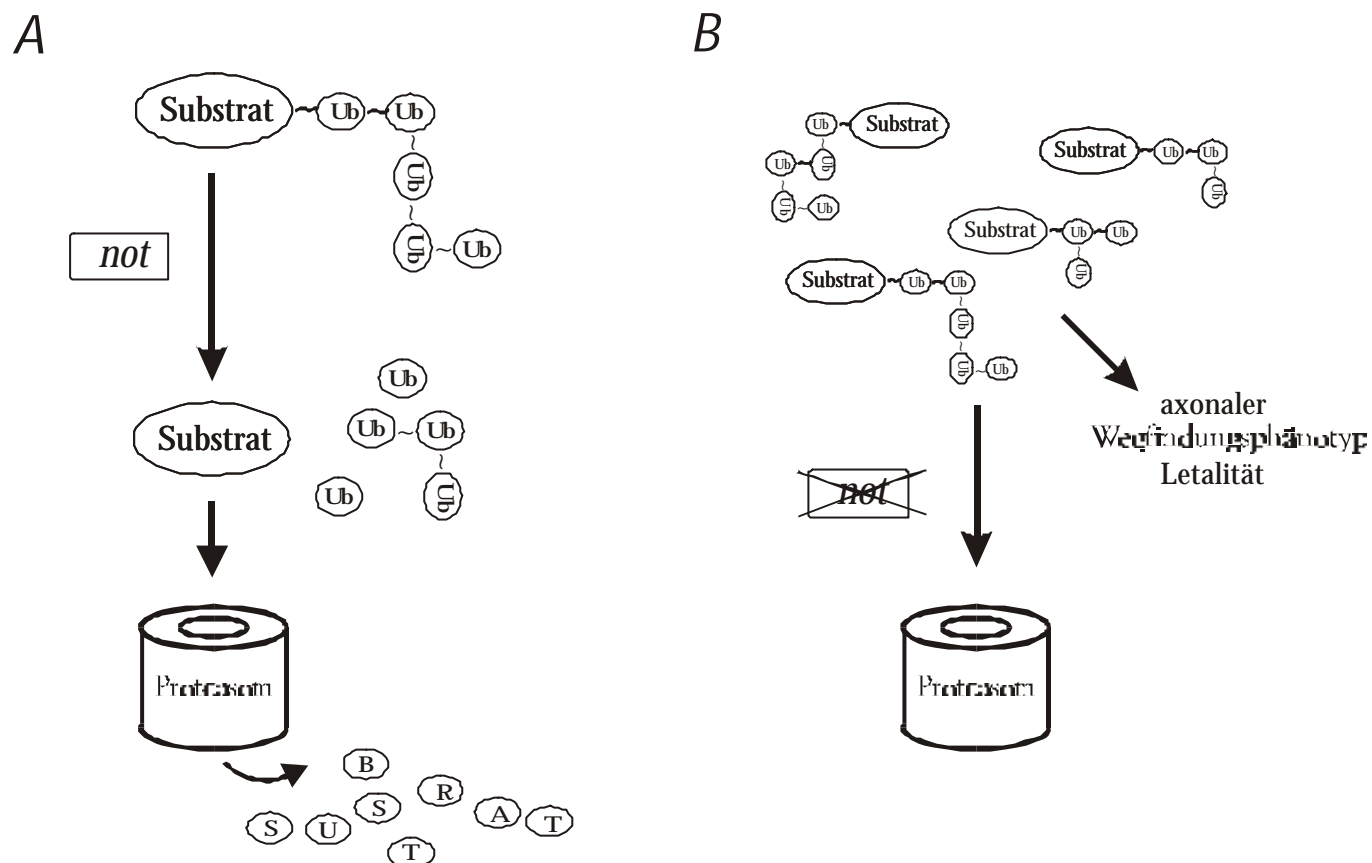
Wie bereits erwähnt wurde, kodiert *nonstop* für eine Protease, welche für die Deubiquitinierung Ubiquitin markierter Proteine verantwortlich ist. Die deubiquitinierenden Enzyme lassen sich in zwei Familien unterteilen: die Ubiquitin-Carboxylterminalen Hydrolasen (UCH) und die Ubiquitin spezifischen Proteasen (UBP; Wilkinson, 1997). Diese Unterteilung beruht auf den jeweiligen katalytischen Domänen, in welchen sich die beiden Familien unterscheiden.

*Nonstop* zeigt hohe Homologie in zwei konservierten Bereichen, welche die UBP auszeichnen: die Cystein- und die Histidindomäne. Wie bereits in Abb. 11 erläutert wurde, ist es den UBP möglich, verschiedene Funktionen auszuführen: Die Enzyme können sich am Hydrolyseprozess eines Proteins beteiligen, indem sie die Ubiquitinmarkierung abschneiden oder trimmen kurz bevor das abzubauen Produkt vom Proteasomenkomplex degradiert wird (z.B. Doa4, UBP14; Papa und Hochstrasser 1993; Americk *et al.*, 1997), bzw. von den UBP wird im Anschluß auch die Spaltung von Polyubiquitinketten in Monomere übernommen. Andererseits ist es den Proteasen auch möglich durch eine Deubiquitinierung im Vorfeld den Abbau eines Proteinproduktes zu verhindern, da das Protein ohne Ubiquitinmarkierung von der Degradationsmaschinerie nicht mehr erkannt werden kann. Bisher ist erst ein Enzym bekannt, welches diese Funktion übernimmt, die Ubiquitin spezifischen Protease *fat facet* (*faf*) in *Drosophila* (Huang *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1999). *Faf* wurde auf Grund eines Augenphänotyps in der Mutante identifiziert und es stellte sich heraus, daß das Gen innerhalb einer Signalkaskade benötigt wird, die für die korrekte Anzahl der Photorezeptorzellen (R1-R8) in einem Ommatidium verantwortlich ist. Während der Photorezeptorentwicklung über sogenannte *Precluster* (siehe Abb. 3; Einleitung), müssen zu einem bestimmten Zeitpunkt Zellen desintegriert werden (z.B. *mystery cells*; Tomlinson und Ready, 1987), damit sich eine komplette Facette mit acht Photorezeptoren formieren kann. In der *faf* Mutante scheint dieser Vorgang nicht stattzufinden, was zu zusätzlichen R-zellen im Ommatidium führt, bzw. der Mutante den Namen *fat facet* einbrachte (Fischer-Vize *et al.*, 1992; Huang und Fischer-Vize, 1996). Durch genetische Interaktionsexperimente konnte ein potentiell Substrat für *faf* identifiziert werden, welches in mutierter Form den Phänotyp der *faf* Mutante modifiziert. Bei diesem Substrat handelt es sich um das Vertebratenhomolog Epsin, ein Protein das an der Clathrin gesteuerten Endozytose beteiligt ist, und von *faf* deubiquitiniert werden muß, um nicht degradiert zu werden (Cadavid *et al.*, 2000).

Daß NONSTOP im Prinzip als Ubiquitin Protease aktiv ist, konnte an Hand eines Anti-Ubiquitin-Immunoblots gezeigt werden. In beiden Allelen, *not<sup>1</sup>* und *not<sup>2</sup>*, akkumulieren im

Vergleich zum Wildtyp mindestens drei ubiquitinierte Substrate (Abb. 23). Ferner deuten genetische Interaktionsexperimente mit einer Mutante im Proteasomenkomplex [*l(3)73Ai*] darauf hin, daß *nonstop* seine Funktion innerhalb des Proteindegradationssystems via des Proteasoms ausübt. In der *not* Mutante kommt es also zu einer Störung bei der Prozessierung eines oder mehrerer Substrate und dies scheint die Ursache für die *nonstop* Phänotypen zu sein. Zieht man die beiden möglichen Funktionen von Ubiquitin spezifischen Proteasen, die eben erläutert wurden in Erwägung, so muß das Substrat im Wildtyp entweder deubiquitiniert werden, um möglichst rasch den Degradationsprozeß zu durchlaufen, oder die Ubiquitinmarkierung muß entfernt werden, um das Substrat vor der Degradation zu schützen. Wenn der mutante Phänotyp durch einen Mangel an einem oder mehreren Proteinen, die erst nach Deubiquitinierung aktiv sind, verursacht wird, d.h. *nonstop* ein Substrat vor der Degradation schützt, dann sollte es bei dem Interaktionsexperiment mit einer Mutante im Proteasomenkomplex [*l(3)73Ai*] zu einer Suppression der *nonstop* Phänotypen kommen. Der Mangel an aktivem, deubiquitiniertem Substrat sollte durch die Reduktion der Proteasomenaktivität kompensiert werden, bzw. es wäre auch möglich, daß es in diesem Fall zu keiner Modifikation der Phänotypen kommt. Die oben erwähnte Ubiquitinprotease *fat facet* zeigt bei der Interaktion mit *l(3)73Ai* eine derartige Suppression des *fat* Phänotyps und bestätigt damit die Funktion des Proteins als Antagonisten des Degradationsprozesses (Huang *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1999).

Im Gegensatz dazu, kommt es bei der Doppelmutante *not<sup>1</sup>/l(3)73Ai* zu einer Steigerung innerhalb beider *nonstop* Phänotypen: Sowohl die präpupale Letalität, als auch der axonale Wegfindungsphänotyp wurden verstärkt (Tab. 6, Tab. 7, Abb. 24). Dies deutet darauf hin, daß *nonstop* eher die Hydrolyse eines oder mehrerer Substrate fördert, als ihr entgegenzuwirken. Für *nonstop* würde sich daher folgendes Model ergeben: Die Deubiquitinierung eines Substrats führt zur Hydrolyse des Proteins durch das Proteasom, ein Vorgang der für die allgemeine Lebensfähigkeit und korrekte Innervierung der Lamina durch R1-R6 benötigt wird (Abb. 38A). In der Mutante scheint die notwendige Degradation des Substratproteins nicht mehr stattzufinden. Der Prozeß der Eliminierung eines Proteins innerhalb eines zeitlich und/oder örtlich spezifischen Musters ist bei *nonstop* gestört und führt zu einer Akkumulation des Substrats in einer ubiquitinierten Form (Abb. 38B, Abb. 23).



**Abb. 38: Modellvorstellung der *nonstop* Funktion im Wildtyp und der Mutante. 38A)** Im Wildtyp müssen ein oder mehrere Substrate von *not* deubiquitiniert werden, um eine korrekte axonale Projektion der PRA zu gewährleisten. Die Deubiquitinierung ist Voraussetzung für eine rasche Degradation des Proteins. **38B)** In der Mutante *nonstop* kommt es zu einer Akkumulation ubiquitinierten (Ub) Substrate, die für den axonalen Wegfindungsphänotyp und die Letalität verantwortlich gemacht werden. In der Doppelmutante *not<sup>1</sup>/l(3)73Ai* wird diese Anhäufung ubiquitinierten Substrate verstärkt, da die Aktivität des Proteasoms reduziert ist.

Die gestörte Projektion der PRA und die Letalität könnten durch zwei verschiedene Effekte dieser Anhäufung verursacht werden: Entweder ist das Substrat, zeitlich und/oder örtlich zu lange funktionsfähig oder die einfache Akkumulation des ubiquitinierten Proteins *per se* wirkt sich störend auf die Innervierung der Lamina durch die Axone R1-R6 aus. In der Doppelmutante *not<sup>1</sup>/l(3)73Ai* kommt es zu einer zusätzlichen Reduktion der Proteasomenaktivität, wodurch die Anhäufung von ubiquitiniertem Substrat zusätzlich gesteigert wird. Die Verstärkung der präpupalen Letalität und des retinalen Phänotyps von *not* durch *l(3)73Ai* stimmen mit der Modellvorstellung 38B überein und deuten darauf hin, daß NONSTOP an der Degradation eines oder mehrerer Proteine beteiligt ist. Diese Hydrolyse ist für eine Ontogenese über die dritte Larve hinaus und die korrekte Weg- bzw. Zielzellfindung der Photorezeptoraxone notwendig.

## 5.4 Identifikation des NONSTOP Substrats

Betrachtet man die Situation in der *nonstop* Mutante (Abb. 38B), so stellt sich die Frage nach der Identität des Proteins, welches auf Grund von mangelhafter Deubiquitinierung zu den beschriebenen Phänotypen führt. Um eines oder mehrere dieser Substrate von NONSTOP zu identifizieren wurde im Rahmen dieser Dissertation ein Two Hybrid Experiment durchgeführt. Es wurden verschiedene cDNA Klone charakterisiert, welche potentielle Interaktionspartner für *nonstop* darstellen könnten: das 40S ribosomale Protein S14, das 60S ribosomale Protein L11, ein Anionentransporter (CG5789), der Imaginalscheiben Wachstumsfaktor 4 (*Idgf4*) und die Proteinkinase *Polo*. Da alle Klone innerhalb der sechs einzelnen Two Hybrid Ansätze mit zwei verschiedenen cDNA Bibliotheken nur einmal isoliert werden konnten, außer dem 60S ribosomalen Protein L11, das zweimal als positiver Kandidat verzeichnet wurde, stellt sich die Frage, ob die eben erwähnten Protein *in vivo* wirklich mit NONSTOP interagieren. Hierfür sind weitere Versuchsdurchführungen nötig, wie z.B. die Analyse genetische Interaktionen. Mutanten der potentiellen Interaktionspartner, oder Defizienzen, welche die jeweiligen Gene aufdecken, könnten in einem *nonstop* mutanten Hintergrund Auswirkungen auf die präpupale Letalität oder die Störungen im axonalen Projektionsmuster der PRA zeigen. Eine andere Möglichkeit das Substrat von NONSTOP zu isolieren stellt die Koimmunopräzipitation dar. Mit dem Serum T1P5, gerichtet gegen ein N-terminales NONSTOP Peptide, konnte eine erfolgreiche Immunopräzipitation durchgeführt werden (Abb. 35). Dieses Serum könnte daher benutzt werden, um Interaktionspartner für NONSTOP zu koimmunopräzipitieren.

Es wurde bereits diskutiert, daß der axonale Wegfindungsphänotyp durch eine Mutation in der 20S Proteasomenuntereinheit  $\beta 2$  (*(3)73A1*) modifiziert werden kann (Abb. 24). Dies zeigt, daß *nonstop* Allele offensichtlich für genetische Interaktionen sensitiv sind. Da der *nonstop* Phänotyp durch eine Akkumulation von ubiquitiniertem Substrat verursacht wird, ist zu erwarten, daß eine Reduktion des Levels eines solchen Substrats zu einer Verminderung dieses Phänotyps führt. Daher würde abschließend ein sogenannter *suppression screen* eine effiziente Methode darstellen, um auf genetischer Ebene Substrate für Nonstop zu identifizieren und dadurch ein besseres Verständnis für die molekularen Mechanismen der axonalen Wegfindung zu erhalten.

## **6 LITERATURANGABEN**



- Amerik A.Y., Swaminathan S., Krantz B.A., Wilkinson K.D. und Hochstrasser M.** (1997). In vivo disassembly of free polyubiquitin chains by yeast Ubp14 modulates rates of protein degradation by the proteasome. *EMBO J.* **16**, 4826-4838.
- Ashburner M.** (1989). *Drosophila a Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Ashburner M.** (1989b). *Drosophila a Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Arhipova I.R.** (1995). Promoter elements in *Drosophila melanogaster* revealed by sequence analysis. *Genetics* **139**, 1359-1369.
- Bainbridge S.P. und Bownes M.J.** (1981). Staging the metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *Embryol. Exp. Morphol.* **66**, 57-80.
- Bashaw G.J. und Goodman C.S.** (1999). Chimeric axon guidance receptors: the cytoplasmic domains of slit and netrin receptors specify attraction versus repulsion. *Cell* **97**, 917-926.
- Brand A.H. und Perrimon N.** (1993). Target gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-415.
- Buchner E., Buchner S., Crawford G., Mason W.T., Salavatterra P.M. und Satelle D.B.** (1986). Choline acetyltransferase-like immunoreactivity in the brain of *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res.* **246**, 57-62.
- Cadavid A.L., Ginzl A. und Fischer J.A.** (2000). The function of the *Drosophila* fat facets deubiquitinating enzyme in limiting photoreceptor cell number is intimately associated with endocytosis. *Development* **127**, 1727-1736.
- Cagan R.L. und Ready D.F.** (1989). The emergence of order in the *Drosophila* pupal retina. *Dev Biol.* **136**, 346-362.
- Cagan R.L. und Zipursky S.L.** (1992). Patterning in the *Drosophila* Retina. In: Shankland M. und Macagno E.R. (Eds.) Determinants of Neuronal Identity. *Academic Press Inc*, San Diego.
- Cagan R.L., Krämer H., Hart A.C. und Zipursky S.L.** (1992). The bride of sevenless and sevenless interaction: Internalization of a transmembrane ligand. *Cell* **69**, 393-399.

- Callahan C.A., Muralidhar M.G., Lundgren S.E., Scully A.L. und Thomas J.B.** (1995). Control of neuronal pathway selection by a *Drosophila* receptor protein-tyrosine kinase family member. *Nature* **376**, 171-174.
- Chisholm A. und Tessier-Lavigne M.** (1999). Conservation and divergence of axon guidance mechanisms. *Curr. Opin. Neurobiol.* **9**, 603-615.
- Chou W.H., Huber A., Bantrop J., Schulz S., Schwab K., Chadwell L.V., Paulsen R. und Britt S.G.** (1999). Patterning of the R7 and R8 photoreceptor cells of *Drosophila*: evidence for induced and default cell-fate specification. *Development* **126**, 607-616.
- Ciechanover A., Orian A. und Schwartz A.L.** (2000). Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays* **22**, 442-451.
- Cooley L., Kelley R. und Spradling A.** (1988). Insertional mutagenesis of the *Drosophila* genome with single P elements. *Science* **239**, 1121-1128.
- Deak P., Omar M.M., Saunders R.D., Pal M., Komonyi O., Szidonya J., Maroy P., Zhang Y., Ashburner M., Benos P., Savakis C., Siden-Kiamos I., Louis C., Bolshakov V.N., Kafatos F.C., Madueno E., Modolell J. und Glover D.M.** (1997). P-element insertion alleles of essential genes on the third chromosome of *Drosophila melanogaster*: correlation of physical and cytogenetic maps in chromosomal region 86E-87F. *Genetics* **147**, 1697-1722.
- DeMartino G.N. und Slaughter C.A.** (1999). The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J. Biol. Chem.* **274**, 22123-22126.
- Desai C.J., Gindhart J.G. Jr., Goldstein L.S. und Zinn K.** (1996). Receptor tyrosine phosphatases are required for motor axon guidance in the *Drosophila* embryo. *Cell* **84**, 599-609.
- Dickson, B. und Hafen, E.** (1993). Genetic dissection of eye development in *Drosophila*. In: Bate und Martinez Arias (Eds.) *The Development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1327-1362.
- Eichinger L., Bahler M., Dietz M., Eckerskorn C. und Schleicher M.J.** (1998). Characterization and cloning of a Dictyostelium Ste20-like protein kinase that phosphorylates the actin-binding protein severin. *Biol. Chem.* **273**, 12952-12959.
- Fischbach K.-F. und Heisenberg M.** (1984). Neurogenetics and behavior in insects. *J. Exp. Biol.* **112**, 65-93.

- Fischbach K.-F. und Dittrich A.P.M.** (1989). The optic lobe of *Drosophila melanogaster*. I. A. Golgi analysis of wild-type structure. *Cell Tissue Res.* **258**, 441-475.
- Fischer, S.** (1998). Molekulare und genetische Analyse axonaler Pathfindingmutanten im visuellen System bei *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Regensburg.
- Fischer-Vize J.A., Rubin G.M. und Lehmann R.** (1992). The fat facets gene is required for *Drosophila* eye and embryo development. *Development* **116**, 985-1000.
- Freeman M.** (1996). Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the *Drosophila* eye. *Cell* **87**, 651-60.
- Garity P.A., Rao Y., Salecker I., McGlade J., Pawson T. und Zipursky S.L.** (1996). *Drosophila* photoreceptor axon guidance and targeting requires the dreadlocks SH2/SH3 adapter protein. *Cell* **85**, 639-650.
- Garity P.A., Lee C.H., Salecker I., Robertson H.C., Desai C.J., Zinn K. und Zipursky S.L.** (1999). Retinal axon target selection in *Drosophila* is regulated by a receptor protein tyrosine phosphatase. *Neuron* **22**, 707-717.
- Gehring W.J.** (1992). The homeobox in perspective. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 277-280.
- Gehring W.J. und Ikeo K.** (1999). Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet.* **15**, 371-377.
- Gong Q., Rangarajan R., Seeger M. und Gaul U.** (1999). The netrin receptor frazzled is required in the target for establishment of retinal projections in the *Drosophila* visual system. *Development* **126**, 1451-1456.
- Goodman C.S.** (1994). The likeness of being: phylogenetically conserved molecular mechanisms of growth cone guidance. *Cell* **78**, 353-356.
- Grunderath S., Stollewerk A., Greig S., Goodman C.S., O'Kane C.J. und Klämbt C.** (1999). *loco* encodes an RGS protein required for *Drosophila* glial differentiation. *Development* **126**, 1781-1791.
- Haas A.L., Murphy K.E. und Bright P.M.** (1985). The inactivation of ubiquitin accounts for the inability to demonstrate ATP, ubiquitin-dependent proteolysis in liver extracts. *J. Biol. Chem.* **25**, 4694-4703.

- Hafen E., Dickson B., Raabe T., Brunner D., Oellers N. und van der Straten A.** (1993). Genetic analysis of the sevenless signal transduction pathway of *Drosophila*. *Dev. Suppl.*, 41-46.
- Hauck B., Gehring W.J. und Walldorf U.** (1999). Functional analysis of an eye specific enhancer of the *eyeless* gene in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **96**, 564-569.
- Hegde A.N., Inokuchi K., Pei W., Casadio A., Ghirardi M., Chain D.G., Martin K.C., Kandel E.R. und Schwartz J.H.** (1997). Ubiquitin C-terminal hydrolase is an immediate-early gene essential for long-term facilitation in *Aplysia*. *Cell* **89**, 115-126.
- Heisenberg M. und Wolf R.** (1984). Vision in *Drosophila*, Genetics of Microbehavior, *Springer Verlag* Heidelberg.
- Hershko A. und Ciechanover A.** (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425-479.
- Hershko A.** (1996). Lessons from the discovery of the ubiquitin system. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 445-449.
- Hing H., Xiao J., Harden N., Lim L. und Zipursky S.L.** (1999). Pak functions downstream of Dock to regulate photoreceptor axon guidance in *Drosophila*. *Cell* **97**, 853-863.
- Hiramoto M., Hiromi Y., Giniger E. und Hotta Y.** (2000). The *Drosophila* Netrin receptor Frazzled guides axons by controlling Netrin distribution. *Nature* **406**, 886-889.
- Hirth F. und Reichert H.** (1999). Conserved genetic programs in insect and mammalian brain development. *Bioessays* **21**, 677-684.
- Hofbauer A. und Campos-Ortega J.A.** (1990). Proliferation pattern and early differentiation of the optic lobes in *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **198**, 264-274.
- Hong K., Hinck L., Nishiyama M., Poo M.M., Tessier-Lavigne M. und Stein E.** (1999). A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell* **97**, 927-941.
- Hope I.A. und Struhl K.** (1986). Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell* **46**, 885-894.
- Huang Z. und Kunes S.** (1998). Signals transmitted along retinal axons in *Drosophila*: Hedgehog signal reception and the cell circuitry of lamina cartridge assembly. *Development* **125**, 3753-3764.

- Huang Z., Shilo B.Z. und Kunes S.** (1998). A retinal axon fascicle uses spitz, an EGF receptor ligand, to construct a synaptic cartridge in the brain of *Drosophila*. *Cell* **95**, 693-703.
- Huang Z. und Kunes S.** (1996). Hedgehog, transmitted along retinal axons, triggers neurogenesis in the developing visual centers of the *Drosophila* brain. *Cell* **86**, 411-422.
- Huang Y., Baker R.T., und Fischer-Vize J.A.** (1995). Control of cell fate by a deubiquitinating enzyme encoded by the fat facets gene. *Science* **270**, 1828-1831.
- Huang Y. und Fischer-Vize J.A.** (1996). Undifferentiated cells in the developing *Drosophila* eye influence facet assembly and require the Fat facets ubiquitin-specific protease. *Development* **122**, 3207-3216.
- Ito K., Sass H., Urban J., Hofbauer A. und Schneuwly S.** (1997). The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurons and glial cells. *Development* **124**, 761-771.
- Jarman A.P., Grell E.H., Ackerman L., Jan L.Y. und Jan Y.N.** (1994). Atonal is the proneural gene for *Drosophila* photoreceptors. *Nature* **369**, 398-400.
- Kawamura K., Shibata T., Saget O., Peel D. und Bryant P.J.** (1999). A new family of growth factors produced by the fat body and active on *Drosophila* imaginal disc cells. *Development* **126**, 211-219.
- Keegan L., Gill G. und Ptashne M.** (1986). Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* **231**, 699-704.
- Kikuno R., Nagase T., Ishikawa K., Hirosawa M., Miyajima N., Tanaka A., Kotani H., Nomura N. und Ohara O.** (1999). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XIV. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res.* **6**, 197-205.
- Krüger N.X., Van Vactor D., Wan H.I., Gelbart W.M., Goodman C.S. und Saito H.** (1996). The transmembrane tyrosine phosphatase DLAR controls motor axon guidance in *Drosophila*. *Cell* **84**, 611-622.
- Lee C., Bae K. und Edery I.** (1998). The *Drosophila* CLOCK protein undergoes daily rhythms in abundance, phosphorylation, and interactions with the PER-TIM complex. *Neuron* **21**, 857-867.

- Lindsley D.L. und Zimm G.G.** (1992). The Genome of *Drosophila melanogaster*. *Academic Press*, San Diego.
- Llamazares S., Moreira A., Tavares A., Girdham C., Spruce B.A., Gonzalez C., Karess R.E., Glover D.M. und Sunkel C.E.** (1991). polo encodes a protein kinase homolog required for mitosis in *Drosophila*. *Genes. Dev.* **5**, 2153-2165.
- Manser E und Lim L.** (1999). Roles of PAK family kinases. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **22**, 115-133.
- Mardon G., Solomon N.M. und Rubin G.M.** (1994). dachshund encodes a nuclear protein required for normal eye and leg development in *Drosophila*. *Development* **120**, 3473-3486.
- Martin K.A., Poeck B., Roth H., Ebens A.J., Ballard L.C. und Zipursky S.L.** (1995). Mutations disrupting neuronal connectivity in the *Drosophila* visual system. *Neuron* **14**, 229-240.
- Meinertzhagen L.A. und Hanson T.E.** (1993). The Development of the Optic Lobe. In: Bate und Martinez Arias (Eds.). *The Development of Drosophila melanogaster*. 1363-1491.
- Ming G.L., Song H.J., Berninger B., Holt C.E., Tessier-Lavigne M. und Poo M.M.** (1997). cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1. *Neuron* **19**, 1225-1235.
- Newsome T.P., Asling B. und Dickson B.J.** (2000a). Analysis of *Drosophila* photoreceptor axon guidance in eye-specific mosaics. *Development* **127**, 851-860.
- Newsome T.P., Schmidt S., Dietzl G., Keleman K., Asling B., Debant A. und Dickson B.J.** (2000). Trio combines with dock to regulate Pak activity during photoreceptor axon pathfinding in *Drosophila*. *Cell* **101**, 283-294.
- Nobes C.D. und Hall A.** (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**, 53-62.
- O'Connell P.O. und Rosbash M.** (1984). Sequence, structure, and codon preference of the *Drosophila* ribosomal protein 49 gene. *Nucleic Acids Res.* **12**, 5495-5513.
- Oland L.A. Tolbert L.P. und Mossman K.L.** (1988). Radiation-induced reduction of the glial population during development disrupts the formation of olfactory glomeruli in an insect. *J. Neurosci.* **8**, 353-367.

- Oland L.A. und Tolbert L.P.** (1989). Patterns of glial proliferation during formation of olfactory glomeruli in an insect. *Glia* **2**, 10-24.
- Papa F.R. und Hochstrasser M.** (1993). The yeast DOA4 gene encodes a deubiquitinating enzyme related to a product of the human tre-2 oncogene. *Nature* **366**, 313-319.
- Papatsenko D., Sheng G. und Desplan C.** (1997). A new rhodopsin in R8 photoreceptors of Drosophila: evidence for coordinate expression with Rh3 in R7 cells. *Dev.* **124**, 1665-1673.
- Pennisi, E.** (2000). Ideas Fly at Gene-Fining Jamboree, *Science* **287**, 2182-2184.
- Perez S.E. und Steller H.** (1996). Migration of glial cells into retinal axon target field in Drosophila melanogaster. *Neurobiol.* **30**, 359-373.
- Pflugfelder G.O., Schwarz H., Roth H., Poeck B., Sigl A., Kerscher S., Jonschker B., Pak W.L. und Heisenberg M.** (1990). Genetic and molecular characterization of the *optomotor-blind* gene locus in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **126**, 91-104.
- Poeck B., Fischer S., Gunning D. Zipursky S.L. und Salecker I.** (2001). Glial Cells Mediate Target Layer Selection of Retinal Axons in the Developing Visual System of Drosophila, *Neuron* **29**, 99-113.
- Ready D.F., Hanson T.E. und Benzer S.** (1976). Development of the Drosophila retina, a neurocrystalline lattice. *Dev. Biol.* **53**, 217-240.
- Rorth P., Szabo K. und Texido G.** (2000). The level of C/EBP protein is critical for cell migration during Drosophila oogenesis and is tightly controlled by regulated degradation. *Mol. Cell.* **6**, 23-30.
- Ruan W., Pang P. und Rao Y** (1999). The SH2/SH3 adaptor protein dock interacts with the Ste20-like kinase misshapen in controlling growth cone motility. *Neuron* **24**, 595-605.
- Rubin G.M.** (1991). Signal transduction and the fate of the R7 photoreceptor in Drosophila. *Trends Genet.* **7**, 372-377.
- Rubin G.M. und Spradling A.C.** (1982). Genetic transformation of Drosophila with transposable element vectors. *Science* **218**, 348-353.
- Rubin G.M., Yandell M.D., Wortman J.R., Gabor Miklos G.L., Nelson C.R., Hariharan I.K., Fortini M.E., Li P.W., Apweiler R., Fleischmann W., Cherry J.M., Henikoff S.,**

**Skupski M.P., Misra S., Ashburner M., Birney E., Boguski M.S., Brody T., Brokstein P., Celniker S.E., Chervitz S.A., Coates D., Cravchik A., Gabrielian A., Galle R.F., Gelbart W.M., George R.A., Goldstein L.S., Gong F., Guan P., Harris N.L., Hay B.A., Hoskins R.A., Li J., Li Z., Hynes R.O., Jones S.J., Kuehl P.M., Lemaitre B., Littleton J.T., Morrison D.K., Mungall C., O'Farrell P.H., Pickeral O.K., Shue C., Vosshall L.B., Zhang J., Zhao Q., Zheng X.H., Zhong F., Zhong W., Gibbs R., Venter J.C., Adams M.D. und Lewis S.** (2000). Comparative genomics of the eukaryotes, *Science* **287**, 2204-2215.

**Sambrook J., Fritsch E.F. und Maniatis T.** (1989). *Molekular Cloning - A Laboratory manual* second edition. *Cold Spring Harbour Laboratory press.*, New York.

**Sanger F., Nicklen S. und Coulson A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **74**, 5463-5467.

**Saville K.J. und Belote J.M.** (1993). Identification of an essential gene, *l(3)73Ai*, with a dominant temperature-sensitive lethal allele, encoding a *Drosophila* proteasome subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **90**, 8842-8826.

**Schmucker D., Jäckle H. und Gaul U.** (1997). Genetic analysis of the larval optic nerve projection in *Drosophila*. *Development* **124**, 937-948.

**Segraves W.A. und Hogness D.S.** (1990). The E75 ecdysone-inducible gene responsible for the 75B early puff in *Drosophila* encodes two new members of the steroid receptor superfamily. *Genes Dev.* **4**, 204-219.

**Selleck S.B. und Steller H.** (1991). The influence of retinal innervation on neurogenesis in the first optic ganglion of *Drosophila*. *Neuron* **6**, 83-99.

**Selleck S.B., Gonzalez C., Glover D.M. und White K.** (1992). Regulation of the G1-S transition in postembryonic neuronal precursors by axon ingrowth. *Nature* **355**, 253-255.

**Simon M.A., Bowtell D.D., Dodson G.S., Lavery T.R. und Rubin G.M.** (1991). Ras1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the sevenless protein tyrosine kinase. *Cell* **67**, 701-716.

**Silver J. und Rutishauser U.** (1984). Guidance of optic axons in vivo by a preformed adhesive pathway on neuroepithelial endfeet. *Dev. Biol.* **106**, 485-499.



- Smyth K.A. und Belote J.M.** (1999). The dominant temperature-sensitive lethal DTS7 of *Drosophila melanogaster* encodes an altered 20S proteasome beta-type subunit. *Genetics* **151**, 211-220.
- Spradling A.C., Stern D., Beaton A., Rhem E.J., Lavery T., Mozden N., Misra S. und Rubin G.M.** (1999). The Berkeley *Drosophila* Genome Project gene disruption project: Single P-element insertions mutating 25% of vital *Drosophila* genes. *Genetics* **153**, 135-177.
- Steller H. und Pirrotta V.** (1985). P transposons controlled by the heat shock promoter. *Mol. Cell Biol.* **6**, 1640-1649.
- Tessier-Lavigne M. und Goodman C.S.** (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science* **274**, 1123-1133.
- Thummel C.S. und Pirrotta V.** (1992). New pCaSpeR P element vectors. *Dras. Info. Service* **71**, 150.
- Tix S., Eule E., Fischbach K.F. und Benzer S.** (1997). Glia in the chiasms and medulla of the *Drosophila melanogaster* optic lobes. *Cell Tissue Res.* **289**, 397-409.
- Tix S., Minden J.S. und Technau GM** (1989). Pre-existing neuronal pathways in the developing optic lobes of *Drosophila*. *Development* **105**, 739-746.
- Tolbert L.P. und Oland L.A.** (1982). A role for glia in the development of organized neuropilar structures. *Trends Neurosci.* **12**, 70-75.
- Voges D., Zwickl P. und Baumeister W.** (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem.* **68**, 1015-1068.
- Wilkinson, K.D.** (1997). Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *FASEB J.* **11**, 1245-1256.
- Winberg M.L., Perez S.E. und Steller H.** (1992). Generation and early differentiation of glial cells in the first optic ganglion of *Drosophila melanogaster*. *Development* **115**, 903-911.
- Wolff T. und Ready D.F.** (1993). Pattern Formation in the *Drosophila* Retina. In: Bate und Martinez Arias (Eds.) *The Development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1277-1325.

**Wu Z., Li Q., Fortini M.E. und Fischer J.A.** (1999). Genetic analysis of the role of the drosophila fat facets gene in the ubiquitin pathway. *Dev. Genet.* **25**, 312-320.

**Xu T. und Rubin G.M.** (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult Drosophila tissues. *Development* **117**, 1223-1237.

**Zinsmaier K.E., Hofbauer A., Heimbeck G., Pflugfelder G.O., Buchner S. und Buchner E.** (1990). A cysteine-string protein is expressed in retina and brain of Drosophila. *J. Neurogenet.* **7**, 15-29.

**Zipursky S.L., Venkatesh T.R., Teplow D.B. und Benzer S.** (1984). Neuronal development in the Drosophila retina: monoclonal antibodies as molecular probes. *Cell* **36**, 15-26.

## **7 EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN**

**Poeck P., Fischer S., Gunning D., Zipursky S.L. und Salecker I.** (2001). Glial Cells Mediate Target Layer Selection of Retinal Axons in the Developing Visual System of *Drosophila*. *Neuron* **29**, 99-113.

## Danksagung an

Stephan Schneuwly und Burkhard Poeck für die Betreuung meiner Arbeit, die hilfreichen Diskussionen und das konstruktive *pathfinding* durch das Projekt.

Sibylla Lodermeier für die Hilfe bei diversen Gefrierschnitten und Ganzhirnpräparaten, sowie Renate Reng und Ursula Roth für viele kleine Notfalleinsätze.

Dieter Maier für Ratschläge, Ermutigungen und Lichtblicke.

Heiko Walch für *finalfurioso*!

Alle Mitgliedern des Lehrstuhls für Entwicklungsbiologie, für die äußerst angenehme Atmosphäre.

José, Javier, meine Mutter, Max, Monika, Uta und Sarah für den persönlichen Teil dieser Arbeit.