

**Identifikation neuer Interaktionspartner des
Bazooka Proteins
in *Drosophila melanogaster***

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Diane, Egger-Adam

aus Freiburg (Schweiz)

Düsseldorf

2005

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

Referentin: Prof. Dr. Elisabeth Knust

Korreferent: Prof. Dr. Andreas Wodarz

Tag der mündlichen Prüfung: 3. Mai 2005

für meine Familie

1. EINLEITUNG	3
1.1 Die asymmetrische Zellteilung und die Zellpolarität	3
1.1.1 Allgemein	3
1.1.1.1 Die asymmetrische Zellteilung der Neuroblasten bei <i>Drosophila melanogaster</i>	4
1.1.1.2 Die asymmetrische Teilung der <i>C. elegans</i> Zygote	5
1.1.2 Die Geschichte der PAR-Proteine	6
1.1.3 Der PAR/aPKC Komplex und weitere Proteinkomplexe in der asymmetrischen Zellteilung der NB in <i>Drosophila melanogaster</i>	12
1.2 Zielsetzungen der Arbeit	13
2. RESULTATE	14
2.1 Hefe-2-Hybrid Screen	14
2.1.1 Screendaten	14
2.1.2 Die neuen Interaktionspartner können in sechs Gruppen unterteilt werden	15
2.2 Lokalisierung der Kandidaten-RNAs	18
2.3 Weitergehende Analysen einiger Bindungspartner	23
2.3.1 Pp2A-29B	24
2.3.2 EG:80H7.5	27
2.3.3 LK6	29
2.3.4 Dystrophin	31
2.3.5 CG17064	33
2.4 CG7739	40
2.4.1 Westernblot-Analyse mit den Antikörpern gegen CG7739	41
2.4.2 Färbungen an Embryonen	43
2.4.3 CG7739 wird schon in Ovarien exprimiert	48
2.4.4 CG7739 lokalisiert in Schneiderzellen mehrheitlich am Cytocortex	51
2.4.5 Herstellung einer CG7739 Mutanten	53
2.5 Direkte Interaktionen der Proteine im PAR/aPKC Komplex	55
3. DISKUSSION	58
3.1 Neue Interaktionspartner von Bazooka	58
3.1.1 Der Hefe-2-Hybrid Screen	58
3.1.2 Die Klassifikation der Kandidaten	60
3.1.3 Experimente am <i>Drosophila</i> Embryo	61
3.1.4 Die weiter untersuchten Kandidaten	62
3.2 Direkte Interaktionen der Protein im PAR/aPKC Komplex	70
4. MATERIAL UND METHODEN	71
4.1 Chemikalien und sonstige Materialien	71
4.1.1 Lösungen	72
4.1.2 Medien	74
4.1.3 Bakterienstämme	75
4.1.4 Vektoren	76
4.1.5 Oligonukleotide	76
4.2 Molekularbiologische Methoden	78
4.2.1 Herstellung elektrokompetenter Bakterien	78

4.2.2	Transformation elektrokompeter Zellen	79
4.2.3	Transformation von Plasmid DNA in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	79
4.2.4	Haltung von Schneider Zellen (S2 Zellen) und Transfektion von Plasmid DNA in S2 Zellen	80
4.2.5	Isolierung von DNA und RNA	80
4.2.5.1	<i>Präparation von Plasmid-DNA</i>	80
4.2.5.2	<i>Präparation von genomischer DNA aus Drosophila</i>	81
4.2.5.3	<i>Präparation von genomischer DNA aus Saccharomyces cerevisiae</i>	81
4.2.5.4	<i>Isolierung von polyA⁺-RNA</i>	82
4.2.6	PCR (Polymerase-Kettenreaktion)	82
4.2.6.1	<i>Standard-PCR</i>	83
4.2.6.2	<i>OneStep RT-PCR</i>	84
4.2.6.3	<i>Single Fly PCR</i>	85
4.2.7	Die Herstellung der verwendeten Plasmid-Konstrukte	85
4.3	Genetische Methoden	88
4.3.1	Fliegenzucht	88
4.3.2	Fliegenstämme, Chromosomen und Allele	88
4.3.2.1	<i>Balancer-Chromosomen</i>	88
4.3.2.2	<i>Mutante Fliegenstämme und P-Element Insertionslinien</i>	89
4.3.2.3	<i>UAS-Effektorlinie und GAL4 Aktivationslinien</i>	90
4.3.3	Das GAL4/UAS-System	90
4.3	Histologische Methoden	91
4.4.1	Verwendete Antikörper	91
4.4.2	Fixierungsmethoden von Embryonen für Antikörperfärbung	92
4.4.2.1	<i>4% oder 8% Formaldehyd Fixierung</i>	92
4.4.2.2	<i>Hitze Fixierung</i>	93
4.4.2.3	<i>Strong Fixierung</i>	93
4.4.2.4	<i>Steffanini Fixierung</i>	93
4.4.2	Antikörperfärbung an Embryonen	94
4.4.3	Antikörperfärbungen an Schneiderzellen (S2 Zellen)	94
4.4.4	<i>in situ</i> -Hybridisierung an Embryonen	95
4.4.4.1	<i>RNA/RNA in situ-Hybridisierung</i>	96
4.4.5	Präparation embryonaler Kutikula	97
4.5	Proteinbiochemische Methoden	97
4.5.1	Herstellung eines GST-Fusionsproteins	97
4.5.2	Herstellung von Embryonenextrakten	99
4.5.3	SDS-PAGE-Gelelektrophorese und Western-blotting	99
4.5.4	<i>in vitro</i> -Transkriptions-/Translationsreaktion	100
4.5.5	GST-Pulldown	101
4.5.6	Co-Immunopräzipitation	101
5.	ZUSAMMENFASSUNG	103
6.	REFERENZEN	104
7.	ANHANG	111
8.	ABKÜRZUNGEN	161

1. Einleitung

1.1 Die asymmetrische Zellteilung und die Zellpolarität

1.1.1 Allgemein

Der größte Unterschied zwischen prokaryontischen und eukaryontischen Zellen ist ihre "Lebensphilosophie". Prokaryontische Zellen sind "Einzelkämpfer". Obwohl es vereinzelt vorkommt, dass sie eine Symbiose eingehen, kann eine Zelle allein überleben. Eukaryontische Zellen kommen auch als Einzeller vor, zum Beispiel die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, aber im Allgemeinen sind sie Teil eines Organismus und sind somit "Teamspieler". Und wie in einem Team, wo es Angriffs- und Verteidigungsspezialisten gibt, sind auch die einzelnen Zellen in einem Organismus spezialisiert. Der Nachteil dabei ist, dass eine einzelne Zelle nicht mehr alleine überleben kann, aber der Vorteil ist, dass nicht jede Zelle alle Funktionen übernehmen muss, es entsteht eine große Diversität an verschiedenen Zelltypen.

Eine Möglichkeit um diese Diversität der Zellen in einem Organismus hervorzubringen ist die asymmetrische Zellteilung. Eine Zelle teilt sich asymmetrisch, wenn die Tochterzellen unterschiedlich voneinander sind. Das heißt, wenn die Tochterzellen zum Beispiel unterschiedliche Größen oder Proteinkompositionen haben.

Eine weitere Eigenschaft von Zellen ist ihre Fähigkeit, eine Polarität aufzubauen. Epithelzellen zum Beispiel besitzen zwei Membranabschnitte, die klar voneinander abgegrenzt sind. Der apikale Bereich beschreibt die Seite der Zelle, die zur Oberfläche oder zum Lumen hin zeigt und der basale Bereich grenzt die Zelle zum Inneren hin ab. Im lateralen Bereich der Membran befinden sich Zell-Zell-Kontaktstrukturen, die die Rolle von Diffusionsbarrieren und von Zellverknüpfungspunkten übernehmen. Bei *Drosophila* bestehen diese Zell-Zell-Kontaktstrukturen zum einen aus der Zonula Adherens (ZA), die Cytoskelettbestandteile einer Zelle mit denen angrenzender Zellen verknüpft. Zum

anderen liegt basal zur ZA die "septate junction" (SJ), die durch ihre netzartige Struktur verhindert, dass Membranproteine der apikalen Zelloberfläche in tiefere Areale gelangen und die Diffusion von Molekülen zwischen einzelne Epithelzellen hindurch verhindert. Ebenfalls charakteristisch für einige Epithelien von *Drosophila melanogaster* ist die Ausbildung von Proteinkomplexen in einem als subapikale Region (SAR) bezeichneten Bereich der Membran apikal zur ZA. Die Zell-Zell-Kontaktstrukturen bilden somit die Grenze zwischen der apikalen und der basalen Membran und sorgen auf diese Weise für die Aufrechterhaltung der Zellpolarität (Alberts and Raff, 2002).

Im Folgenden wird die asymmetrische Zellteilung an zwei Beispielen erörtert. Das Erste ist die asymmetrische Zellteilung der Stammzellen des Nervensystems, den Neuroblasten (NB) im *Drosophila melanogaster* Embryo. Die asymmetrische Zellteilung der NB und die Proteine und Mechanismen, die ihr zu Grunde liegen, bilden den Forschungs-Schwerpunkt dieser Arbeit.

Das zweite Beispiel befasst sich mit der asymmetrischen Zellteilung in der Zygote des Fadenwurmes *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), da dies der erste Modelorganismus war, an dem die asymmetrische Zellteilung untersucht wurde.

1.1.1.1 Die asymmetrische Zellteilung der Neuroblasten bei *Drosophila melanogaster*

Neuroblasten (NB), die Vorläuferzellen des zentralen Nervensystems (ZNS) segregieren während der Keimstreifausstreckung aus dem Ektoderm ins Innere des Embryos, wo sie zwischen dem Mesoderm und dem Ektoderm zu liegen kommen. Die Entscheidung, welche Zellen zu Neuroblasten werden und welche Epidermoblasten (Vorläuferzellen der Epidermis) bleiben, hängt von Zell-Zell-Interaktionen ab. Genauer gesagt sind zwei Gruppen von Genen dafür verantwortlich, die proneuralen und neurogenen Gene.

Nachdem die NB determiniert wurden und delaminiert sind, teilen sie sich einige Male asymmetrisch um je eine Ganglionmutterzelle (GMZ) und einen weiteren NB zu bilden. Die Teilungsachse ist senkrecht zur Teilungsachse in den Epidermiszellen des Neuroektoderms, was durch eine Rotation der mitotischen Spindel um 90°

erreicht wurde. Die GMZ teilt sich nur noch ein Mal, um entweder zwei Neuronen oder zwei Gliazellen hervorzubringen (Campos-Ortega, 1997; Russo, 1992). Somit sind beide Tochterzellen unterschiedlich im Hinblick auf ihr Schicksal. Des Weiteren ist die GMZ immer kleiner als der NB und erbt Zellschicksalsdeterminanten, die in der Mitose basal am Cytocortex lokalisiert sind.

1.1.1.2 Die asymmetrische Teilung der *C. elegans* Zygote

In der ersten Furchungsteilung der *C. elegans* Zygote (P_0 Zelle) entstehen zwei unterschiedliche Zellen: anterior eine größere AB Zelle und posterior einer kleinere P_1 Zelle. Die AB Zelle teilt sich anschließend symmetrisch und senkrecht zur Teilungsachse der P_0 Zelle. Im Gegensatz dazu teilt sich die P_1 Zelle weiterhin asymmetrisch mit einer mitotischen Spindel, die parallel zur anterior-posterioren Achse liegt. Zusätzlich zu der unterschiedlichen Größe und dem unterschiedlichen Teilungsverhalten der Tochterzellen, kann auch eine asymmetrische Verteilung verschiedener Proteine beobachtet werden. Nur in der AB Zelle wird zum Beispiel das Protein GLP-1 exprimiert, ein Membranrezeptor, der für das anteriore Zellschicksal benötigt wird. Die P-Granula, Partikel die RNA und Proteine enthalten, werden vor der ersten Furchungsteilung in die posteriore Hälfte der Zygote transportiert und sind nach der Teilung ausschließlich in der P_1 Zelle vorhanden. Bei jeder weiteren Teilung wird dieser Prozess wiederholt, so dass sich die P-Granula schließlich in der P_4 -Zelle wiederfinden. Die Beförderung der P-Granula hängt von cytoskelettalem Aktin ab. Gibt man 15 min vor der ersten Furchungsteilung Cytochalasin D zu, eine Droge, die Aktinfilamente zerstört, so erfolgt eine symmetrische Furchung (Hill and Strome, 1990). Daraus folgt, dass das Cytoskelett für die Etablierung der Asymmetrie eine erhebliche Rolle spielt.

Um diesen Prozess zusätzlich zu erforschen führten Kemphues und Kollegen einen Screen durch, indem sie nach maternal letalen Mutanten suchten, die einerseits eine symmetrische Teilung aufwiesen und/oder die eine abnormale Verteilung der P-Granula zeigten (Kemphues et al., 1988). In diesem Screen wurden vier Gene isoliert: par-1, par-2, par-3 und par-4, benannt nach „partitioning defective“.

Was für Proteine zu diesen Genen gehören, wie der mutante Phänotyp aussieht und was genau die Funktion dieser Gene ist, wird im Folgenden beschrieben.

1.1.2 Die Geschichte der PAR-Proteine

Nach dem Screen von K.J. Kemphues wurden die vier *par* Gene genauer untersucht. PAR-1 ist eine Ser/Thr Kinase und ist in der Zygote in der posterioren Peripherie lokalisiert. Eine Mutation in *par-1* führt zu gleichgroßen AB und P₁ Zellen sowie einer Verteilung der P-Granula in der gesamten Zygote (Guo and Kemphues, 1995). PAR-2 besitzt ein RING-Finger Motiv und eine ATP-Bindungsstelle und colokalisiert mit Par-1. In *par-2* Mutanten sind sowohl PAR-1, wie auch die P-Granula im ganzen Zytoplasma verteilt (Boyd et al., 1996; Cheng et al., 1995). PAR-3 ist ein großes Protein mit 3 PDZ (Psd95, Discs Large, ZO-1) Domänen, dass reziprok zu PAR-1 und PAR-2 lokalisiert ist. Ist *par-3* in *C. elegans* mutant, so ist die erste Furchungsteilung symmetrisch und die Tochterzellen verhalten sich beide wie P₁ Zellen (Cheng et al., 1995; Etemad-Moghadam et al., 1995). PAR-4 kodiert eine Ser/Thr Kinase, die homolog ist zu der humanen Kinase LKB1. Die Lokalisation ist im Gegensatz zu den anderen PAR-Proteinen nicht asymmetrisch, jedoch ebenfalls kortikal. Mutiert man *par-4*, so sind alle Furchungsteilungen nach der zweiten symmetrisch. Die erste Furchungsteilung ist noch wildtypisch und die Zweite ist zwar asymmetrisch, aber nicht mehr asynchron (Watts et al., 2000).

Das Gen *par-6* wurde 1996 von Watts und anderen beschrieben. Tritt eine Mutation in diesem Gen auf, so gelangen die P-Granula auch in die anteriore Hälfte der Zygote, was zu zwei P₁ Tochterzellen führt. (Watts et al., 1996). Das Protein PAR-6 enthält eine PDZ Domänen, eine CRIB (Cdc42, Rac-interactive binding) Domäne und colokalisiert mit PAR-3 in der anterioren Peripherie der Zygote (Hung and Kemphues, 1999). Somit sind PAR-3 und PAR-6 in der anterioren Peripherie lokalisiert und beide sind gegenseitig voneinander abhängig, um richtig lokalisiert zu werden. Zusätzlich sind sie für die korrekte Lokalisation von PAR-1 und PAR-2 verantwortlich, welche in der posterioren Peripherie lokalisiert sind.

Diese fünf PAR-Proteine sind alle in die asymmetrischen Zellteilung der *C. elegans* Zygote verwickelt, aber wo ist die Verbindung zum Aktincytoskelett und wie ermöglichen sie die Rotation der Spindel?

Die Entdeckung, dass die PKC-3, eine atypischen Proteine Kinase C (aPKC), eine Rolle in diesem Prozess spielt, brachte die Forschung einen Schritt weiter.

Ein RNAi Versuch, bei dem die endogene PKC-3 RNA zerstört wird und somit kein Protein hergestellt werden kann, ergab einen sehr ähnlichen Phänotyp wie bei Mutationen in den Genen *par-3* und *par-6* (Tabuse et al., 1998). Zusätzlich konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, dass PKC-3 sich in einem Komplex mit PAR-3 befindet und dass beide Proteine im Hinblick auf ihre Lokalisation an der anterioren Peripherie gegenseitig voneinander abhängig sind.

Interessanterweise wurde zur selben Zeit in Säugetieren ein neuer Bindungspartner für die PKC ξ (Homolog zu der PKC-3) gefunden: ASIP, für „atypical PKC isotype-specific interacting protein“. Die Sequenzierung dieses Proteins ergab, dass ASIP ein Homolog des *C. elegans* Proteins PAR-3 ist. Wie PAR-3 besitzt ASIP drei PDZ Domänen. Zwei weitere Regionen in den Proteinen weisen eine hohe Ähnlichkeit auf: der N-Terminus und eine C-terminale konservierte Sequenz in der aPKC Bindungsregion. Die direkte Interaktion der beiden Proteine konnte auf die Kinase Domäne der aPKC und die AS 710-924 von ASIP (aPKC Bindungsregion) festgelegt werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass ASIP mit der aPKC in verschiedenen Zelllinien an der Zonula Occludens colokalisiert (Izumi et al., 1998). Diese neuen Forschungsergebnisse waren die ersten Hinweise darauf, dass die PAR-Proteine und die PKC-3 nicht nur in der asymmetrischen Teilung der *C. elegans* Zygote eine erhebliche Rolle spielen. Sie lassen zudem eine Konservierung dieses Komplexes zwischen dem Fadenwurm und Säugern vermuten.

Diese Hypothese wurde zusätzlich durch die Entdeckung eines PAR-Proteins in *Drosophila melanogaster* unterstützt. Das Protein Bazooka (Baz) besitzt 3 PDZ Domänen, einen konservierten N-Terminus, eine vorhergesagte aPKC Bindungsregion und ist homolog zu PAR-3 (Kuchinke et al., 1998). RNA und Protein sind in Epithelzellen und in NB exprimiert. In den Epithelzellen befindet sich Bazooka in der SAR (Abb. 1, A). In NB kann Bazooka erstmals im delaminierenden Neuroblasten im apikalen Fortsatz beobachtet werden (Abb. 1, B). In der späten Interphase befindet sich Baz apikal im Cytocortex (Abb. 1, C), in der Anaphase/Telophase kann eine Erweiterung des Färbemusters im gesamten Cytocortex des NB beobachtet werden (Abb. 1, F). In Baz Keimbahnklonen (KBK) ist die Zellpolarität sowohl der Epidermis, als auch der Neuroblasten gestört. Die

Epithelzellen verlieren ihre säulenartige Form und Proteine, die normalerweise nur im basalen Bereich des Cytocortex lokalisiert sind, werden an der gesamten Membran nachgewiesen. In NB und Epithelzellen kann in manchen Fällen beobachtet werden, dass die mitotische Spindel ihre Orientierung verliert (Kuchinke et al., 1998). In NB von *baz* KBK ist das Protein Inscuteable (Insc) fehllokalisiert (Wodarz et al., 1999). Insc ist für die Spindelrotation des NB und für die korrekte Lokalisation von Numb und Prospero verantwortlich, zwei Zellschicksalsdeterminanten der GMZ (Kraut and Campos-Ortega, 1996; Kraut et al., 1996).

In Abbildung 1 sind weitere Proteine aufgezeigt, die während der asymmetrischen Teilung des NB eine Funktion haben. Wie in *C. elegans* und in Säugetieren bindet die *Drosophila* aPKC an Baz. Es wurde jedoch gezeigt, dass Baz mit den PDZ Domänen 2-3 und nicht wie in den anderen Organismen mit der aPKC-Bindungsregion an die aPKC bindet. In NB ist die Funktion der aPKC praktisch identisch der Funktion Bazookas. In aPKC KBK ist Insc diffus im Cytoplasma von NB verteilt, die Bazooka-Konzentration ist auf ein nicht detektierbares Niveau gesunken und die Spindel der NB rotiert in einem zufälligen Muster (Rolls et al., 2003); Soya Kim, persönliche Mitteilung).

Nicht nur Baz und die aPKC sind konserviert, auch ein Homolog von PAR-6, *Drosophila melanogaster* Par-6 (DmPar6) wurde identifiziert (Petronczki and Knoblich, 2001). DmPar6 colokalisiert mit Baz und der aPKC in Epithelzellen in der SAR und in NB in einem apikalen Halbmond. Ein *in vitro* Bindungstest konnte eine direkte Bindung zwischen DmPar6 und Baz nachweisen. Die Lokalisation von DmPar6 ist von Baz abhängig, da in Baz RNAi Mutanten DmPar6 im Cytoplasma fehllokalisiert. Es wurden auch KBK von DmPar6 gemacht, in denen ein Verlust der Epithelpolarität beobachtet wurde. Zusätzlich waren Baz und Insc in NB fehllokalisiert, die Metaphasenplatten waren falsch orientiert und in 80% der Fälle war Miranda nicht asymmetrisch verteilt (Petronczki and Knoblich, 2001). Miranda ist ein Adapterprotein, dass in der Interphase Insc am apikalen Kortex und in der Metaphase Prospero am basalen Kortex bindet (Shen et al., 1998). Um diese Funktion auszuüben relokalisiert Miranda mit Hilfe des *Drosophila* Myosins VI, Jaguar, vom apikalen zum basalen Kortex (Petritsch et al., 2003) (Abb. 1, roter Halbmond).

Die Entdeckung, dass der PAR/aPKC Komplex (bestehend aus PAR-3/Baz/ASIP, PAR-6/DmPar6/Par6 und PCK-3/aPKC/PKC ξ) auch in *Drosophila* eine ähnliche Funktion hat, wie bei *C. elegans* und Säugern, lässt vermuten, dass der Komplex in allen höheren Eukaryonten konserviert ist.

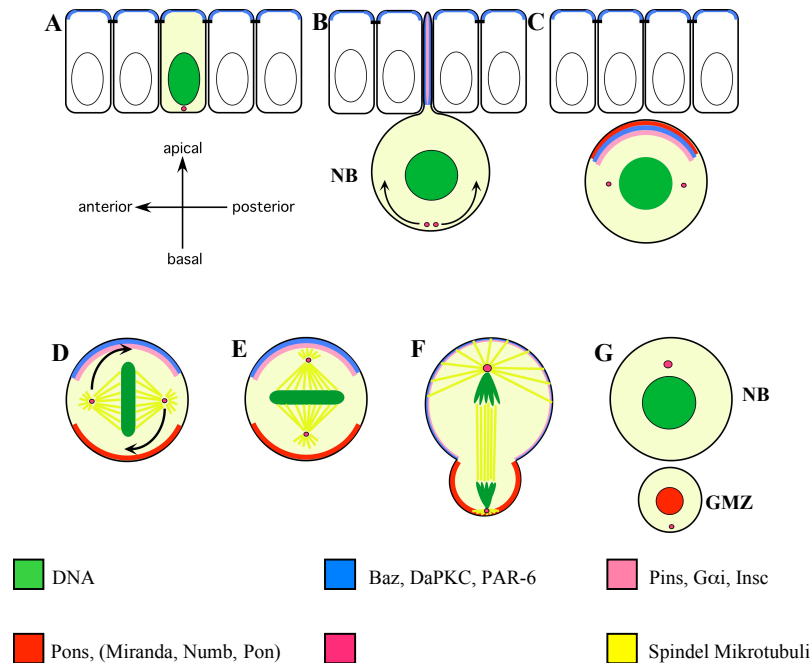


Abb. 1 Die asymmetrische Zellteilung bei NB

Simulierte zeitliche Abfolge der Delaminierung und Zellteilung eines einzelnen NB in der ventralen neurogenischen Region eines *Drosophila* Embryos. Die verschiedenen Farben zeigen die subzelluläre Lokalisation verschiedener Zellschicksaldeterminanten und ihrer Adapterproteinen an (siehe Legende) (Wodarz and Huttner, 2003)

Die Frage nach der Verbindung zwischen dem PAR/aPKC Komplex und dem Aktincytoskelett konnte bisher nicht beantwortet werden. Dass eine Verbindung besteht konnte unter anderem von zwei Arbeitsgruppen gezeigt werden. Broadus et al. konnten bei NB in Zellkultur zeigen, dass durch das Zufügen von Mikrofilament-Inhibitoren Insc und Pospero fehllokalisiert werden (Broadus and Doe, 1997). Knoblich et al. beschreiben, dass die asymmetrische Lokalisation von Numb durch Latrunculin A, einem Inhibitor der Aktin Polymerisation, inhibiert wird (Knoblich et al., 1997).

Ein erstes Indiz darauf wo die Verbindung zwischen Aktincytoskelett und PAR/aPKC Komplex ist, lieferten Untersuchungen an den PAR-Proteinen in Vertebraten. In vier Veröffentlichungen im Jahr 2000 wurde ein neuer Interaktionspartner von Par6

beschreiben: Cdc42 (Joberty et al., 2000; Johansson et al., 2000; Lin et al., 2000; Qiu et al., 2000).

Cdc42 ist eine Rho GTPase und funktioniert als molekularer Schalter, der zwischen eine aktiven (GTP-gebundenen) Form und einer inaktiven (GDP-gebundenen) Form hin und her wechselt. In der aktiven Form interagiert Cdc42 mit Effektorproteinen um eine biologische Antwort zu bewirken, einschließlich einer Remodulation des Aktincytoskeletts.

Eine Region von Par6, die die CRIB und die PDZ Domäne enthält, bindet an die aktive Form von Cdc42.

In diesen Veröffentlichungen konnten zusätzlich genauere Bindungsdomänen innerhalb des PAR/aPKC Komplexes ermittelt werden. ASIP bindet mit dem N-Terminus, inklusive der ersten PDZ Domäne, an die PDZ Domäne von Par6, das seinerseits mit dem N-Terminus (AS 1-102) an die regulatorische Domäne der PKC ξ (AS 15-110) bindet (Joberty et al., 2000). Somit sind ASIP, Par6 und PKC ξ alle direkt miteinander verbunden und bilden einen stabilen Komplex. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde die Bindungsdomänen zwischen ASIP und aPKC auf die AS 816-832 von ASIP reduziert (Nagai-Tamai et al., 2002).

Zudem konnte gezeigt werden, dass der Komplex in MDCK (Madin-Darby canine kidney) Zellen exprimiert wird und in der Zonula Occludens lokalisiert, für deren Etablierung er benötigt wird (Joberty et al., 2000). Auch in den MDCK Zellen wurde erstmals beschrieben, dass die PKC ξ ASIP an den Serinen 827 und 829 phosphorylieren kann. Die Bindung von der PKC ξ an ASIP wird durch dessen Phosphorylierung geschwächt. Ist die PKC ξ an ASIP gebunden, erfolgt eine Konformationsänderung, die die Inaktivierung der Kinase nach sich zieht, somit ist ASIP ein Inhibitor der PKC ξ (Lin et al., 2000; Nagai-Tamai et al., 2002). Wird eine aPKC, deren Kinase Domäne nicht funktionsfähig ist, überexprimiert so lokalisiert die aPKC im Cytoplasma. ASIP wird ebenfalls dorthin fehllokalisiert. Daraus folgend kann keine vollständige Zonula Occludens mehr gebildet werden (Suzuki et al., 2001). Diese Beobachtungen zusammen mit weiteren Veröffentlichungen bestätigen, dass in Vertebraten der PAR/aPKC Komplex zusammen mit Cdc42 eine Funktion bei der Etablierung der Zellpolarität hat (Gao et al., 2002; Hirose et al., 2002; Mishima et al., 2002).

Aber wie kann der PAR/aPKC Komplex überhaupt am Cytocortex lokalisieren? Keines der bis dato entdeckten Mitglieder besitzt eine Transmembrandomäne (TMD) oder eine andere Domäne, die mit der Plasmamembran (PM) oder dem Cytocortex interagieren kann.

Zumindest in Vertebraten konnte diese Frage von Ebnet et al. beantwortet werden. Sie führten einen Hefe-2-Hybrid Screen durch, um neue Interaktionspartner für ASIP zu finden. Diese Methode wurde entwickelt um *in vivo* Protein-Protein Interaktionen zu testen. Zusätzlich ist dieses System sehr sensibel und kann schwache oder nur zeitlich begrenzte Interaktionen detektieren. Diese Eigenschaften machten aus dem Hefe-2-Hybrid Screen eine sehr häufig und erfolgreich benutzte Methode.

Eines der neu gefundenen Proteine, die mit ASIP interagieren, ist JAM (junctional adhesion molecules), ein Protein mit einer TMD, das mit dem C-Terminus an die erste PDZ Domäne von ASIP bindet. Ebnet et al. konnten zeigen, dass bei der Neubildung der Zonula Occludens zuerst JAM und später ASIP rekrutiert werden und dass die Bindung zwischen JAM und ASIP im Verlauf des Prozesses immer stärker wird (Ebnet et al., 2001).

Es wurden keine Homologe von JAM in *C. elegans* oder *Drosophila melanogaster* entdeckt. Auch andere Möglichkeiten, wie der Komplex an das Cytoskelett bindet, konnten noch nicht ermittelt werden. Diese Frage ist noch offen.

Die bis jetzt in dieser Arbeit erörterten Funktionen des PAR/aPKC Komplexes müssen noch erweitert werden. Erstens besitzt der PAR/aPKC Komplex sowohl in *Drosophila*, als auch in *C. elegans* zusätzlich eine Funktion in der Etablierung der Zellpolarität (Muller and Wieschaus, 1996; Nance and Priess, 2002). Zweitens konnte vor kurzem der PAR/aPKC Komplex in Neuroepithelialzellen der Maus nachgewiesen werden, wo er für die asymmetrische Zellteilung mitverantwortlich sein soll (Manabe et al., 2002).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Mitglieder des PAR/aPKC Komplexes in den drei vorgestellten Organismen homolog sind. Diese Homologie kann auf die Protein Bindungsstellen und auf die Funktionen ausgedehnt werden. Aber wie der Komplex die nachgeschalteten Proteine und Mechanismen beeinflusst, konnte noch nicht entschlüsselt werden. Das Protein JAM zeigt, dass diese Mechanismen womöglich nicht so hoch konserviert sind wie der PAR/aPKC Komplex selber.

Daher wurde im Folgenden nur noch auf das Modellsystem eingegangen, an dem im Rahmen dieser Arbeit geforscht wurde: die asymmetrische Zellteilung in *Drosophila* Neuroblasten.

1.1.3 Der PAR/aPKC Komplex und weitere Proteinkomplexe in der asymmetrischen Zellteilung der NB in *Drosophila melanogaster*

Wie oben erwähnt ist der PAR/aPKC Komplex gemeinsam mit Insc in metaphasen NB in einem apikalen Halbmond lokalisiert, wo sie für die korrekte Lokalisation der Zellschicksalsdeterminanten Numb und Prospero und für die Rotation der Spindel um 90° verantwortlich sind.

Nach und nach wurden weitere Proteine entdeckt, die ebenfalls eine Funktion in der asymmetrischen Zellteilung haben. Das Protein Partner of Insc (Pins) wurde als Bindungspartner von Insc beschrieben. Eine Mutation in Pins führt zu einem ähnlichen Phänotypen, wie eine Mutation in Insc. Die Proteinstruktur von Pins weist drei GoLoco Motive auf, die als Bindungsmotive und Modulatoren für die heterotrimerische G-Protein Untereinheit $\alpha i/o$ identifiziert wurden (Siderovski et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass $G\alpha i/o$ an Pins bindet, was eine Beteiligung des G-Protein Signaltransduktionsweges an der asymmetrischen Zellteilung der NB vermuten lässt (Schaefer et al., 2000).

Das Bild wurde maßgeblich durch die Entdeckung erweitert, dass zwei parallele Proteinkomplexe, der PAR/aPKC/Insc Komplex und der Pins/ $G\alpha i/o$ Komplex, erforderlich sind um alle Aspekte einer korrekten asymmetrischen Zellteilung zu gewährleisten. Nämlich, die Rotation der Spindel, die richtige Lokalisation der Zellschicksalsdeterminanten und die unterschiedliche Größe der Tochterzellen. Fehlen ein oder mehrere Mitgliedern eines Komplexes, so werden die Zellschicksalsdeterminanten fehllokalisiert und die Rotation der Spindel zeigt ein zufälliges Muster. Die Tochterzellen sind jedoch immer noch unterschiedlich groß. Werden Doppelmutanten mit je einem Mitglied aus beiden Komplexen erzeugt, zum Beispiel *baz/pins* oder *aPKC/pins*, so teilen sich die NB symmetrisch (Cai et al., 2003).

Somit wurde gezeigt, dass diese beiden Proteinkomplexe gemeinsam für die unterschiedliche Zellgröße von NB und GMZ verantwortlich sind. Noch immer unklar ist, mit welchem Mechanismus dies gewährleistet wird. Es wäre möglich, dass die Größe der Zellen nur von der Größe der Spindel abhängt. Im Fall der NB besitzt die Spindel einen langen apikalen Spindelarm und einen kurzen basalen Spindelarm, was zu einem großen NB und einer kleinen GMZ führen könnte.

Wie der PAR/aPKC Komplex und der Pins/G α i/o Komplex aber die Asymmetrie der Spindel und auch deren Rotation regulieren, konnte noch nicht geklärt werden.

1.2 Zielsetzungen der Arbeit

Die Rolle des PAR/aPKC Komplexes in der asymmetrischen Zellteilung der NB ist unbestreitbar. Ist eines der Mitglieder des Komplexes mutant oder funktionsunfähig, so werden Insc und Miranda fehllokalisiert, was dazu führt, dass die Spindelrotation einem zufälligen Muster folgt und dass Zellschicksalsdeterminanten fehllokalisiert werden.

Trotz der vielen neuen Erkenntnisse, die diesen Komplex betreffen, konnten auf zentrale Fragen noch keine Antworten gefunden werden. So ist in *Drosophila* immer noch nicht klar, wie der PAR/aPKC Komplex am Cytocortex gebunden ist. Möglich wäre eine Bindung zu einem Protein, das entweder eine TMD oder ein Lipidbindemotiv besitzt.

Zudem ist noch keine Verbindung zwischen dem PAR/aPKC Komplex und der Spindel identifiziert worden. Ein Protein, das zugleich an den Komplex und an die Spindel direkt oder an ein spindelassoziiertes Protein bindet, könnte diese Verbindung darstellen.

Um diese Fragen zu beantworten müssen neue Proteine identifiziert werden, die an den Komplex binden und zusätzlich eine Verbindung zum Cytocortex oder der Spindel herstellen.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, solche Proteine mit Hilfe eines Hefe-2-Hybrid Screens zu isolieren.

2. Resultate

2.1 Hefe-2-Hybrid Screen

2.1.1 Screendaten

Um die in der Einleitung erwähnten offenen Fragen über die Funktion Bazookas zu untersuchen, wurde ein Hefe-2-Hybrid Screen durchgeführt. Als Köder wurde der N-Terminus Bazookas gewählt, da die hohe Homologie zu den Orthologen in *C. elegans* und Vertebraten (41% der ersten 80 AS sind identisch beim *C. elegans* PAR-3 N-Terminus und 40% beim Vertebraten ASIP N-Terminus) auf eine konservierte Funktion schließen lässt, die noch nicht beschrieben wurde. Eine Eigenschaft des N-Terminus wurde während dieser Arbeit von Benton et al. beschrieben. Die ersten 83 Aminosäuren von Bazooka und auch von mPar3 können selbst assoziieren (Benton and St Johnston, 2003).

Das verwendete Köderplasmid, pGBT9/BNT wurde von Andreas Ramrath zur Verfügung gestellt. Es enthält die Gal4 Bindungsdomäne (BD) und den N-Terminus von Bazooka, genauer die ersten 318 AS des Bazooka Proteins. Während der Arbeit wurde von der Firma *Clontech* ein neues System für Hefe-2-Hybrid Screens entwickelt, das einen anderen Köder-Vektor, pGBTKT7, verwendet. Dieser weist 3 Vorteile gegenüber pGBT9 auf: 1) pGBTKT7 besitzt eine Kanamycin Resistenz, was die Isolation des Beuteplasmids (Ampicillin Resistenz) erleichtert; 2) Der Vektor enthält eine T7 Promotor Stelle, die eine *in vitro* Transkription/Translation ermöglicht und 3) besitzt das so entstandene Fusionsprotein ein myc-tag, was weitere proteinbiochemische Methoden vereinfacht. Um diese Vorteile zu nutzen wurde der Bazooka N-Terminus (AS 1-318) in den pGBTKT7 Vektor umkloniert (siehe Material und Methoden Kapitel 4.2.7).

Die cDNA Bibliothek wurde von *Clontech* (Palo Alto, USA) hergestellt. Die Matrizen-mRNA wurde aus 0-21 Std. alten Canton S Embryonen gewonnen. Die anschließend hergestellte cDNA wurde in den pACT2 Vektor kloniert, der die Gal4 Aktivierungsdomäne (AD) enthält.

Als erstes musste diese Bibliothek amplifiziert werden, da pro Transformation 3µg DNA gebraucht werden. In dieser Arbeit wurden insgesamt 17 Transformationen zu Screen-Zwecken gemacht. Die durchschnittliche Transformationseffizienz, das heißt die Anzahl der Hefekolonien, die beide Plasmide (pGBT9/BNT und pACT2/cDNA) enthalten, betrug ca. 442'500 Kolonien, was eine Gesamtzahl von 7'522'500 gescreenten Kolonien bedeutet.

Von diesen ca. 7.5 Millionen Kolonien sind 104 in histidinfreien Medien gewachsen. In 11 der Kolonien war kein Beutevektor vorhanden, was die Zahl auf 93 reduziert. Alle 93 Kandidaten wurden dann in Bakterien transformiert, amplifiziert und die DNA wurde aufgereinigt. Mit dieser DNA wurden dann noch einmal Hefen transformiert, sowohl mit dem Köderplasmid als auch mit einer negativen Kontrolle zusammen. Der anschließende Farbttest konnte die Spezifität der Interaktion aufklären. Eine Aktivierung der Reporter-Gene alleine durch das cDNA-Stück im Beutevektor konnte so ausgeschlossen werden. Bei 6 Kandidaten aktivierte auch die negative Kontrolle die Farbreaktion und 33 Kandidaten konnten bei dieser zweiten Kontrolle die Farbreaktion nicht mehr aktivieren, somit waren noch 54 Kandidaten übrig, die spezifisch an den Bazooka N-Terminus binden.

Alle diese Kandidaten wurden sequenziert und mit Hilfe des „Berkeley *Drosophila* Genome Projektes“, das das ganze *Drosophila* Genom sequenziert hat (www.fruitfly.org/DGC/index.html), konnten 34 cDNAs Genen zugeordnet werden, wobei sechs Gene zweimal und ein Gen dreimal isoliert wurden.

Der hier ausgeführte Hefe-2-Hybrid Screen hat 34 neue Interaktionspartner des Bazooka N-Terminus hervorgebracht. Um ihre Relevanz zu untersuchen wurden als erstes alle Daten zusammengetragen, die über die jeweiligen Kandidaten schon bekannt waren, wie zum Beispiel ihre Funktion oder Proteindomänen.

2.1.2 Die neuen Interaktionspartner können in sechs Gruppen unterteilt werden

In der Tabelle 1 sind alle 34 neuen Interaktionspartner Bazookas aufgelistet. Kandidaten, die mit einer CG-Nummer bezeichnet sind, sind nur vorhergesagte Gene. Die mit einem Sternchen (*) versehenen Kandidaten wurden durchsequenziert (Sequenzen im Anhang). Die zweite Spalte beinhaltet die Proteindomänen oder

Motive, die mit Hilfe des SMART Programms ermittelt wurden (Letunic et al., 2004; Schultz et al., 1998). In der dritten Spalte wurden die schon beschriebenen, vorhergesagten Funktionen der einzelnen Kandidaten aufgezeigt und in der vierten Spalte ist ersichtlich, welche Kandidaten mehrfach isoliert wurden.

Die 34 Kandidaten wurden in Gruppen aufgeteilt, um einen besseren Überblick zu erlangen. Die Proteindomänen oder Motive, genauer die Funktionen, die die Domänen ausüben, wurden benutzt, um die Kandidaten zu unterteilen.

Die Gruppe 1 beinhaltet Kandidaten, die eine Protein-Protein Interaktionsdomäne besitzen. Besonders hervorzuheben sind CG17492, das 3 Mal isoliert wurde und CG17064, ein Protein mit einer GKAP (guanylate Kinase associated protein) Domäne, welche eine Protein-Protein Interaktionsdomäne ist, die an MAGUK (membrane-associated guanylate Kinase) Proteine bindet (Kim et al., 1997). MAGUK Proteine sind meistens an cytoskelettalen Strukturen, wie intrazellulären Verbindungspunkten und Synapsen, lokalisiert.

In der zweiten Gruppe sind Proteine mit einer Plasmamembran (PM) /Cytoskelett-Assoziationsdomänen oder einem Lipid Bindungsmotiv zusammengefasst: CG7739 und CG13034 besitzen eine Transmembrandomäne (TMD). Dystrophin (Dys) ist ein großes cytoskelettales Protein das an Dystroglycan bindet. Dystroglycan seinerseits ist wichtig für die apikal-basale Polarität der Epithelzellen und der Oozyte in *Drosophila* (Deng et al., 2003). EG:80H7.5 enthält eine Pleckstrin Homologie Domäne (PH) und eine FYVE (Fab1, YOTB, Vac1, und EEA1) Domäne, beides Domänen, die an Lipide, genauer Phosphatidylinositole, binden.

In der dritten Gruppe sind Proteine aufgelistet, die Domänen mit Enzymfunktionen besitzen. Zum Beispiel Lk6, eine Ser/Thr Protein Kinase, die teilweise an Zentrosomen assoziiert (Kidd and Raff, 1997). Zusätzlich wurde Lk6 in einem Screen zur Identifizierung neuer Gene, die den RAS 1 Signal Mechanismus modulieren können, gefunden (Huang and Rubin, 2000). Zu der dritten Gruppe gehört auch die Protein Phosphatase Pp2A-29B, die in Vertebraten als Antagonist der aPKC bekannt ist (Nunbhakdi-Craig et al., 2002).

Bezeichnung	Proteindomäne nach SMART	beschriebene Funktion	mehrfach isoliert
Gruppe 1: Protein-Protein Interaktionsdomänen			
CG17492 *	2x Mib, 7x Ank, 2x Ring		3x
CG7991	SH3 Domäne		
CG17064 *	GKAP Domäne		2x
CG12340	FN3 Domäne		2x
CG11148	1x coiled coil, GYF-Motiv		
Gruppe 2: PM/Cytoskelett-Assoziationsdomänen und Lipid-Bindungsmotive			
CG7739 *	Signalpeptid, TMD		
CG13034	Signalpeptid, TMD		
Dys *	2x CH, 11x Spec, ZnF ZZ, WW		
EG:80H7.5 *	FYVE, PH		
Gruppe 3: Proteine im Cytoplasma			
CG16721	Tcp11 Domäne		
Dip2	DM3-Domäne, ZnF		
Lk6		Protein Kinase	
Pp2A-29B *	14x HEAT-Wiederholungen	Protein Phosphatase	
CaBP		Calciumbindungsprotein	
CG4759	KOW, Ribosomal-L27e		
dib		Cytochrom p450	
Gruppe 4: Proteine im Kern			
Ef1 α 48D	Tu GTP Bindungsdomänen 1-3	Elangationsfaktor	2x
Domino-B	DEXDc, HELIXc, 4x CC	Helikase	
CG9253	DEXDc, HELIXc, 1x CC		
CG6755	TFS2N Domäne		
Nnp-1	Nop52		
zf30C	3x ZnF-C2H2	Transkriptionsfaktor	
ash1	3x AT-hook, SET, postSET	Transkriptionsfaktor	
CG11844	HABP4-PAI-RBP1		
lilliputian	AT-Hook	Transkriptionsfaktor	
hunchback	6x ZnF-2C2H	Transkriptionsfaktor	2x
Bx42	SKIP-SNW	Transkriptionsfaktor	2x
Gruppe 5: coiled coil Motiv(e)			
CG1962	2x coiled coil		2x
CG4294	2x coiled coil		
CG14989	coiled coil, Signalpeptid		
Gruppe 6: ohne bekannte Domäne			
CG11164	ohne bekannte Domäne		
CG8230	ohne bekannte Domäne		
CG10660	ohne bekannte Domäne		
CG1943	ohne bekannte Domäne		

Tabelle 1: Die 34 Gene, die beim Hefe-2-Hybrid Screen mit dem N-Terminus Bazookas als Interaktionspartner identifiziert wurden.

Mib=mind bomb, eine Domäne, die meist Teil eine E3 Ubiquitin Ligase ist; Ank=Ankyrin Wiederholungen, welche in Protein-Protein Interaktionen verwickelt sind; Ring=E3 Ubiquitin Ligase Domäne; SH3=Src Homology-3 bindet an Proteine mit prolinreichen Sequenzen; FN3=Fibronectin Typ 3 Domäne; GYF steht für Gly-Tyr-Phe und bindet an Prolin; CH=Calponin Homologie Domäne bindet an Aktin; Spec=Spectrin Wiederholungen; ZnF ZZ=Zink Finger Domäne, die in Dys an Calmodulin bindet; WW steht für Trp-Trp und bindet prolinreiche Polypeptide; Tcp11 ist in Vertebraten ein Rezeptor, der eine Rolle bei der Spermienproduktion spielt; DM3=Zink Finger

Domäne; HEAT= Huntingtin, Elongationsfaktor 3 (EF3), Protein Phosphatase 2A (PP2A) und PI3-kinase TOR1; KOW= Kyprides, Ouzounis und Woese kommt in ribosomalen Proteinen vor; DEXDc und HELIXc sind Domänen, an den C-Termini von Helikasen vorkommen; CC=coiled coil; TFS2N=N-terminale Domäne des S-II Elongationsfaktors; Nop52=Kernprotein, dass in die Bildung der 28S rRNA verwickelt ist; AT-Hook=DNA Bindungsregion; SET und postSET = putative Methyltransferase; HABP4-PAI-RBP1= Hyaluronan und mRNA Bindungsdomäne; SKIP-SNW=Domäne, die in Chromatin Proteinen vorkommt.

Die mit 11 Kandidaten größte Gruppe ist die Gruppe 4, welche die Proteine, die im Kern lokalisiert, enthält.

In der fünften Gruppe sind die Proteine aufgeführt, die ein oder mehrere coiled coil Motive besitzen. Das coiled coil Motiv wurde schon in vielen verschiedenen Proteinen gefunden, einschließlich Transkriptionsfaktoren und SNARE Komplexen (z.B. Gos28, ein vorhergesagtes Golgi SNARE Protein in *D. melanogaster*). Sehr lange coiled coils wurden in Proteinen wie Tropomyosin, intermediären Filamenten und Spindelpolkörper Komponenten gefunden. Diese große Spannweite an Funktionen machte eine genauere Klassifizierung nicht möglich.

In der letzten Gruppe wurden alle Kandidaten vereint, die noch nicht beschrieben wurden und die auch keine bekannten Domänen besitzen, welche eine mögliche Funktion vorhersagbar machen würden.

Durch ihre vorhergesagte Funktion oder Lokalisation versprechen einige dieser Kandidaten, vor allem die in den Gruppen 1 bis 3 aufgeführten Gene, eine Rolle in der Beantwortung der noch offenen Fragen bezüglich der Funktionsweise Bazookas zu spielen.

Um eine physiologisch relevante Bindung Bazookas mit einem oder mehreren Kandidaten zu postulieren, muss eine räumliche und zeitliche Nähe bewiesen werden. Dies kann mit Hilfe einer RNA *in situ* Hybridisierung bewerkstelligt werden. Diese Methode ermöglicht es die Lokalisation der Kandidaten-RNA im *Drosophila* Embryo während der Entwicklung zu verfolgen.

2.2 Lokalisierung der Kandidaten-RNAs

Ein Projekt des Berkeley *Drosophila* Genom Projektes (BDGP) beinhaltet die systematische Bestimmung der Expressionsmuster von Genen mit Hilfe der RNA *in situ* Hybridisierung (<http://www.fruitfly.org/cgi-bin/ex/insitu.pl>). Von mehreren

Kandidaten konnten *in situ* Daten auf der Homepage (hp) des BDGP gefunden werden. In manchen Fällen, zum Beispiel beim Gen *lilliputian*, sind die *in situ* Daten schon publiziert worden (Wittwer et al., 2001). Bei allen Kandidaten, von denen noch keine Daten vorhanden waren, wurde in dieser Arbeit eine RNA *in situ* Hybridisierung durchgeführt.

Als DNA Vorlage für die RNA Sonde wurde das Stück DNA des jeweiligen Kandidaten benutzt, das im Hefe-2-Hybrid Screen isoliert wurde. Diese DNA Fragmente wurden in den pBluescript Vektor kloniert (siehe Material und Methoden, Kapitel 4.2.7). Da dieser Vektor T3 und T7 Promotersequenzen besitzt, kann damit *in vitro* transkribiert werden. Während der Transkriptionsreaktion wurde die entstehende RNA mit Digoxigenin-markiertem dUTP (DIG-dUTP) versetzt, und konnte dann mit einem gegen das Digoxigenin gerichteten Antikörper in der *in situ* Hybridisierung nachgewiesen werden (siehe Material und Methoden, Kapitel 4.4.4).

In der Tabelle 2 sind die RNA *in situ* Daten aller Kandidaten stichwortartig aufgelistet (zweite Spalte). Die Bilder der Expressionsmuster und der Expressionsprofile werden im Anhang gezeigt (Kapitel 6). In der dritten Spalte sind, falls vorhanden, Antikörperdaten aufgezeigt. Und in der vierten Spalte sind die im Weiteren verwendeten Mutationen oder P-Element Insertionen aufgelistet.

Genname	Lok. der RNA <i>in situ</i> Hybridisierung	Antikörper und/oder Antikörperdaten	verwendete Mutationen/P-Elemente	Referenzen
Gruppe 1: Protein-Protein Interaktionsdomänen				
CG17492	in frühen Stadien ubiquitär, ab St 11 in den soma. Muskelzellen	keine Antikörper vorhanden		Anhang, Kapitel 6.1
CG7991	nur Expressionsprofil vorhanden	keine Antikörper vorhanden		BDGP <i>in situ</i> hp
CG17064	ZNS und im Gehirn	an der mitotischen Spindel	P{PZ}drk ¹⁰⁶²⁶	(Bennett and Alphey, 2004), Kapitel 2.3.5 und Anhang, Kapitel 6.3
CG12340	nur Expressionsprofil vorhanden: Höchstwert im späten 11. Stadium	Im Kern; in der Mitose auch im Cytoplasma; in mit. NB vermehrt apikal		C.K., A.W. uvö.

2. Resultate

Genname	Lok. der RNA <i>in situ</i> Hybridisierung	Antikörper und/oder Antikörperdaten	verwendete Mutationen/P- Elemente	Referenzen
CG11148	nur Expressionsprofil vorhanden: Höchstwert bei St 5; Minimum bei St 9	keine Antikörper vorhanden		BDGP <i>in situ</i> hp
Gruppe 2: Mb/Cytoskelett-Assoziationsdomänen und Lipidbindungsmotive				
CG7739	in frühen Stadien ubiquitär, ab St 14 keine Expression mehr	apikal in Epithelzellen und NB	P{lacW}l(3)s1754, EY14009, GE24395	Kapitel 2.4 und Anhang, Kapitel 6.6
CG13034	in frühen Stadien ubiquitär, ab St 11 in den post. Spirakeln	keine Antikörper vorhanden		Anhang, Kapitel 6.7
Dys	hauptsächlich im Ektoderm, starke Färbung ab St 12	basal in Epithelzellen im Embryo, basal in Follikelzellen in den Ovarien		Kapitel 2.3.4 und Anhang, Kapitel 6.8 (Deng et al., 2003)
EG:80H7.5	ab Blastoderm ubiquitär	Antikörper wurde hergestellt; keine spezifische Färbung	P{GT1}EG:80H7.5 ^{BG02357}	Kapitel 2.3.2 und Anhang, Kapitel 6.9
Gruppe 3: Enzyme im Cytoplasma:				
CG16721	ubiquitär, ab St 10 vermehrt im Ektoderm	keine Antikörper vorhanden		Anhang, Kapitel 6.10
Dip2	nur Expressionsprofil vorhanden: hauptsächlich im Blastoderm St	keine Antikörper vorhanden		BDGP <i>in situ</i> hp
Lk6	keine <i>in situ</i> Daten vorhanden	Cytoplasma und an Zentrosomen	EP(3)3404, EP(3)3409	Kapitel 2.3.3 (Kidd and Raff, 1997)
Pp2A-29B	ubiquitär	Antikörper wurde hergestellt; apikal in Epithelzellen und NB	Df(2L)TE29Aa-11	Kapitel 2.3.1 und Anhang, Kapitel 6.13 M.M.-B., A.W. uvö.
CaBP	Blastoderm basal in allen Zellen, ab St 14 in den Garland Zellen	keine Antikörper vorhanden		Anhang, Kapitel 6.14
CG4759	nur Expressionsprofil vorhanden: während gesamter Entwicklung stark exprimiert	keine Antikörper vorhanden		BDGP <i>in situ</i> hp
dib	nur Expressionsprofil vorhanden: Höchstwert bei St 8	keine Antikörper vorhanden		BDGP <i>in situ</i> hp

Genname	Lok. der RNA <i>in situ</i> Hybridisierung	Antikörper und/oder Antikörperdaten	verwendete Mutationen/P- Elemente	Referenzen
Gruppe 4: Enzyme im Kern				
Ef1 α 48D	nur Expressionsprofil vorhanden: ab St 4 stark exprimiert	keine Antikörper vorhanden		BDGP <i>in situ</i> hp
Domino-B	ubiquitär	in allen Zellen im Kern		Anhang, Kapitel 6.18 (Ruhf et al., 2001).
CG9253	Blastoderm basal in allen Zellen, Stad. 11 im Mesoderm, Stad. 14 in Muskelzellen	keine Antikörper vorhanden		Anhang, Kapitel 6.19
CG6755	maternal, in Blastoderm in Steifen	keine Antikörper vorhanden		BDGP <i>in situ</i> hp
Nnp-1	ubiquitär, in späten Stadien in Sinnesorganen des Kopfes	keine Antikörper vorhanden	P{lacW}Nnp-1 ^{k07826}	Anhang, Kapitel 6.21
zf30C	bis St 8 ubiquitär, ab St 13 embryonales ZNS	keine Antikörper vorhanden	P{lacW}zf30C ^{k02506}	BDGP <i>in situ</i> hp
ash1	keine <i>in situ</i> Daten vorhanden	keine Antikörper vorhanden		
CG11844	ab St 13 Sinnesorgansystem im Kopf und unbekanntes Muster	keine Antikörper vorhanden		BDGP <i>in situ</i> hp
lilliputian	ubiquitär, in späten Stadien erhöht im Nervensystem	keine Antikörperdaten vorhanden		(Wittwer et al., 2001)
hunchback	Blastoderm, ab St 11 in Neuroblasten (NB)	anterior in frühen Stadien		BDGP <i>in situ</i> hp (Hulskamp et al., 1990)
Bx42	nur Expressionsprofil vorhanden: Höchstwert bei St 8	Antikörper wurde hergestellt		BDGP <i>in situ</i> hp
Gruppe 5: coiled coil Motiv(e)				
CG1962	maternal, St 7-8 in den Polzellen, St 13-16 im ZNS	Antikörper wurde hergestellt: gleiches Muster wie RNA <i>in situ</i>		BDGP <i>in situ</i> hp M. M.-B., A.W. uvö
CG4294	maternal	keine Antikörper vorhanden		BDGP <i>in situ</i> hp
CG14989	Expressionsprofil hoch ab St 14 Mesectoderm	keine Antikörper vorhanden		BDGP <i>in situ</i> hp (Artero et al., 2003)

Genname	Lok. der RNA <i>in situ</i> Hybridisierung	Antikörper und/oder Antikörperdaten	verwendete Mutationen/P- Elemente	Referenzen
Gruppe 6: ohne bekannte Domäne				
CG11164	Blastoderm ubiquitär, ab St 11 NB und GMZ	Antikörper wurde hergestellt		BDGP <i>in situ</i> hp
CG8230	nur Expressionsprofil vorhanden: eher schwach, stärker in späten Stadien	keine Antikörper vorhanden		BDGP <i>in situ</i> hp
CG10660	ab St 11 im Mitteldarm und in den malpigischen Gefäße	keine Antikörper vorhanden		BDGP <i>in situ</i> hp
CG1943	nur Expressionsprofil vorhanden Höchstwert in den St 5-9	keine Antikörper vorhanden		BDGP <i>in situ</i> hp

Vorherige Seite:

Tabelle 2: Gesammelte *in situ*- und Antikörperdaten der 34 Kandidatengene

In der ersten Spalte sind die 34 Kandidatengene aufgelistet. Die 2. Spalte beinhaltet die *in situ* Daten und die 3. Spalte Antikörperdaten. In der 4. Spalte werden verwendete Mutanten oder P-Element Insertionen aufgeführt und die letzte Spalte enthält die Referenzen zu den jeweiligen Daten.

hp = Homepage; St = Stadium; uvö. = unveröffentlicht; A.W. = Andreas Wodarz; C.K. = Carmen Koch; M.M.-B. = Marion Müller-Borg; ZNS = zentrales Nervensystem

Die Voraussetzung für eine gemeinsame Funktion von Bazooka und einem der Kandidaten in der asymmetrischen Zellteilung ist das Vorhandensein des jeweiligen Kandidaten in Neuroblasten zum fraglichen Zeitpunkt. Um diese Frage zu beantworten wurden die RNA *in situ* Daten in der Tabelle 2 zusammengestellt. Die RNAs der folgenden Kandidaten erfüllen dieses Kriterium nicht und können somit aus den weiterführenden Untersuchungen ausgeschlossen werden: CG17492, wird ab Stadium 11 nur noch in Muskelzellen exprimiert; CG11148, da die Expression ab Stadium 9 sehr niedrig ist; CG13034, wird ab Stadium 11 nur noch in der Anlage der post. Spirakeln und später in den Spirakeln exprimiert; Dip2, ist nur im Blastoderm exprimiert; CaBP, wird in den fraglichen Stadien nicht exprimiert; CG9253, wird ab Stadium 11 nur im Mesoderm exprimiert; CG11844, wird erst ab Stadium 13 exprimiert; CG1962, da es in den Polzellen exprimiert wird, CG4294, ist nur maternal exprimiert und später nicht mehr; CG10660, ist in den fragliche Stadien im Mitteldarm und in den Malpighischen Gefäßen exprimiert. Auch ash1 wurde ausgeschlossen, da eine Funktion des Proteins vor allem in den Imaginalscheiben beschrieben wurde (Tripoulas et al., 1994).

2.3 Weitergehende Analysen einiger Bindungspartner

Mit der Analyse der Expressionsmuster konnte zwar kein eindeutig NB-spezifisch exprimiertes Gen gefunden werden, aber es konnten einige Kandidaten ausgeschlossen werden, da sie nicht in NB exprimiert werden.

Im Folgenden werden die Kriterien aufgezählt, die benutzt wurden, um die noch große Anzahl an Kandidaten zu reduzieren.

Alle 23 Gene, die nach der Analyse der Expressionsmuster noch übrig geblieben sind, haben die Voraussetzungen, zusammen mit Bazooka eine Funktion bei der asymmetrischen Zellteilung der NB zu haben. Anzumerken ist, dass die Gene, von denen nur das Expressionsprofil vorhanden ist, noch auf ihr Expressionsmuster hin untersucht werden müssten. Diese 10 Kandidaten wurden alle vorerst aus den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

Das zweite Kriterium war, ob die vorhergesagte Proteinstruktur eines Interaktionspartners eine Funktion in der asymmetrischen Zellteilung vermuten lässt. Dies gilt vor allem für die Kandidaten, die in einer der ersten drei Gruppen eingeteilt wurden und noch nicht auf Grund ihres Expressionsmuster ausgeschlossen wurden. Auch hier gibt es eine Ausnahme: CG16721. Dieses Gen wurde vorerst nicht weiterbehandelt, da es sowohl in Maus wie auch im Menschen ausschließlich in den Hoden exprimiert wird und dort eine Funktion bei der Spermienproduktion ausübt (Ma et al., 2002).

Es bleiben sechs Bindungspartner übrig, auf die in den folgenden Kapiteln weiter eingegangen wird.

2.3.1 Pp2A-29B

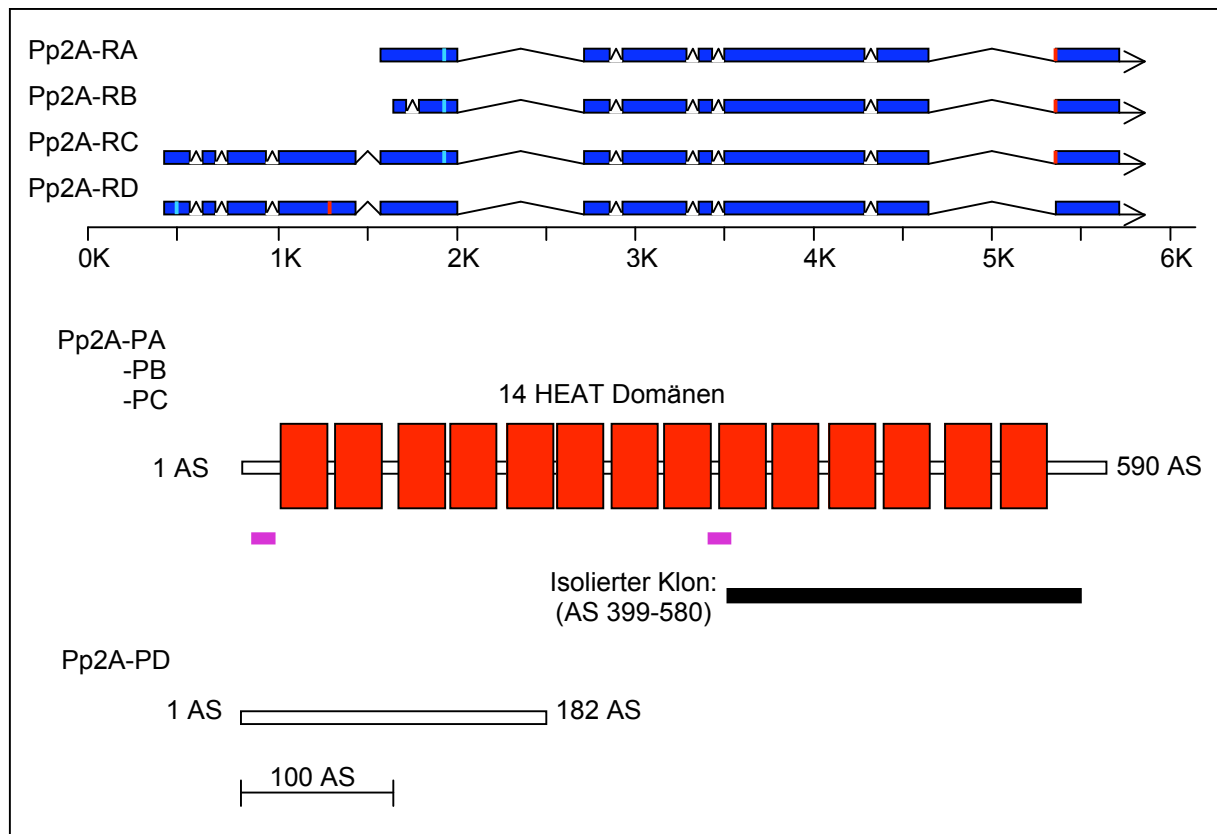


Abb. 2: Gen- und Proteinstruktur von Pp2A

In blau sind die verschiedenen Transkripte des Gens Pp2A-29B aufgezeichnet, die hellblauen Striche markieren die jeweiligen Start Kodons und die roten Striche die Stopp Kodons. Im unteren Bereich sind die Proteinstrukturen abgebildet. Die Transkription der ersten drei Transkripte (RA-RC) ergibt das gleiche Protein, das 14 HEAT Domänen enthält. Pp2A-RD ergibt ein Protein ohne bekannte Domänen. Der schwarze Balken symbolisiert den isolierten Klon. Die lila Balken zeigen die Position der Peptide für die Antikörperproduktion an.

Pp2A-29B gehört zu der Familie der Protein Phosphatasen, die in vielen Signaltransduktionsmechanismen eine Funktion haben (Janssens and Goris, 2001). Pp2A-29B besitzt 14 HEAT Wiederholungsdomänen von denen die letzten 5 Teil des isolierten Klons sind, genauer enthält der Klon die AS 399 bis 580 (Abb. 2). Da diese Phosphatase ein breites Spektrum an Funktionen hat ist es nicht erstaunlich, dass ihre RNA in allen Stadien in allen Zellen exprimiert wird (Anhang, Kapitel 6.13). Mayer-Jaekel et al. beschreiben, dass die Pp2A-29B in Stadium 9-11 Embryonen in NB exprimiert ist (Mayer-Jaekel et al., 1992).

Die Protein Phosphatase 2A besteht aus mehreren Untereinheiten, die in verschiedenen Geweben unterschiedlich zusammengesetzt sein können. Das Kernenzym besteht aus einer 36kDa großen katalytischen Untereinheit (PP2A_C) und einer regulatorischen Untereinheit mit einer molekularen Masse von 65kDa (PP2A_A).

Der isolierte Klon ist Teil der PP2A_A. An diesem Kernenzym kann eine dritte regulatorische Untereinheit binden, PP2A_B. Diese B-Untereinheit ist die variable Größe und bis heute wurden 4 verschiedene B-Protein-Familien entdeckt. Durch diese Variabilität kann die Pp2A in vielen verschiedenen Prozessen eine Rolle spielen, was durch spezifische Inhibitoren und genetischen Methoden in der Hefe, in *Drosophila* und in der Maus schon untersucht wurde. Zu diesen Prozessen gehören die Zellzyklusregulation, die Zellmorphologie und die embryonale Entwicklung. Auch an der Regulation von spezifischen Signaltransduktionswegen ist die Pp2A beteiligt (Janssens and Goris, 2001). Ein wichtiger Aspekt der Funktion dieses Proteins im Zusammenhang mit dieser Arbeit wurde von Nunbhakdi-Craig et al. 2002 beschrieben. In dieser Publikation wurde beschrieben, dass die Pp2A ein negativer Regulator der Bildung der Zonula Okkludens und auch der PKC ξ in MDCK Zellen ist (Nunbhakdi-Craig et al., 2002). In einer Antikörperfärbung mit Bazooka und der Pp2A kann eine Colokalisation der beiden Proteine beobachtet werden (Abb. 3). Um die Lokalisation der Pp2A zu sehen wurde ein Antikörper der Firma *Santa Cruz* (Santa Cruz, USA) benutzt, der gegen die PP2A-A α/β Untereinheit der menschlichen Pp2A gerichtet ist. Genauer gegen die AS 290-589, welche zu 69% identisch sind mit den AS 284-580 der Pp2A-29B. Für den Nachweis von Bazookas wurde der Ratten α Baz N-term benutzt. Wie in Abbildung 3 (A) zu sehen, colokalisiert die Pp2A mit Bazooka in der Epidermis von Embryonen des Blastoderm Stadiums sowie auch in späteren Stadien (B).

Trotz der hohen Ähnlichkeit der menschlichen Pp2A mit der *Drosophilas*, kann eine unspezifische Färbung nicht ausgeschlossen werden. Um dies ausschließen zu können wurde die Herstellung eines Antikörpers in Auftrag gegeben. Die Peptide, die zur Immunisierung benutzt wurden, sind in Abbildung 2 als lila Balken gekennzeichnet (siehe auch Anhang Kapitel 6.13.3). Färbungen mit diesen Antikörpern ergaben ähnliche Ergebnisse wie der PP2A-A α/β Antikörper, wobei zusätzlich eine starke apikale Färbung in den NB beobachtet werden konnte (Andreas Wodarz, unveröffentlicht).

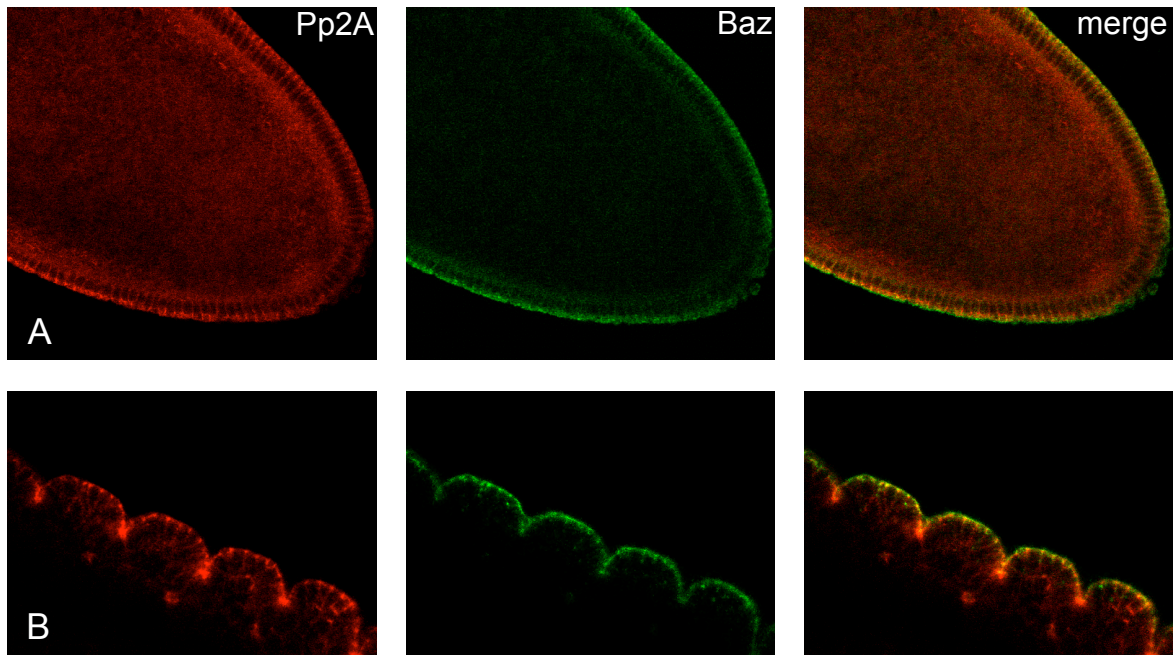


Abb. 3: Pp2A colokalisiert mit Baz im apikalen Cytocortex in Epithelzellen

(A) zeigt einen Embryo im blastodermalen Stadium und in (B) ist die Epidermis eines Embryos im Stadium 13 zu sehen.

Da noch keine Mutanten des Gens *pp2A-29B* beschrieben wurden, wurde die Funktion des Gens mit Hilfe einer Defizienz in der Region 29B untersucht: Df(2L)TE29Aa-11. Die Defizienz ist homozygot letal und eine Kutikulapräparation dieser homozygoten Embryonen ist in Abb. 4 gezeigt. Es können 2 verschiedene Klassen unterschieden werden: Die Kutikula in (A) besitzt keine Kopfstrukturen und ein großer Teil der dorsalen Epidermis fehlt. In (B) ist das Kopfskelett nur teilweise vorhanden und der Embryo ist nicht vollständig geschlossen, sodass ein dorsales Loch zu sehen ist (Pfeil).

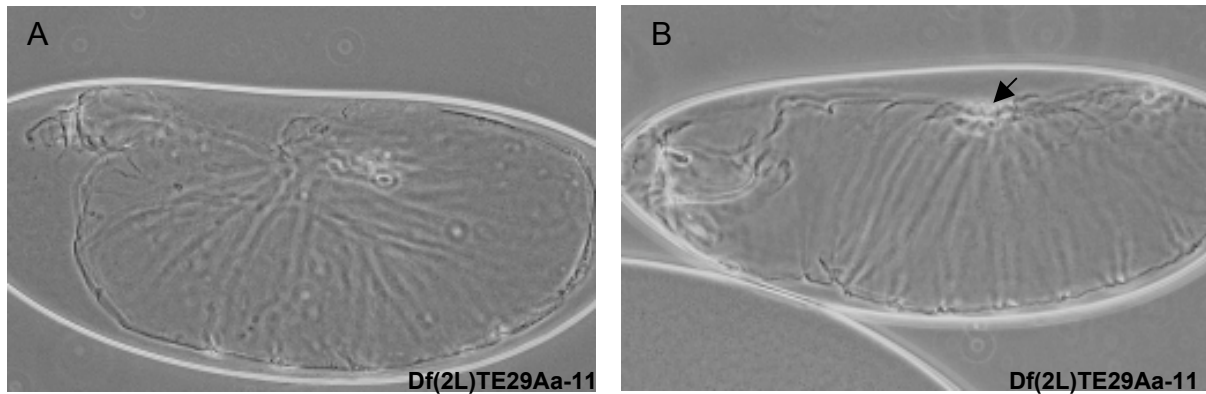


Abb. 4: Kutikulapräparation der Defizienz Df(2L)TE29Aa-11

In (A) ist die Kutikula eines Embryos zu sehen, der kein Kopfskelett besitzt und bei dem die Gastrulation nicht beendet wurde. Die Kutikula in (B) weist verglichen mit der Kutikula in (A) einen schwächeren Phänotypen auf. Es ist ein Rest Kopfskelett zu sehen und eine Loch im dorsalen Bereich (Pfeil).

Hier ist aber anzumerken, dass diese Defizienz nicht nur die Pp2A eliminiert, sondern auch noch viele weitere Gene, was eine Zuordnung dieses Phänotypen zu der Pp2A nicht möglich macht.

2.3.2 EG:80H7.5

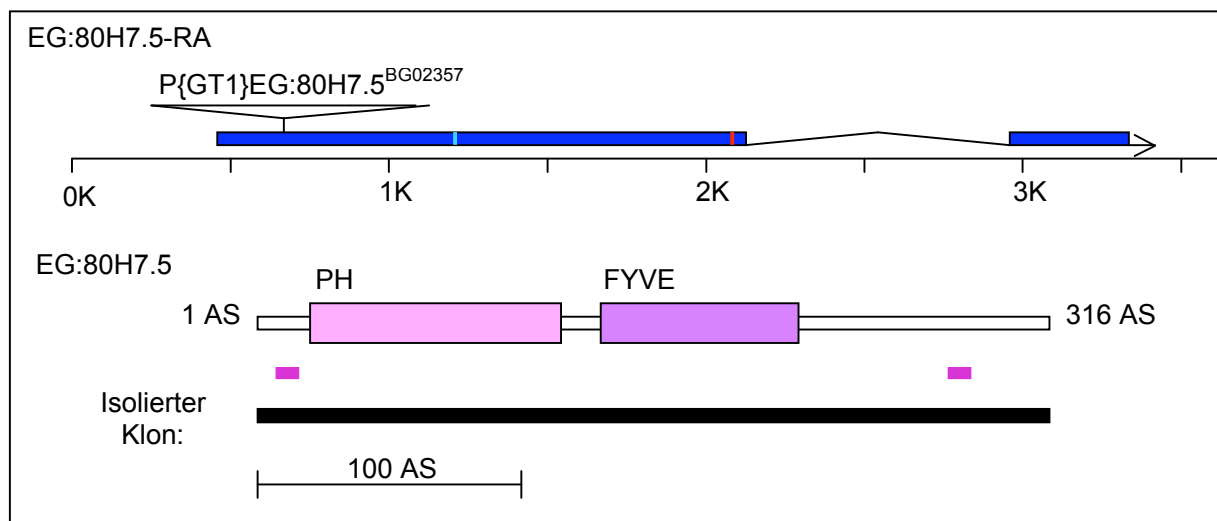


Abb. 5: Gen- und Proteinstruktur von EG:80H7.5

In blau ist das Transkript des Gens EG:80H7.5 aufgezeichnet, der hellblaue Strich markiert das Start Kodon und der rote Strich das Stopp Kodon. Im unteren Bereich ist die Proteinstruktur abgebildet. Der schwarze Balken symbolisiert den isolierten Klon. Die lila Balken zeigen die Position der Peptide für die Antikörperproduktion an. PH = Pleckstrin Homologie Domäne; FYVE = Fab1, YOTB, Vac1, und EEA1

EG:80H7.5 ist von *C. elegans* bis zu den Vertebraten hoch konserviert. Es hat eine Sequenzidentität zwischen *D. melanogaster* und *Homo sapiens* von mehr als 70 % über das ganze Protein verteilt. Es besteht hauptsächlich aus 2 Lipidbindungsdomänen, eine PH Domäne (AS 36-133) und eine FYVE Domäne (AS 144-213). Der isolierte Klon umfasst das gesamte Protein (AS 1-316) (Abb. 5). Die EG:80H7.5 RNA ist im Blastodermstadium asymmetrisch in apikalen Cytocortex der Zellen lokalisiert. In späteren Stadien wird eine erhöhte Färbung der Epidermis sichtbar (Anhang, Kapitel 6.9).

Die schon erwähnten Lipidbindungsdomänen sind insofern interessant, da diese beiden Domänen spezifisch an phosphatidierte Inositole binden, zum Beispiel Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂). Es konnte gezeigt werden, dass PIP₂ apikal in der Zellmembran von Epithelzellen lokalisiert sein kann (W. von Stein und A. Wodarz, unveröffentlicht). EG:80H7.5 könnte somit ein Bindeglied zwischen Bazooka und der apikalen Zellmembran sein.

Es ist ein Fliegenstamm erhältlich, der eine P-Element Insertion in der untranslatierten 5' Region von *EG:80H7.5* enthält, 512bp vor dem ATG (Abb. 5). Diese Fliegen sind homozygot lebensfähig und fruchtbar, was entweder darauf schließen lässt, dass dieses Gen nicht lebensnotwendig für den Embryo ist oder, dass das P-Element die Transkription der RNA und somit die Translation des Proteins nicht beeinflusst. Um dies zu testen wurden zwei RT-PCRs (siehe Material und Methoden Kapitel 4.2.6.2) durchgeführt (Abb. 6). Als erstes wurde getestet, ob noch ein Transkript des Gens *EG:80H7.5* hergestellt wird. Es wurde entweder aus wt Embryonen oder homozygoten P{GT1}*EG:80H7.5*^{BG02357} Embryonen mRNA extrahiert und damit eine RT-PCR gestartet (Abb.6, B, hellgrüne Pfeile in A), welche bewies, dass in beiden Extrakten ein Transkript des Gens vorhanden war. Danach stellte sich die Frage, ob das P-Element wirklich an der angegebenen Stelle inseriert worden war. Dies konnte mit einer zweiten RT-PCR eindeutig bejaht werden (Abb.6, C, dunkelgrüne Pfeile in A), da das berechnete 1200bp große DNA-Fragment nur in Embryonen mit dem P-Element (2) und nicht in wt Embryonen (3) amplifiziert wurde. Somit hat das Einfügen von P{GT1}*EG:80H7.5*^{BG02357} in die 5' Region von *EG:80H7.5* keine Auswirkung auf dessen Transkription.

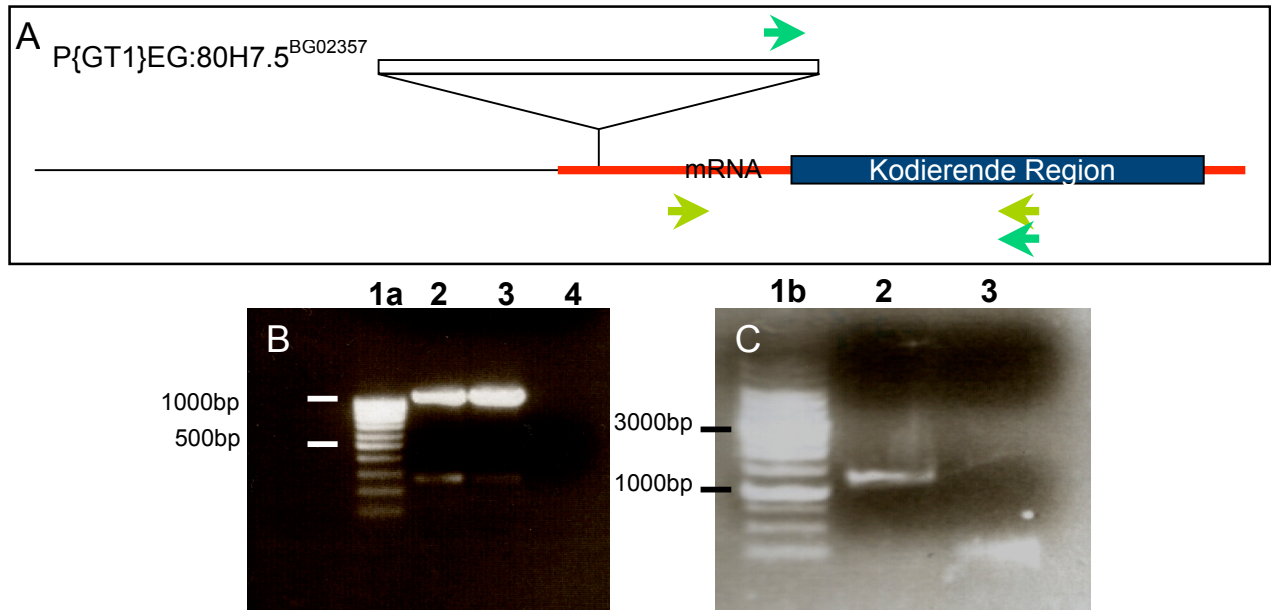


Abb. 6: Die Transkription der EG:80H7.5 RNA wird nicht durch P{GT1}EG:80H7.5^{BG02357} beeinflusst.

(A) zeigt eine schematische Zeichnung der Anordnung von P{GT1}EG:80H7.5^{BG02357} in Relation zu der mRNA von EG:80H7.5 und die beiden Primerpaare (Pfeile), die für die RT-PCR in (B) (hellgrün) und in (C) (dunkelgrün) benutzt wurden.

1a und 1b: Marker; 2: P{GT1}EG:80H7.5^{BG02357} mRNA; 3: wt mRNA; 4: ohne mRNA

2.3.3 LK6

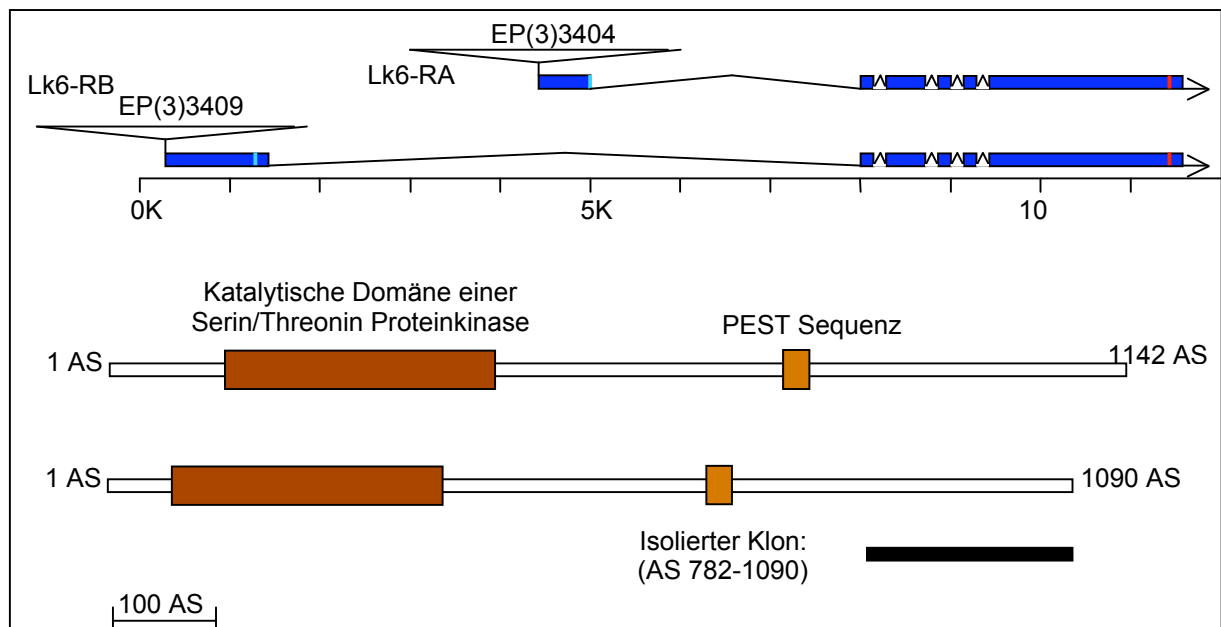


Abb. 7: Gen- und Proteinstruktur von Lk6

In blau sind die verschiedenen Transkripte des Gens Lk6 aufgezeichnet, die hellblauen Striche markieren die jeweiligen Start Kodons und die roten Striche die Stopp Kodons. Im unteren Bereich sind die Proteinstrukturen abgebildet. Beide Proteine sind bis auf den N-Terminus identisch, wobei dieser bei Lk6-RB nur aus 2 AS und bei Lk6-RA aus 54 AS besteht. Der schwarze Balken symbolisiert den isolierten Klon.

Die Serin/Threonin Kinase Lk6 wurde in einem Screen nach neuen Proteinen, die mit Mikrotubuli assoziieren, entdeckt. Es wurden 2 Formen des Proteins beschrieben, eine häufig vorkommende 185kD Form und eine seltener vorkommende 220kD Form, welche mit den Mikrotubuli assoziiert (Abb. 7). Zusätzlich zu der Kinase Aktivität enthält das Protein eine PEST-Domäne, die eine schnelle Degradation *in vivo* verursacht (Kidd and Raff, 1997).

Ein Antikörper gegen Lk6 (MBP-PCRH2) wurde freundlicherweise von Jordan W. Raff zu Verfügung gestellt und ist gegen den N-Terminus gerichtet (Abb. 8) (Kidd and Raff, 1997).

Die Assoziation mit den Zentrosomen konnten besonders in jungen Embryonen (Blastoderm Stadium) gut beobachtet werden (Abb. 8, A). Aber eine Kolo-kalisation mit Bazooka, entweder in Epidermiszellen oder in Neuroblasten, konnte nicht entddeckt werden. Zusätzlich scheint eine Überexpression Lk6s (Abb. 8, B) keine Veränderung in der Expression oder Lokalisation Bazookas zur Folge zu haben (Abb. 8, C).



Abb. 8: Lk6 lokalisiert an den Spindelpolen und eine Überexpression von Lk6 hat keinen Einfluss auf die Lokalisierung Bazookas.

(A) zeigt einen Embryo während der Anaphase der Kernteilung im Stadium des syncytialen Blastoderms. Lk6 zeigt eine gepunktete Anreicherung um die Spindelpole (rot). Die DNA wurde mit YoYo (grün) gefärbt. In (B) und (C) wurden Embryonen, die Lk6 in engrailed-Steifen überexprimieren, mit Lk6 (rot) und Baz (grün) gefärbt.

2.3.4 Dystrophin

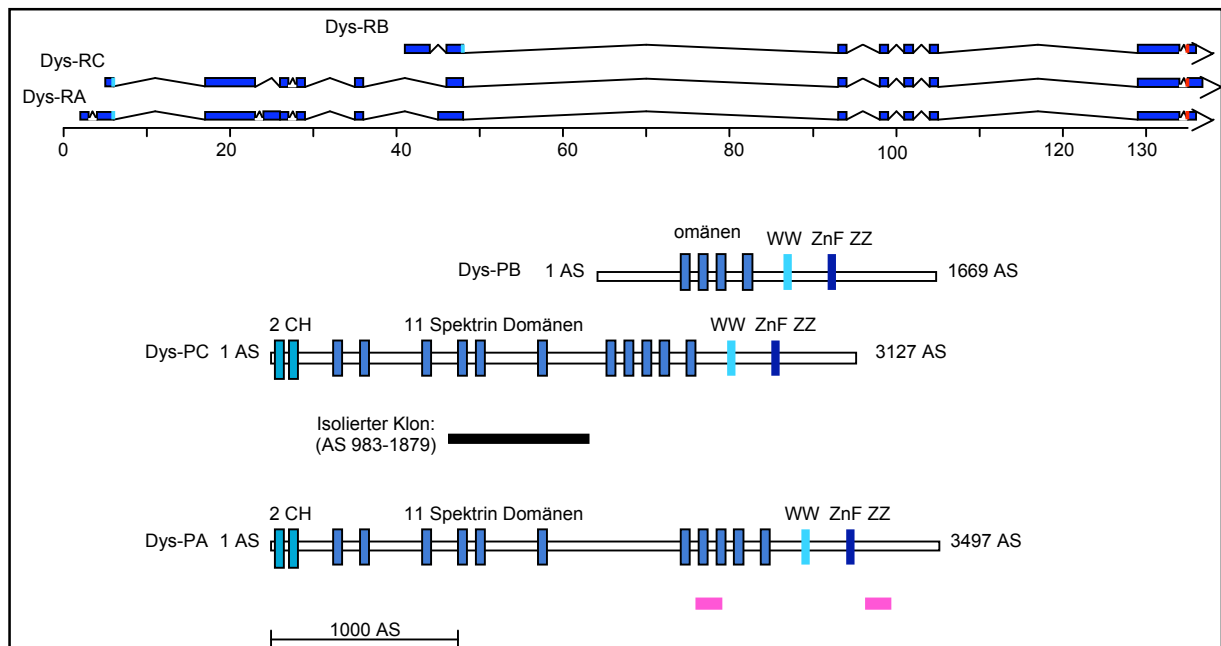


Abb. 9: Gen und Proteinstruktur von Dystrophin

In blau sind die verschiedenen Transkripte des Gens Dystrophin aufgezeichnet, die hellblauen Striche markieren die jeweiligen Start Kodons und die roten Striche die Stopp Kodons. Im unteren Bereich sind die Proteinstrukturen abgebildet. Der schwarze Balken symbolisiert den isolierten Klon. Die lila Balken zeigen die Position der Peptide für die Antikörperproduktion an.

Wie oben schon erwähnt ist Dystrophin ein großes cytoskelettales Protein, das durch Dystroglycan an die Plasmamembran gebunden ist. Es gibt 3 verschiedene Splicing-Formen der Dystrophin mRNA: Dys-RA, Dys-RB und Dys-RC (Abb. 9). Der isolierte Klon entspricht den AS 983 bis 1879 von Dys-PC und enthält die 4.-6. Spektrin Wiederholungs-Domänen. Das RNA Expressionsmuster der Dystrophin RNA sieht wie folgt aus: In jungen Embryonen kann wenig RNA detektiert werden, aber später wird die Expression stärker, wobei die Zellen des Ektoderms, das heißt Epidermis, Pharynx, Vorder- und Hinterdarm, am stärksten gefärbt sind (siehe Anhang, Kapitel 6.8.1).

Die Calponin Homologie (CH) Domänen sind Domänen, die Aktin binden. Spektrin Domänen werden in verschiedenen cytoskelettalen Proteinen gefunden, wie zum Beispiel Spektrin selbst oder Alpha-Actinin. Die WW-Domäne ist eine Protein-Protein Interaktionsdomäne und die Zink-bindende Domäne bindet in Dystrophin an Calmodulin, einen intrazellulären Calcium Rezeptor. Dystrophin ist das Bindeglied zwischen der Plasmamembran und dem Aktin Cytoskelett, da Dys einerseits an das

TMD-Protein Dystroglycan und andererseits mit den CH Domänen an Aktin bindet. Dystroglycan ist wichtig für die apikal-basale Polarität in Epithelzellen. Wird das Protein überexprimiert, kann eine Fehllokalisierung von Bazooka an die basolaterale Membran beobachtet werden (Deng et al., 2003).

Um die genaue Lokalisation des Dys Proteins zu erforschen wurde die Herstellung eines Antikörpers durch die Firma *Eurogentec* (Seraing, Belgien) in Auftrag gegeben. Zur Immunisierung wurden 2 Peptide benutzt: EP023002, das den AS 2366-2380 entspricht und EP023001, das den AS 3164-3178 entspricht. EP023002 liegt in der achten Spektrin Domäne und EP023001 liegt hinter der Zink-bindenden Domäne im C-Terminus von Dystrophin (Abb. 9, lila Balken).

Es wurden 2 Hasen (Nr. 733 und Nr. 734) mit den beiden Peptiden injiziert und die Antikörper wurden nach der letzten Blutung zusätzlich affinitätsgereinigt. Somit entstanden vier Antikörper, die in Westernblots und an wt Embryonen getestet wurden. Es konnten keine überzeugenden proteinbiochemischen Daten gesammelt werden, da das Protein Dys zu groß ist um auf einem Westernblot sauber erkannt zu werden.

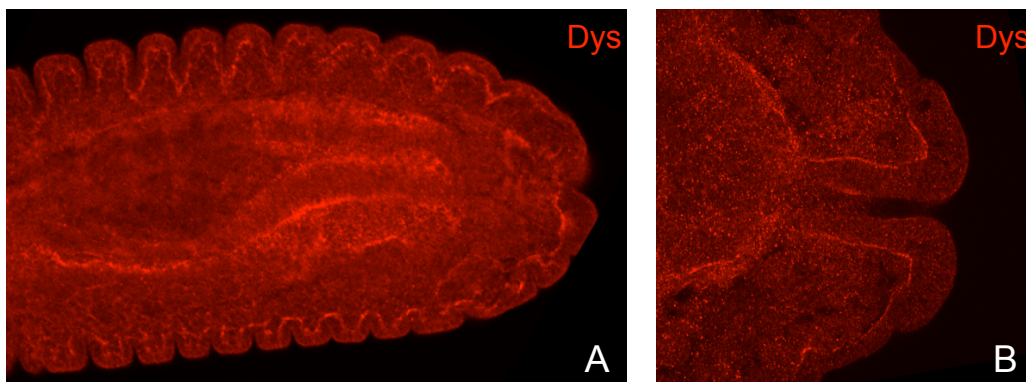


Abb. 10: Dystrophin lokalisiert basal in den Epidermiszellen

(A) zeigt eine dorsale Ansicht eines Embryos im 14. Stadium und in (B) ist eine Vergrößerung des Rektums desselben Embryos gezeigt, gefärbt mit dem Antikörper EP023002.

Die Färbungen an Embryonen waren erfolgreich. Der affinitätsgereinigte Antikörper EP023002, und etwas schwächer auch die letzte Blutung des Hase Nr. 734, zeigten eine spezifische Färbung.

Dystrophin ist in vielen embryonalen Geweben exprimiert, unter anderem auch in der Epidermis (Abb. 10, A). In der Epidermis ist Dystrophin, wie auch Dystroglycan basal am Cytocortex lokalisiert (Abb. 10, B).

Dr. Martina Schneider (Universität Lund, Schweden) konnte zudem zeigen, dass der Antikörper EP023002 spezifisch ist. Sie hat ein hairpin-Konstrukt von Dys hergestellt. Diese Konstrukt führt zur Bildung doppelsträngiger RNA, die durch die RNAi Maschinerie erkannt wird und die Degradation der endogenen Dys RNA nach sich zieht. Dieses hairpin-Konstrukt wurde in Flügel-Imaginalscheiben exprimiert und eine deutliche Reduktion des Dys Proteins wurde beobachtet (persönliche Mitteilung). Es wurde eine Kollaboration mit Dr. Schneider gestartet, die zu einer gemeinsamen Publikation über das Protein Perlecan führen wird. Perlecan bindet in der extrazellulären Matrix an Dystroglycan und ist für die Lokalisation Dystroglycans und Dystrophins basal im Epithel der Follikelzellen verantwortlich (M. Schneider, unveröffentlicht).

2.3.5 CG17064

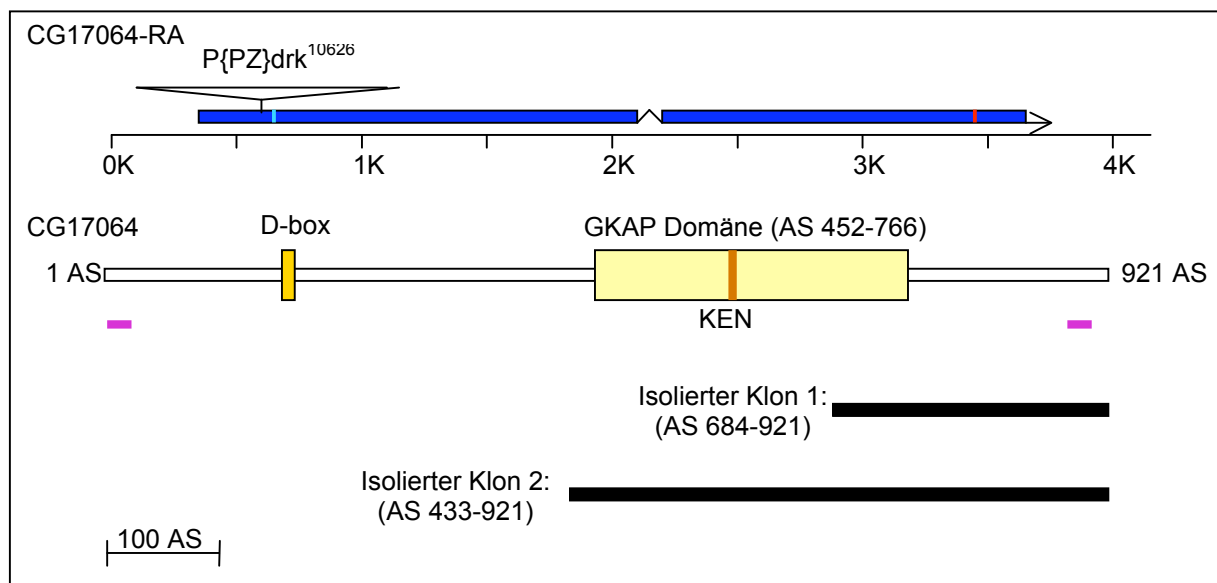


Abb. 11: Gen- und Proteinsequenz von CG17064

In blau ist das Transkript des Gens CG17064 aufgezeichnet, der hellblaue Strich markiert das Start Kodon und der rote Strich das Stopp Kodon. Im unteren Bereich ist die Proteinstruktur abgebildet. Die schwarzen Balken symbolisieren die isolierten Klone. Die lila Balken zeigen die Position der Peptide für die Antikörperproduktion an.

CG17064 ist ein vorhergesagtes Protein von 921 AS, das eine GKAP Domäne (AS 452-766) besitzt, sowie eine KEN-BOX (Lys-Glu-Asn-Box, AS 599-601) und eine D-BOX (destruction box, AS 168-176) (Abb. 11). Letztere sind Erkennungssignale für den „anaphase promoting complex“ (APC). Der APC ist eine Ubiquitin Ligase, die für den zellzyklusspezifischen Abbau von Proteinen verantwortlich ist. Es wurde noch nicht überprüft, ob CG17064 auch zellzyklusspezifisch abgebaut wird, wobei zu erwähnen ist, dass eine gewisse Reduktion des Proteins in der Interphase beobachtet werden kann (siehe unten) und dass das menschliche Homolog von CG17064, HURP (hepatoma up-regulated protein), auch zellzyklusspezifisch abgebaut wird. Zusätzlich ist HURP an Spindelpolen lokalisiert und ist wichtig für die Zell Proliferation (Tsou et al., 2003).

Wie bereits erwähnt, ist die GKAP Domäne wichtig für Protein-Protein Interaktionen. GKAP wurde in einem Screen gefunden, bei dem neue Interaktionspartner für das Protein PSD-95 gesucht wurden (Kim et al., 1997). PSD-95 ist ein so genanntes MAGUK Protein. Ein weiteres prominentes MAGUK Protein ist Stardust (Sdt). Sdt ist zusammen mit Crumbs an der subapikalen Region lokalisiert und spielt eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der apikal-basalen Polarität (Bachmann et al., 2001; Grawe et al., 1996; Hong et al., 2001; Knust et al., 1993; Tepass and Knust, 1993). Da der PAR/aPKC Komplex in Epithelzellen apikal am Crumbs Komplex angrenzt, ist eine Bindung beider Komplexe durchaus wahrscheinlich und CG17064 könnte das Bindeglied zwischen Bazooka und Sdt sein. Dies wurde in dieser Arbeit mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid Systems getestet, aber es konnte keine direkte Interaktion zwischen Sdt und CG17064 festgestellt werden.

Im Hefe-2-Hybrid Screen wurden 2 verschiedene Klone isoliert. Einer, der die GKAP Domänen enthält (AS 433-921) und ein kürzerer Klon, der die letzten 237 AS des Proteins enthält (Abb. 11, unten). Die Bindung von Bazooka an CG17064 findet somit hinter der GKAP Domäne, im C-Terminus des Proteins, statt.

Es ist ein Fliegenstamm erhältlich, der eine P-Element Insertion enthält, die nur 20bp vor dem ATG von CG17064 lokalisiert ist: P{PZ}drk¹⁰⁶²⁶ (Abb. 11, oben). Eine Kutikulapräparation dieser P-Element Insertionslinie ist in Abbildung 12 gezeigt. Es kann eine kontinuierliche, aber unvollständige, Kutikula beobachtet werden. Die Zähnchenbänder, wie auch das Kopfskelett fehlen ganz und zusätzlich ist eine Drehung um die Längsachse im anterioren Bereich der Kutikula zu erkennen.

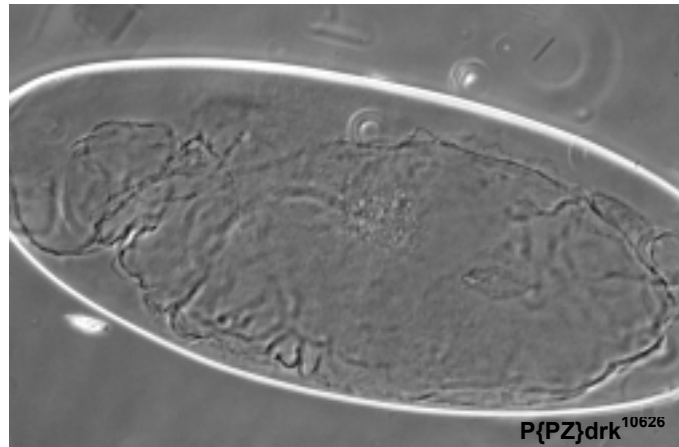


Abb. 12: Kutikulapräparation der P-Element Insertionslinie P{PZ}drk¹⁰⁶²⁶

Es ist ein kontinuierlicher Rest Kutikula vorhanden, der kein Kopfskelett und keine Zähnenbänder aufweist. Zusätzlich ist eine Verdrehung zu sehen (Pfeil).

Um die Lokalisierung des CG17064 Proteins zu untersuchen wurde die Herstellung eines Antikörpers in Auftrag gegeben. Die Firma *Eurogentec* (Seraing, Belgien) synthetisierte zwei Peptide, die zur Immunisierung verwendet wurden. Das erste Peptid entsprach den AS 2-16 und das Zweite den AS 906-921 (Abb. 11, lila Balken). Die beiden Peptide wurden jeweils zusammen in 2 verschiedene Hasen injiziert und nach der Blutentnahme wurde das Serum noch zusätzlich affinitätsgereinigt. Die beiden Seren und die zwei affinitätsgereinigten Antikörper wurden überprüft ob sie spezifisch für CG17064 sind. In Westernblots, wie auch in Färbungen, werden mit dem Serum aus dem 2. Hasen (Nr. 738) die besten Resultate erzielt.

In Abb. 13 ist ein Westernblot gezeigt, in dem die neuen Antikörper gegen CG17064 getestet wurden. Nur die letzte Blutung des Hasen 738 erkennt eine Bande bei ca. 100kD, die der errechneten Größe von CG17064, 102kD, entspricht. Die letzte Blutung des Hasen Nr. 737, wie auch der affinitätsgereinigte Antikörper EP023006 erkennen nur eine kleinere Bande bei ca. 50kD. EP023005 erkennt keine Banden.

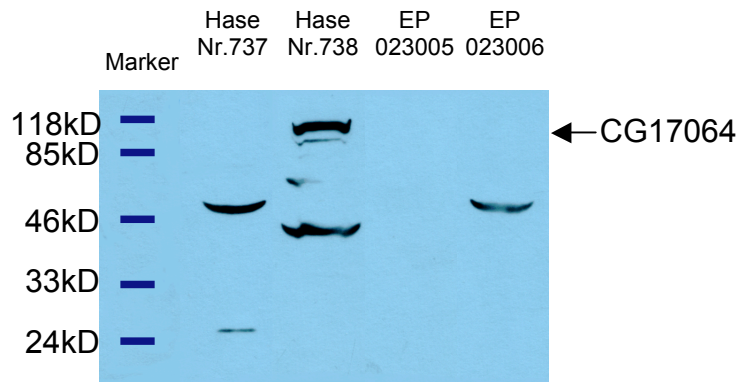


Abb. 13: Die letzte Blutung des Hasen Nr. 738 erkennt eine Bande bei ca. 100kD

Gezeigt ist eine Westernblot mit Proteinextrakt aus wt Embryonen. Die ersten beiden Spuren wurden mit den letzten Blutungen der Hasen Nr. 737 und 738 in der Verdünnung 1:1000 gemacht und die 3. und 4. Spur zeigen die affinitätsgereinigten Antikörper, in einer Verdünnung von 1:500.

In Antikörperfärbungen an wt Embryonen kann eine Färbung schon im Stadium des syncytialen Blastoderms, wenn die Kerne sich synchron teilen und noch nicht an den Cortex des Eis gewandert sind, beobachtet werden. In der Prophase der Mitose ist CG17064 an den Spindelpolen angereichert (Abb. 14, A. Pfeil). Während der Metaphase verteilt sich CG17064 auf der gesamten Spindel (Abb. 14, B). Sobald die Anaphase beginnt, zieht sich CG17064 zurück an die Spindelpole (Abb. 14, C+D).

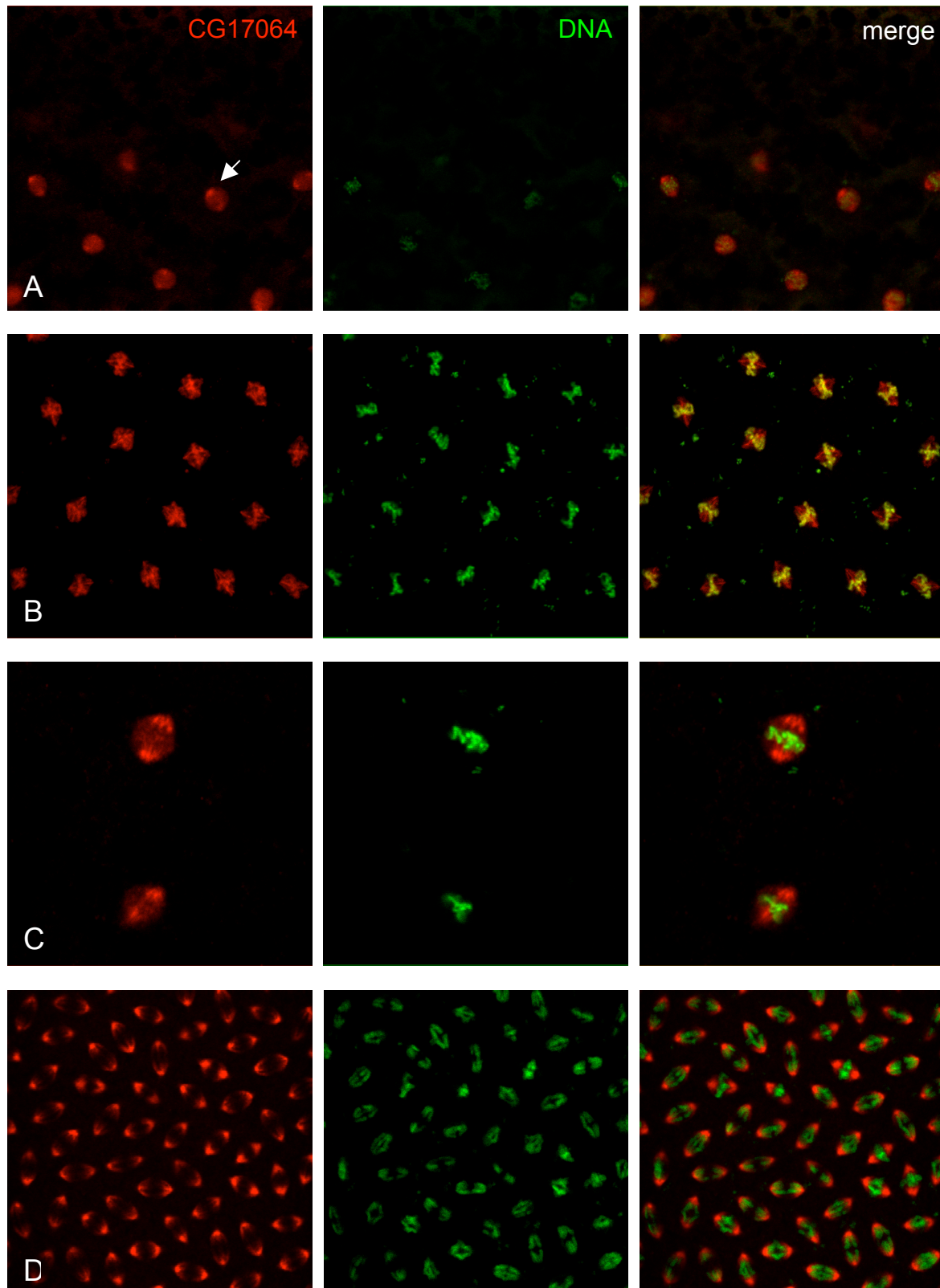


Abb. 14: Im Blastoderm assoziiert CG17064 mit der mitotischen Spindel

In (A) sind Kerne in der Prophase gezeigt, schon hier kann eine Erhöhung von CG17064 an den Spindelpolen (Pfeil) gesehen werden. (B+C) In der Metaphase ist CG17064 an der ganzen Spindel zu sehen und (D) in der Anaphase ist CG17064 zum größten Teil an den Spindelpolen zu finde, aber auch schwächer an der ganzen Spindel.

In Abbildung 15 wurde ein wt Embryo mit CG17064, α Tubulin und YoYo (DNA Farbstoff) gefärbt. Gut zu erkennen sind die einzelnen Chromosomen, die zu den beiden Polen gezogen werden. Das α Tubulin färbt die polaren Mikrotubuli, die sich in dieser Phase der Mitose verlängern, und CG17064 ist an den Spindelpolen lokalisiert.

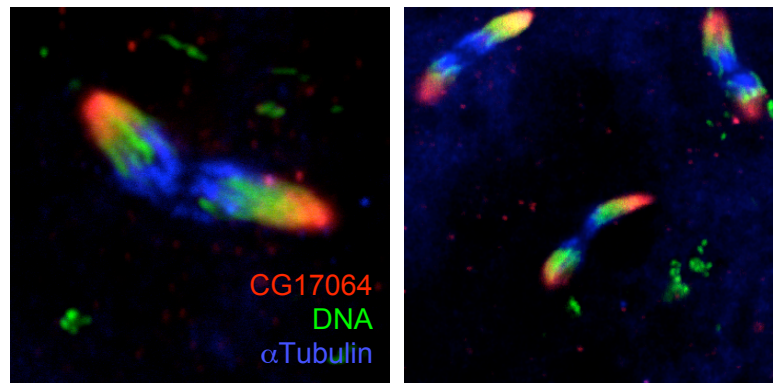


Abb. 15: CG17064 assoziiert mit den Spindelpolen in der Anaphase der mitotischen Zellteilung

Zu sehen ist ein Embryo in der Anaphase der Kernteilung im Stadium des syncytialen Blastoderms.

Diese Lokalisation von CG17064 an der Spindel und den Spindelpolen in der Mitose kann nicht nur in Embryonen des Blastodermstadiums, sondern in allen sich teilenden Zellen während der ganzen Embryogenese beobachtet werden.

In Abbildung 16 sind Neuroblasten in verschiedenen Phasen der Mitose aufgezeigt, die mit CG17064 und YoYo gefärbt wurden. In der Metaphase ist CG17064 an der ganzen Spindel assoziiert und in der Anaphase nur noch an den Spindelpolen. Wobei hier immer auch eine gewisse Colokalisation mit der DNA beobachtet werden kann.

In (B, Pfeil) ist zusätzlich eine sich teilende Epidermiszelle zu sehen, bei der CG17064 auch an der Spindel lokalisiert ist.

Anzumerken ist, dass auch in allen Interphasezellen eine sehr schwache und diffuse Färbung von CG17064 im Cytoplasma beobachtet wurde, was auf eine zellzyklusspezifische Regulation des Proteins schließen lässt.

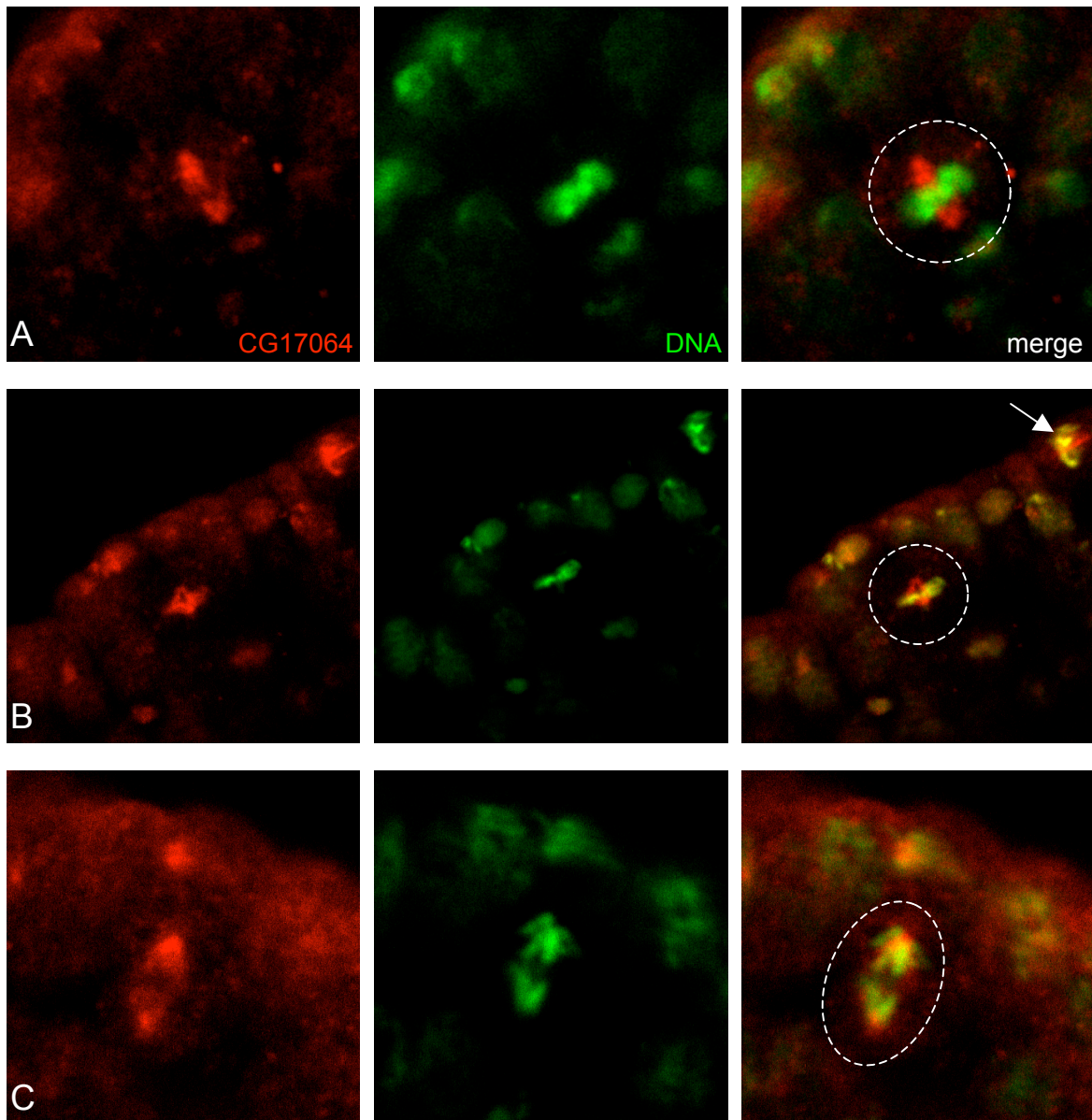


Abb. 16: Auch in Neuroblasten assoziiert CG17064 mit der Spindel während der Mitose

(A+B) Genau wie im Blastoderm ist auch in NB (weiß gestrichelte Kreise) CG17064 während der Metaphase und (C) in der Anaphase an der Spindel lokalisiert. In (B) kann zusätzlich beobachtet werden, dass CG17064 in allen Zellen in der Metaphase an die Spindel bindet, hier eine Epidermiszelle (Pfeil).

Eine Colokalisation mit Bazooka konnte in keiner der Färbungen beobachtet werden.

2.4 CG7739

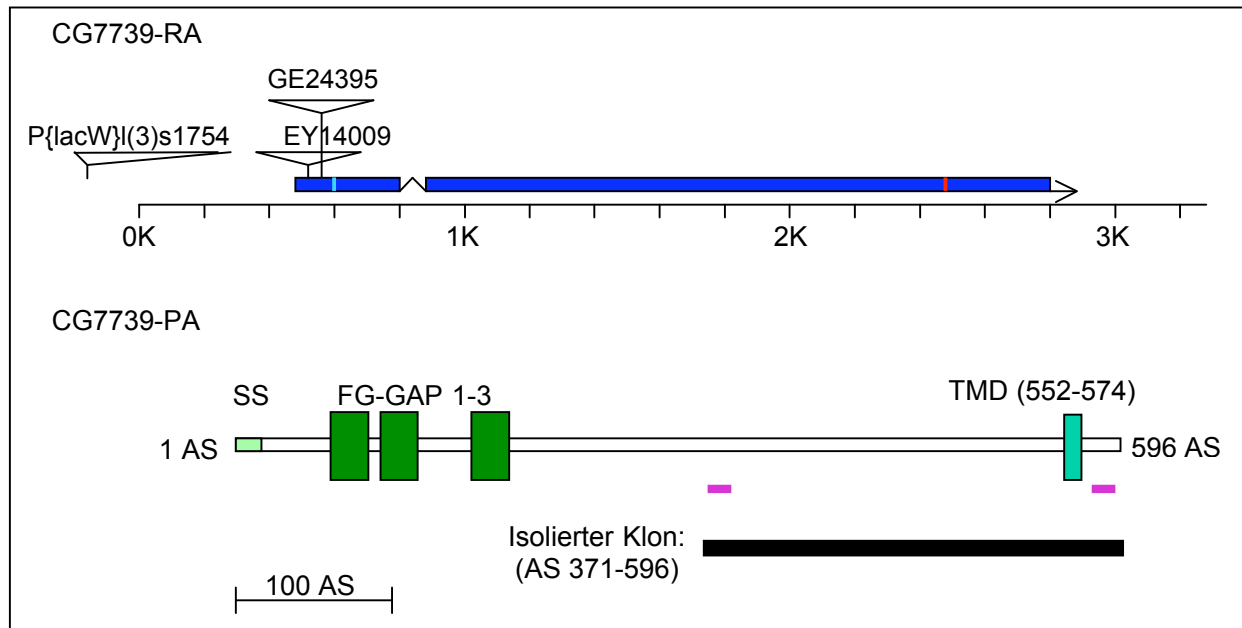


Abb. 17: Gen- und Proteinsequenz von CG7739

In blau ist das Transkript des Gens CG7739 aufgezeichnet, der hellblaue Strich markiert das Startkodon und der rote Strich das Stoppkodon. Im unteren Bereich ist die Proteinstruktur abgebildet. FG-GAP steht für 2 konservierte Regionen: Phe-Gly und Phe-Ala-Gly; SS = Signalsequenz. Die schwarzen Balken symbolisieren die isolierten Klone. Die lila Balken zeigen die Position der Peptide für die Antikörperproduktion an.

Wie schon in der Einleitung erwähnt ist der PAR/aPKC Komplex im Cytocortex der Epidermis und auch der Neuroblasten lokalisiert. Wie diese Proteine an das Cytoskelett oder an die Plasmamembran binden, konnte noch nicht gezeigt werden. CG7739 könnte ein Kandidat für diese Funktion sein, da es eine TMD besitzt (Abb. 17). Zusätzlich ist die ganze Proteinsequenz, im speziellen aber der intrazelluläre C-Terminus, evolutionär hoch konserviert. Es wurden unter anderem Homologe beim Menschen, der Maus und in *C. elegans* gefunden. Die Aminosäuresequenz des C-Terminus ist in Abbildung 18 aufgezeigt. 14 der 22 AS sind identisch zwischen dem menschlichen Homolog TIP und CG7739.

In der extrazellulären Domäne werden ein Signalpeptid und 3 FG-GAP Domänen vorhergesagt. FG-GAPs sind Domänen, die am N-Terminus von Integrin alpha Ketten gefunden wurden, eine Region, die wichtig für die Ligandenbindung ist.

Der isolierte Klon enthält die AS 371-596 von CG7739, was einem großen extrazellulären Teil, der TMD und dem intrazellulären C-Terminus entspricht. Um eine nicht physiologische Bindung auszuschließen wurde ein Konstrukt, das nur aus

den letzten 22 AS von CG7739 besteht, hergestellt. Im Hefe-2-Hybrid System wurde eine Interaktion des N-Terminus von Bazooka mit den C-Terminus von CG7739 bestätigt.

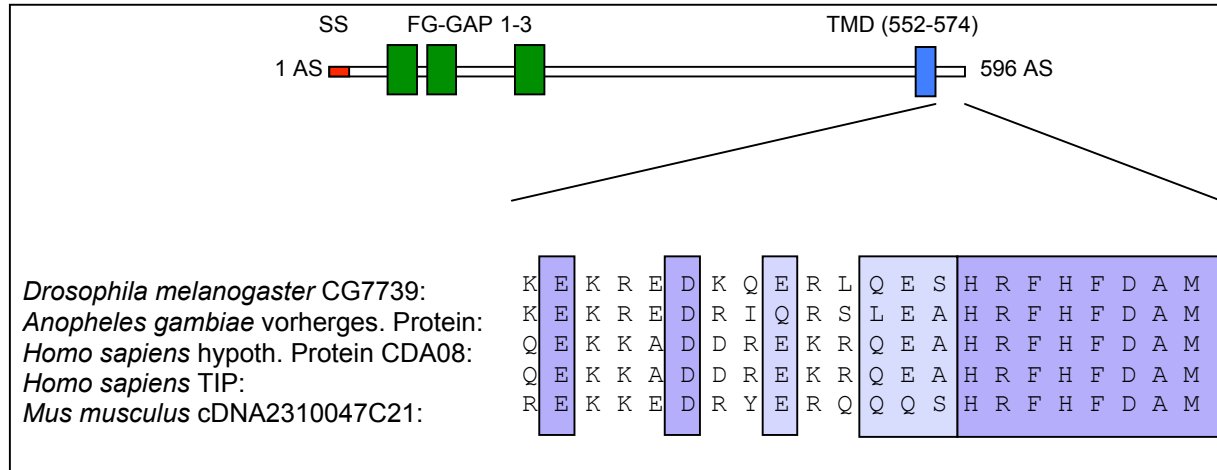


Abb. 18: Schematische Darstellung der Proteinsequenz von CG7739

Die Aminosäuresequenz des C-Terminus ist im unteren Teil aufgeführt. Dunkelviolette Kästen markieren 100% identische AS und hellviolette Kästen beschreiben zu 80% homologe AS. (SS=Signalsequenz)

2.4.1 Westernblot-Analyse mit den Antikörpern gegen CG7739

Um zu untersuchen, ob eine physiologische Interaktion zwischen CG7739 und Bazooka besteht, wurde die Herstellung eines Antikörpers in Auftrag gegeben. Die Firma *Eurogentec* (Seraing, Belgien) synthetisierte zwei Peptide, die zur Immunisierung verwendet wurden. Das erste Peptid entsprach den AS 433-447 im extrazellulären Bereich des Proteins und das Zweite den letzten 14 Aminosäuren von CG7739 (Abb. 18, lila Balken). Beide Peptide wurden in 2 Hasen (Hase 735 und 736) injiziert und die Antikörper in der letzten Blutung wurden zusätzlich mit den jeweiligen Peptiden affinitätsgereinigt. Der Hase Nr. 736 hat keine Antikörper gegen CG7739 produziert. In einem Westernblot mit Proteinextrakt aus wt Embryonen konnte mit der letzten Blutung des anderen Hasen (Hase 735) eine Bande bei 65kD, eine bei ca. 40kD und ein sehr breites Signal zwischen ca. 43kD und 49kD nachgewiesen werden (Abb. 19, Mitte). Da das pre-immun Serum keine Banden aufweist und die errechnete Größe von CG7739 67kD beträgt, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der 65kD Bande um das vollständige Protein CG7739 handelt. Der

affinitätsgereinigte Antikörper, der gegen den C-Terminus (EP023003) gerichtet ist, erkennt die gleichen Banden wie der Hase 735 aber ohne das breite Signal um 46kD herum (Abb. 19, rechte Seite). Nur das breite Signal erkennt der andere affinitätsgereinigte Antikörper, der gegen das extrazelluläre Peptid (EP023004) gerichtet ist (Abb. 19, linke Seite).

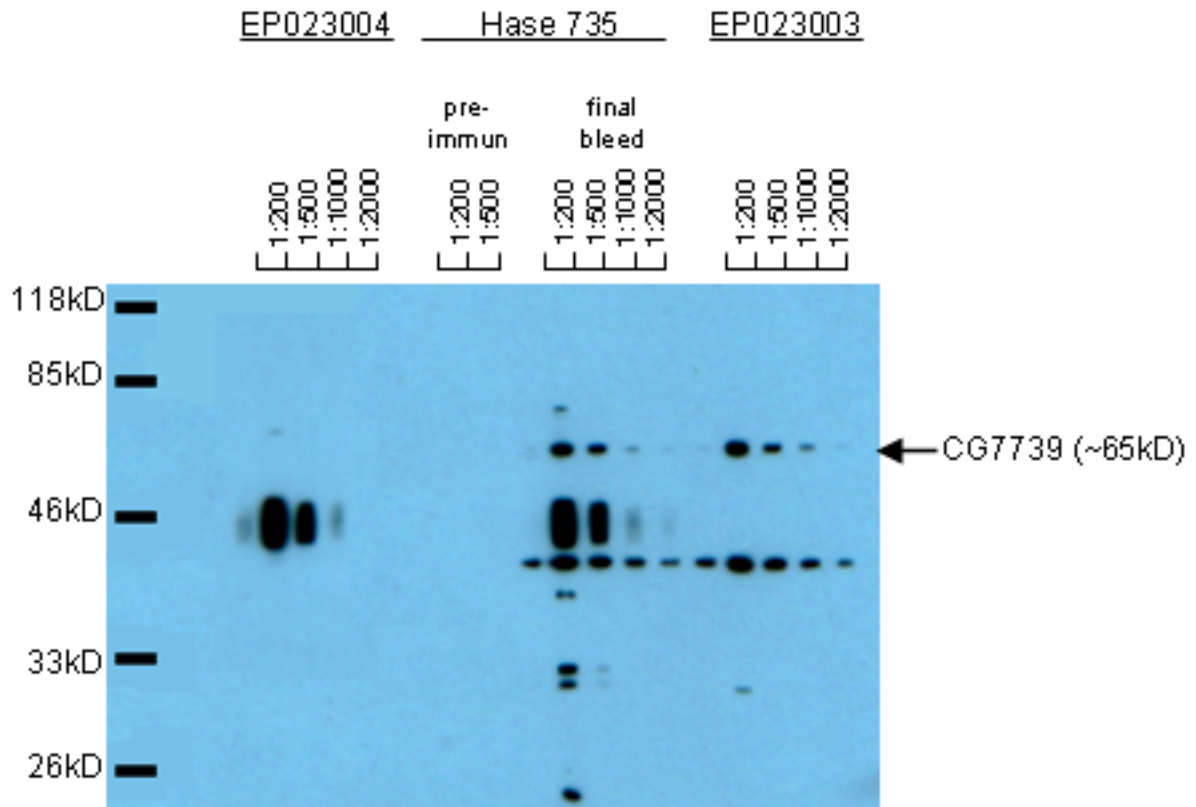


Abb. 19: Der affinitätsgereinigte Antikörper EP023003 gegen den C-Terminus von CG7739 erkennt eine spezifische Bande bei 65kD

Ein Westernblot mit wt Embryonenextrakt wurde durchgeführt um die verschiedenen Antikörper gegen CG7739 zu testen. EP023003 und EP023004 sind die affinitätsgereinigten Antikörper. Die Zahlen entsprechen den jeweiligen Verdünnungen.

Alle 4 Antikörper (letzte Blutungen und affinitätsgereinigte Antikörper) wurden auch in Färbungen an Embryonen getestet. Es wurden ähnliche Resultate erzielt wie beim proteinbiochemischen Versuch: In Färbungen mit der letzten Blutung des Hasen 736 konnte keine spezifische Färbung erkannt werden. EP023004 ergab eine diffuse und schwache Färbung und die letzte Blutung des Hasen 735 zeigte eine sehr schwache, wenn auch spezifische Färbung. Am besten funktionierte der affinitätsgereinigte

Antikörper gegen den intrazellulären C-Terminus. Dieser Antikörper wurde in allen weiteren Färbungen benutzt.

2.4.2 Färbungen an Embryonen

Das Protein CG7739 kann schon während des syncytialen Blastoderms beobachtet werden. Dort lokalisiert es in der Mitose an der Spindel (Abb. 20, A). Schon während der Entstehung der Plasmamembran wird CG7739 apikal am Cytocortex relokalisiert. Zusätzlich kann ein geringer Teil des Proteins auch lateral in der Plasmamembran beobachtet werden, während diese lateral wächst (Abb. 20, B).

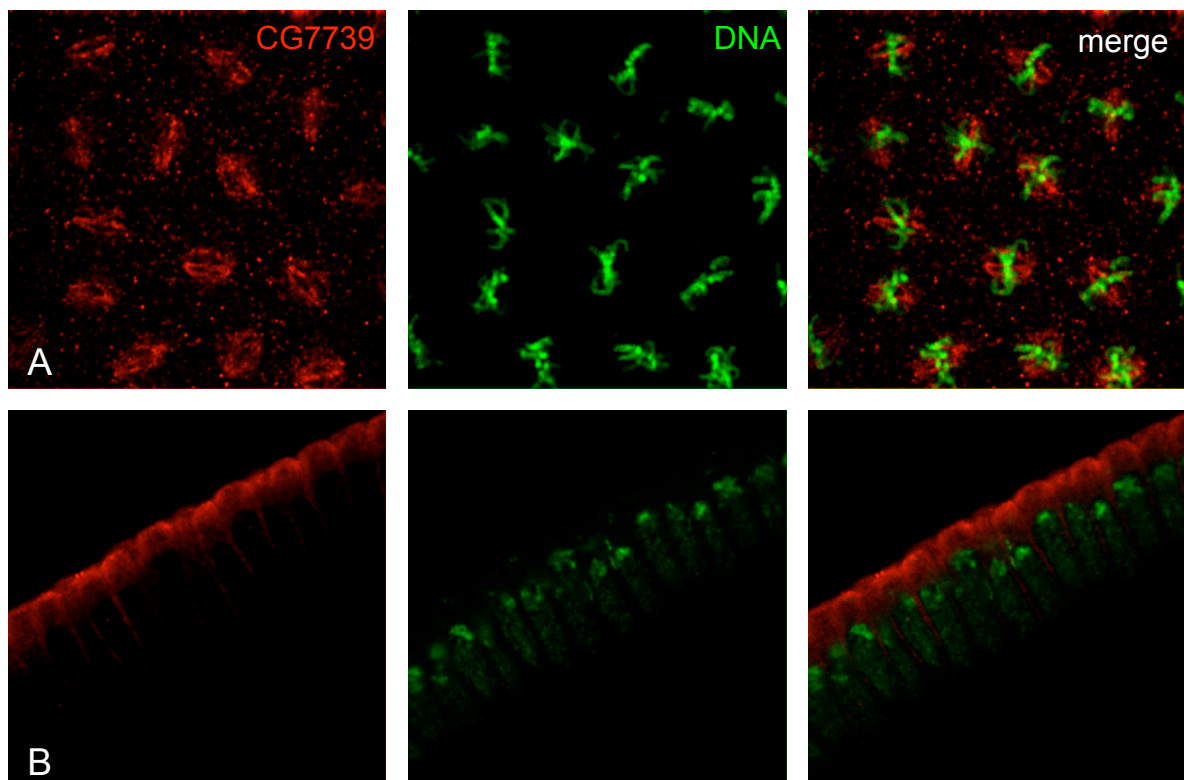


Abb. 20: CG7739 lokalisiert an der Spindel in mitotischen Zellen und an der apikalen Membran in der Interphase

(A) zeigt einen Embryo Blastoderm Stadium, dessen Kernen sich in der Metaphase befinden. CG7739 ist an der Spindel lokalisiert. (B) Während der Zellularisierung befindet sich CG7739 an der Zellmembran, hauptsächlich apikal aber auch schwach lateral. Hier und in allen nachfolgenden Färbungen mit CG7739 wurde mit dem Antikörper EP023003 in einer Verdünnung von 1:500 gefärbt. Fixiert wurden die Embryonen, wenn nicht anders angegeben, mit 4% Formaldehyd.

In der weiteren Entwicklung des Embryos ist CG7739 überwiegend in den Zellen des Ektoderms exprimiert und in diesen am stärksten in der Epidermis, aber auch im Proventrikulus und im Hinterdarm (Abb. 21, A+B).

Fixiert man die Embryonen mit der Hitze Fixierungsmethode, kann im Stadium 17 eine starke Färbung des Zentralen Nervensystems beobachtet wurden (Abb. 21, C).

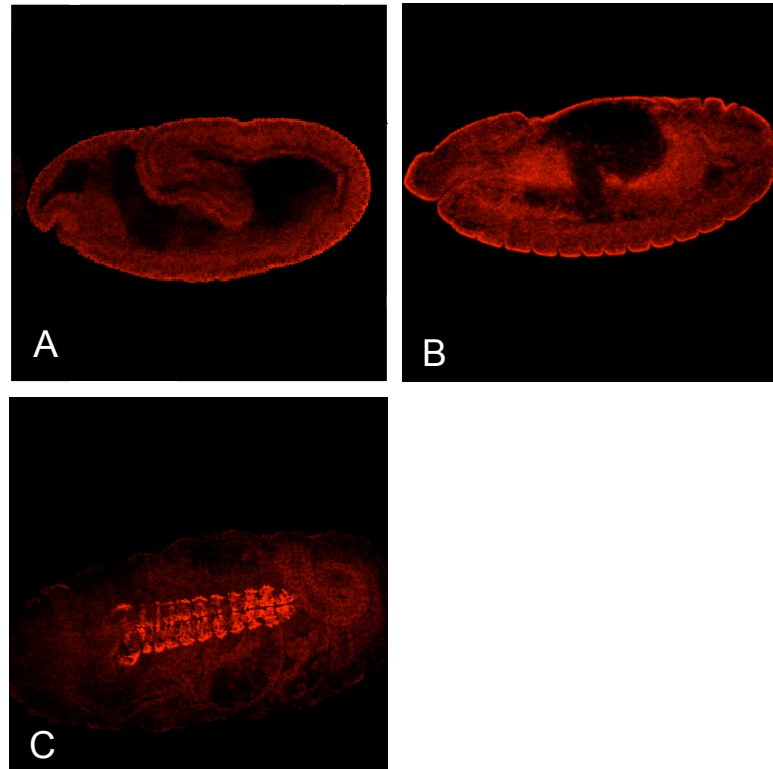


Abb. 21: Expressionsmuster von CG7739 während der Embryogenese

Wt Embryonen, die mit CG7739 gefärbt wurden, in den Stadien 9 (A) und Stadium 14 (B). (C) zeigt das zentrale Nervensystem (ZNS), Stadium 17.

In den jeweiligen Zellen ist CG7739 immer apikal im Cytocortex lokalisiert (Abb. 23, Pfeile), es sei denn die Zelle teilt sich gerade. Dann relokalisiert das Protein an die Spindel. In Abb. 22 sieht man mitotische Epidermiszellen in einer Oberflächenansicht. In diesen Zellen colokalisiert CG7739 während der Meta- und der Anaphase mit α Tubulin, einem Marker für die Spindelmikrotubuli.

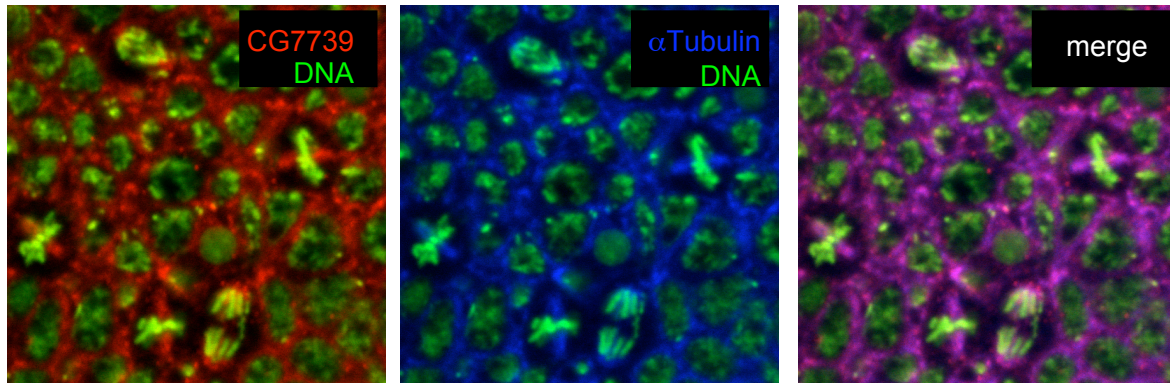


Abb. 22: CG7739 colokalisiert mit α Tubulin an der Spindel in mitotischen Zellen

Gezeigt ist eine Oberflächenansicht eines Embryos im Stadium 8, der mit CG7739, α Tubulin und YoYo gefärbt wurde. Der Embryo wurde mit 37% Formaldehyd fixiert (Material und Methoden, Kapitel 4.4.2.3). Zu sehen ist, dass CG7739 in der Metaphase und in der Anaphase an der Spindel mit Tubulin colokalisiert.

Das Expressionsmuster in den ektodermalen Zellen kann auch in NB beobachtet werden. Schon während der NB delaminiert, ist eine apikale Lokalisation von CG7739 erkennbar (Abb. 23, A+B, Pfeilköpfe). In der Interphase bildete CG7739 einen apikalen Halbmond (Abb. 23, A-C, Sternchen), der bis zur Mitose sichtbar bleibt. In der Metaphase wird CG7739, wie schon in der Epidermis, an die Spindel relokalisiert (Abb. 23, D, Kreise). In der Anaphase kann nur noch ein schwaches Signal erkannt werden, das einer Art Wolke um die Chromosomen entspricht (Abb. 23, D, gelber Pfeil). Interessant ist, dass CG7739 in der Metaphase, wie auch in der Anaphase stets eine stärkere Färbung am apikalen Spindelarm, beziehungsweise um die Chromosomen der apikalen Tochterzelle, aufweist (Abb. 23, D)

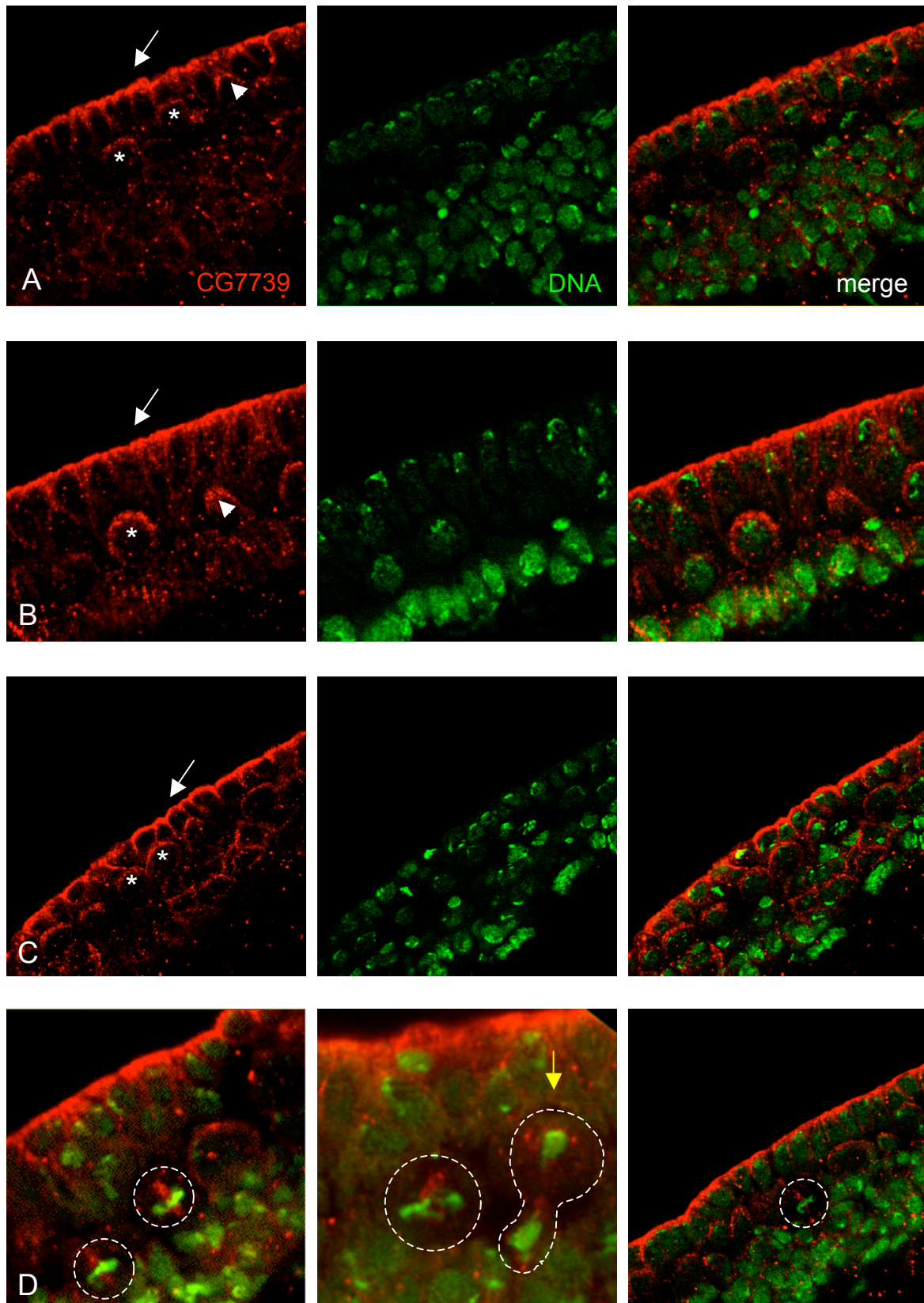


Abb. 23: CG7739 bildet einen apikalen Halbmond in Neuroblasten

Während der NB delaminiert, ist CG7739 schon apikal zu erkennen (A+B, Pfeilköpfe) und in Interphase NB bildet CG7739 einen apikalen Halbmond (A-C, Sternchen). Zusätzlich ist CG7739 apikal im Cytocortex des Epithels vorhanden (A-C, Pfeile). In der Metaphase (D, Kreise) ist CG7739 an der Spindel lokalisiert und in der Anaphase (D, gelber Pfeil) ist CG7739 diffus um die Chromosomen verteilt.

CG7739 colokalisiert mit Bazooka

In Epithelzellen colokalisieren Bazooka und CG7739 am apikalen Cytocortex (Abb. 24, A, Pfeil) und auch in delaminierenden und interphasen NB überlappen sich die Expressionsmuster von Bazooka und CG7739 (Abb. 24, Sternchen). Nur in der Mitose kann ein unterschiedliches Expressionsmuster der beiden Proteine beobachtet werden, da Bazooka immer noch apikal am Cytocortex lokalisiert, wogegen CG7739 an die Spindel relokalisiert (Abb. 24, A, Pfeilkopf).

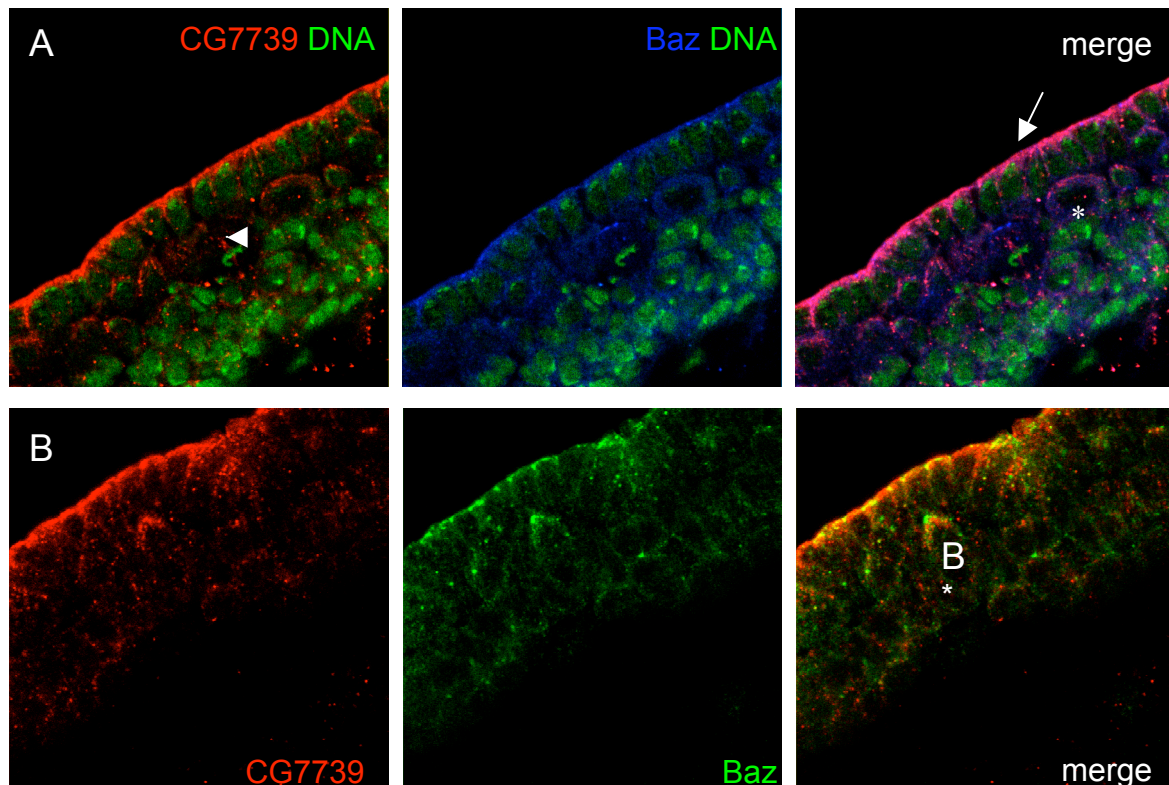


Abb. 24: Bazooka colokalisiert in Interphase NB mit CG7739

(A) zeigt einen Stadium 11 Embryo gefärbt mit $Rb\alpha$ CG7739, $Ratte\alpha$ BazN-term und YoYo. In der Interphase colokalisiert CG7739 in NB (Sternchen) und auch im Epithel (Pfeil) mit Bazooka. In Metaphase NB ist CG7739 an der Spindel lokalisiert (Pfeilkopf). In (B) ist ein Stadium 10 Embryo angebildet, der mit $Rb\alpha$ CG7739 und $Ratte\alpha$ BazN-term gefärbt wurde. Auch schon während der Delamination colokalisieren CG7739 und Bazooka (Sternchen).

Um eine unspezifische Färbung des Antikörpers auszuschließen wurden Embryonen, die defizient für CG7739 sind, gefärbt. Die Defizienz Df(3L)XG8 wurde freundlicherweise von Jörg Großhans zur Verfügung gestellt (Grosshans et al., 2003). Diese Defizienz erstreckt sich von der Region 71C bis zur Region 71F, ist homozygot letal und enthält CG7739 (persönliche Mitteilung Arno Müller). Um homozygote von heterozygoten Embryonen zu unterscheiden, wurde mit einem Antikörper gegen β Gal gefärbt. Das Balancer-Chromosom trägt das Enzym β -Galactosidase, das unter der Kontrolle des *hunchback* (*hb*) Promotors ist. Somit sind Embryonen, die das *hb* Muster aufweisen heterozygot für CG7739 und solche ohne β -Galactosidase sind homozygot. Es konnten keine überzeugenden Färbungen gemacht werden (Daten nicht gezeigt).

2.4.3 CG7739 wird schon in Ovarien exprimiert

Da sowohl in der *in situ* Hybridisierung als auch in den Antikörperfärbungen eine sehr frühe Expression von CG7739 beobachtet wurde, konnte von einer maternalen Expression ausgegangen werden. Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass CG7739 schon in der Oozyte exprimiert wird. Um dies zu überprüfen wurden Antikörperfärbungen an wt Ovarien durchgeführt.

CG7739 ist ab dem Stadium 8 der Eikammer in der Oozyte lokalisiert. Das ist auch das Stadium, in dem die Follikelzellen anfangen, das produzierte Dotter in der Oozyte abzulegen. CG7739 befindet sich erst im gesamten Cytoplasma (Abb. 25, B) und später nur noch im Cytocortex (Abb. 25, C). In diesem Stadium colokalisiert CG7739 mit Bazooka, wobei Bazooka aber nur sehr schwach in der Oozyte gefärbt ist (Abb. 25, C). In den Follikelzellen kann keine Färbung über dem Hintergrund von CG7739 beobachtet werden.

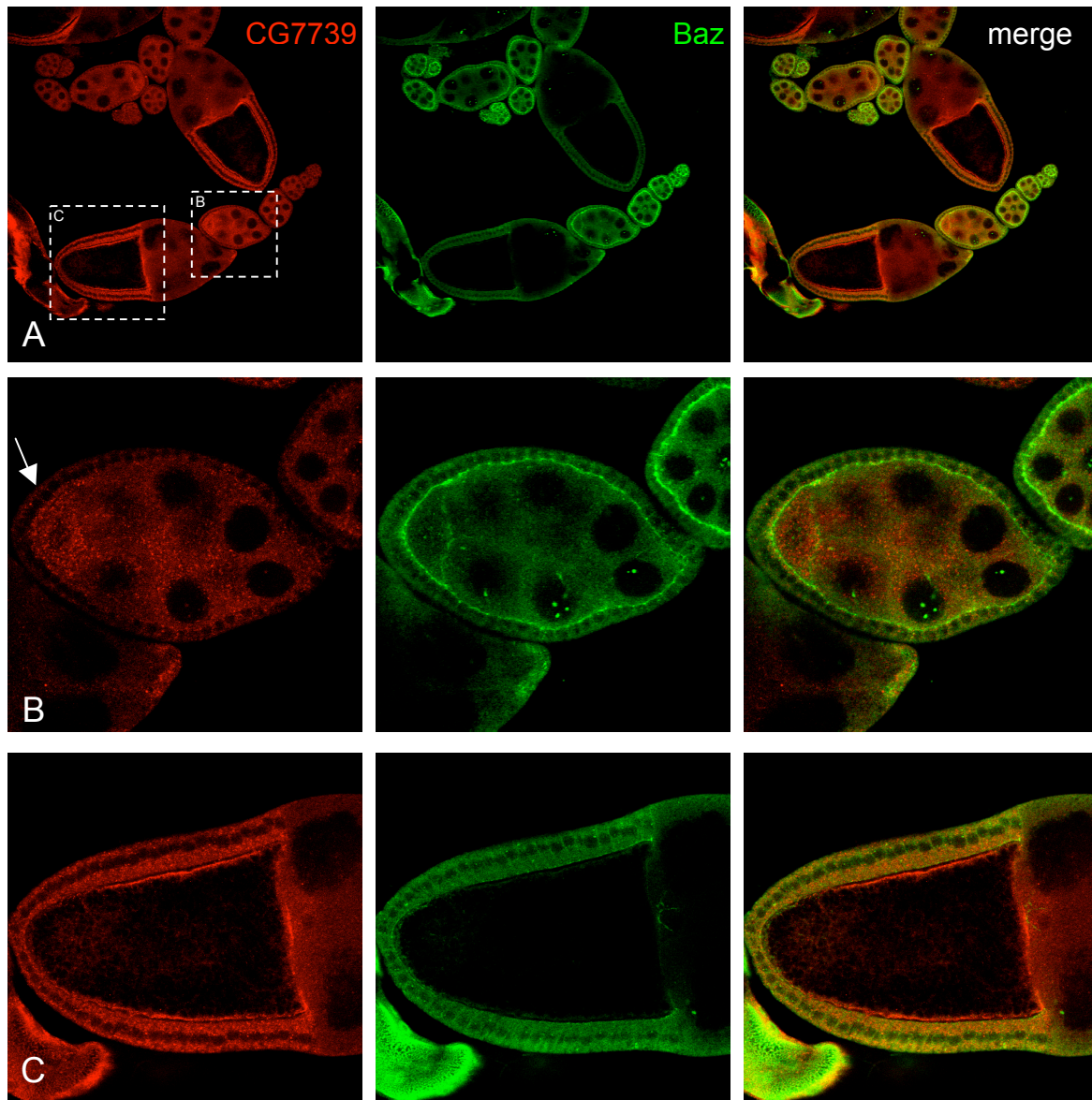


Abb. 25: In Ovarien lokalisiert CG7739 in der Oozyte

(A) zeige eine Übersicht der mit CG7739 und Ratten α BazN-term gefärbten Ovarien. (B) Ab Stadium 8 kann eine Ansammlung von CG7739 im Cytoplasma der Oozyte (Pfeil) beobachtet werden. (C) CG7739 ist in der Oozyte am ganzen Cytocortex lokalisiert (Stadium 10 der Eikammer).

In Abbildung 26 ist gut zu erkennen, dass CG7739 zwar nicht in den Follikelzellen, wohl aber in der Oozyte exprimiert wird. Zusätzlich kann eine schwache Bazooka-Färbung im Cytocortex der Oozyte und auch eine stärkere in der Zonula Adherens der Follikelzellen beobachtet werden.

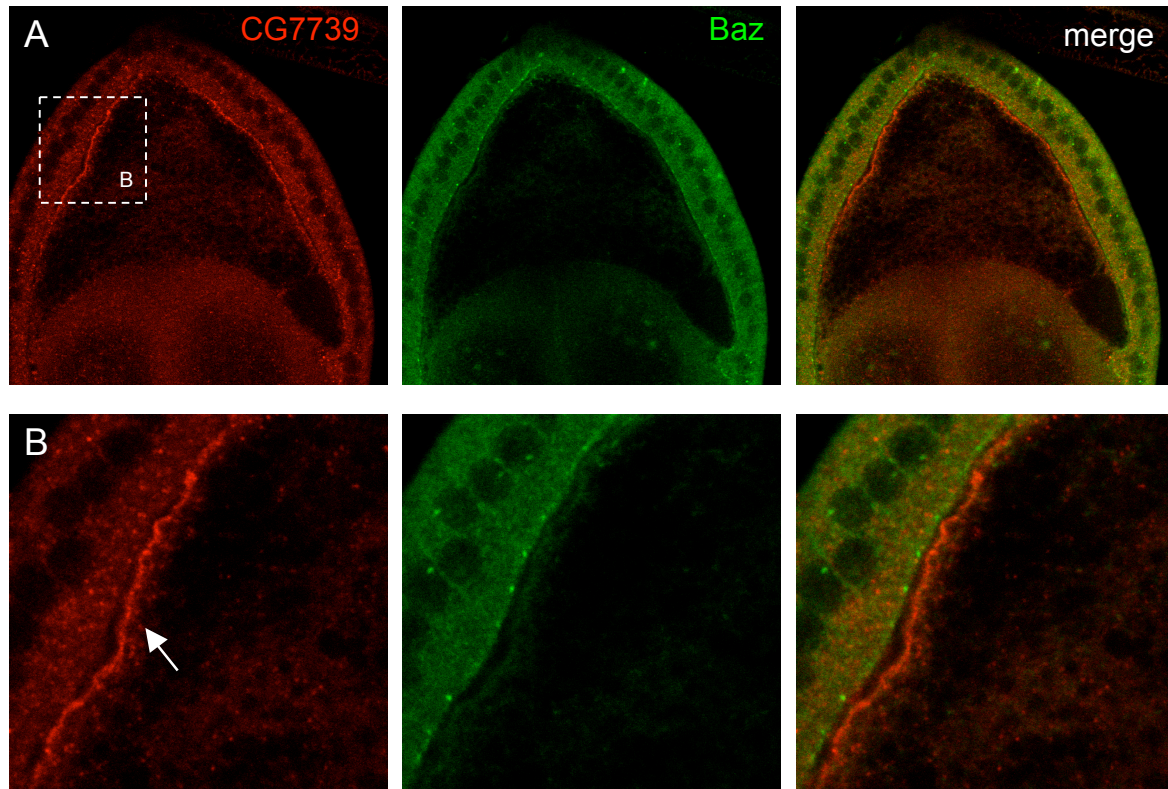


Abb. 26: CG7739 lokalisiert im Cytocortex der Oozyte

(A) zeigt eine Oozyte im Stadium 10B der Eikammer gefärbt mit Ratten α BazN-term und CG7739, der gestrichelte Kasten zeigt den Bereich der Vergrößerung in (B) an. In (B) sieht man die Lokalisation von CG7739 am Cytocortex der Oozyte (Pfeil).

Die Bindung zwischen CG7739 und Bazooka, die im Hefe-2-Hybrid Screen entdeckt wurde, muss mit weiteren Experimenten bestätigt werden. Entweder mit einer Co-Immunopräzipitation (CoIP) oder mit einem GST-Pulldown. Die CoIP wird mit wt Proteinextrakt durchgeführt und beweist, dass die Proteine, die getestet werden, in einem Komplex sind. Ein GST-Pulldown wird benutzt, um eine direkte Interaktion zweier Proteine nachzuweisen. Beide Methoden wurden in dieser Arbeit leider ohne Erfolg durchgeführt. Die vermutlichen Gründe werden in der Diskussion eingehend behandelt, wobei es sich höchst wahrscheinlich nicht um ein technisches Problem handelt, da die positiven Kontrollen funktionierten und alle Ausgangprodukte, wie zum Beispiel induzierte oder *in vitro* transkribierte/translatierte Proteine, hergestellt werden konnten.

2.4.4 CG7739 lokalisiert in Schneiderzellen mehrheitlich am Cytocortex

Es konnte mit den herkömmlichen Methoden (CoIP und GST-Pulldown) keine *in vivo* Interaktion von CG7739 und Bazooka nachgewiesen werden. Das lag wahrscheinlich entweder an der geringen Menge Protein, die aneinander binden, oder an einer posttranskriptionellen Modifikation (siehe Diskussion). Um diese Probleme zu umgehen, wurden Bazooka und CG7739 in Schneiderzellen (S2 Zellen) überexprimiert. S2 Zellen sind embryonale Zellen und können wie andere Zelllinien, z.B. HeLa Zellen oder MDCK Zellen, in Zellkultur gehalten werden.

Um CG7739 und Bazooka zu überexprimieren, wurden vollständige cDNAs von *bazooka* und *CG7739* in den Vektor pMK33 (für *bazooka*) oder in pMT/V5-His (für *CG7739*) kloniert. Diese Vektoren enthalten eine Hygromycin-Resistenz, um eine Selektion zwischen transfizierten und nicht-transfizierten Zellen zu erreichen. Außerdem besitzen sie einen metallothionin Promoter, um die Transkription der Plasmide nur bei spezieller Aktivierung (mit Kupfersulfat) zu starten (Material und Methoden Kapitel 4.2.7).

In der Abbildung 27 sind Antikörperfärbungen mit CG7739 und Bazooka an S2 Zellen, die entweder nur CG7739 (A) oder CG7739 und Bazooka (B-B'') überexprimieren, gezeigt. Die Lokalisation von CG7739 hängt nicht von Bazooka ab, da in beiden Fällen CG7739 in einer gepunkteten Anordnung am Cytocortex, aber auch schwach im Cytoplasma, lokalisiert ist. Werden Bazooka und CG7739 gemeinsam überexprimiert kann eine teilweise Colokalisation beobachtet werden (B-B'').

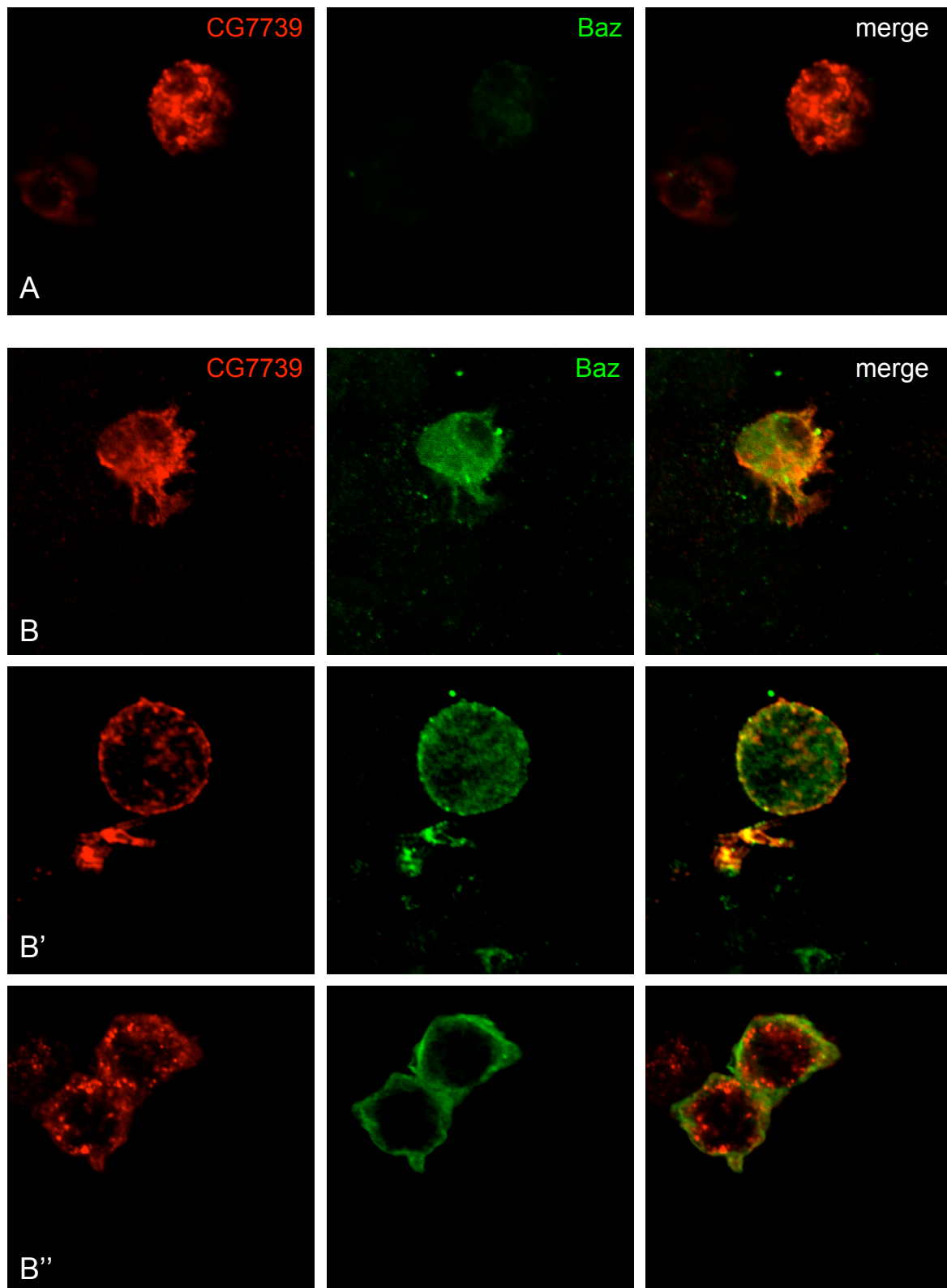


Abb. 27: CG7739 colokalisiert teilweise mit Bazooka in S2 Zellen

In (A) wurde CG7739 in S2 Zellen überexprimiert und in (B-B'') Bazooka und CG7739 zusammen. Beide Proteine sind vorwiegend in der Membran, aber auch im Cytoplasma lokalisiert.

2.4.5 Herstellung einer Mutanten des Gens *CG7739*

Der N-Terminus von Bazooka und der intrazelluläre C-Terminus von *CG7739* interagieren direkt in der Hefe und außerdem sind beide in Interphase NB colokalisiert. Aber sind ihre jeweiligen Funktionen voneinander abhängig? Dies kann am besten getestet werden, wenn von beiden Proteinen Mutanten untersucht werden.

Es gibt noch keine Mutante für *CG7739*. Die Defizienzen in der Region von *CG7739* beinhalten alle noch weitere Gene, was eine genaue Zuordnung eines etwaigen Phänotyps sehr schwierig macht. Aber es sind drei P-Element Insertionen beschrieben, die in unmittelbarer Nähe des Gens *CG7739* liegen: *P{lacW} I(3)1754*, *EY14009* und *EP(GE24395)* (Abb. 28).

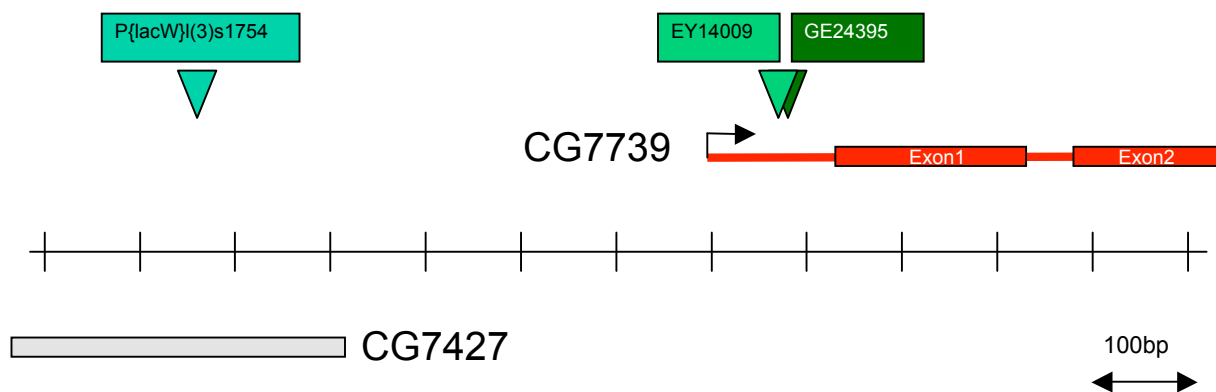


Abb. 28: Schematische Darstellung der Region 71E1

Gezeigt werden in 100bp Abschnitten 1200bp von Chromosom 3L, Positionen 15511617-15512817. Die P-Element Insertionen *EY14009* und *GE24395* befinden sich innerhalb der *CG7739* mRNA, aber *P{lacW}I(3)s1754* nicht.

P{lacW} I(3)1754 wurde von Arno Müller und Silke Schreiber benutzt, um Revertanten (Tsubota and Schedl, 1986) herzustellen und eine Rekombination in Männchen (RM) durchzuführen (Preston and Engels, 1996; Preston et al., 1996), mit der Hoffnung bei einigen Linien ein Stück genomische DNA zu entfernen, das groß genug ist, um auch ein Stück von *CG7739* auszuschneiden (S. Schreiber, A. Müller, unveröffentlicht). Die RM wird durch das Mobilisieren von zwei oder mehreren P-Elementen ausgelöst. Bei der Mobilisierung der P-Elemente entstehen Brüche in der DNA, die zu Chromosomen Neuarrangements und somit zu Deletionen oder

Duplikationen führen können. Bei 23 Revertanten Linien und 26 RM Linien wurden mit einer Single-Fly-PCR (Material und Methoden Kapitel 4.2.6.3) getestet, ob und wenn ja in welche Richtung des P-Elementes ein Stück genomische DNA entfernt wurde. Bei 5 RM Linien fehlte genomische DNA in Richtung von *CG7739*. In diesen Linien wurde genomische DNA von entweder homozygoten oder heterozygoten Embryonen (siehe Kapitel 4.2.4) verwendet, um in einer PCR das Gene *CG7739* nachzuweisen. In allen Linien konnte auch in homozygoten Embryonen *CG7739* nachgewiesen werde. Somit sind diese RM Linien alle nicht mutant für das Gen *CG7739*.

EY14009 in der 5' untranslatierten Region von *CG7739* ist nur 110bp vom ATG entfernt. Eine Insertion eines P-Elementes, die sich so nahe am nachfolgenden Gen befindet, wirkt sich oft auf die Transkription und/oder auf die Translation dieses Gens aus. Aber in diesem Fall ist die Linie EY14009 homozygot lebensfähig und fertil, was entweder bedeutet, dass *CG7739* keine lebenswichtige Funktion hat, oder dass die Translation nicht betroffen ist. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden wurde ein Westernblot mit Proteinextrakten aus wt Embryonen und aus homozygoten oder heterozygoten EY14009 Embryonen gemacht. Wie in Abbildung 29 ersichtlich, kann in allen drei Fällen das Protein *CG7739* nachgewiesen werden. Somit scheint die Insertion des P-Elements EY14009 keine Auswirkung auf die Translation von *CG7739* zu haben.

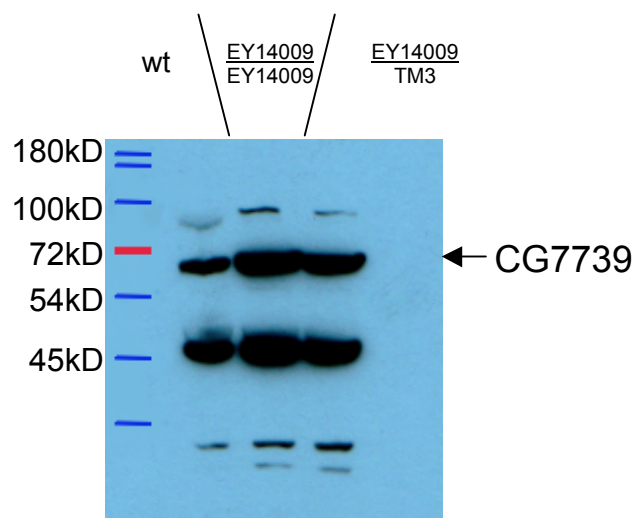


Abb. 29: In der P-Element Insertionslinie EY14009 wird immer noch *CG7739* Protein gebildet

Westernblot mit wt-Protein, homozygoten oder heterozygoten EY14009 Embryos. Es wurde der Antikörper EP023003 in einer Verdünnung von 1: 500 benutzt.

EY14009 und auch EP(GE24395) sind geeignet um Revertanten herzustellen, die beim unpräzisen Ausschneiden des P-Elementes ein Stück von CG7739 entfernen würden, da beide P-Elemente in der mRNA von CG7739 inseriert sind (Abb. 28). Dieser Versuch wurde gestartet, konnte aber während dieser Arbeit noch nicht beendet werden. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden ca. 70 Linien hergestellt, bei denen das P-Element ausgeschnitten wurde.

2.5 Direkte Interaktionen der Proteine im PAR/aPKC Komplex

Das Hefe-2-Hybrid System hat sich nicht nur bei der Suche nach neuen Interaktionen sondern auch bei der genaueren Untersuchung schon bekannter Interaktionen bewährt. Zum Beispiel können Proteine, die in einem Komplex sind, darauf hin untersucht werden, mit welchen anderen Proteinen im Komplex sie direkt interagieren und zusätzlich können die genauen Domänen, die diese Bindung eingehen, untersucht werden.

Um auch über die Bindungen innerhalb des *Drosophila* PAR/aPKC Komplexes ein genaueres Bild zu erhalten, wurden mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid Systems eine Reihe von Bindungsversuchen durchgeführt.

Wie in der Einleitung beschrieben, sind die Domänen mit denen die Proteine des PAR/aPKC Komplexes aneinander binden, in Vertebraten und in *C. elegans* die gleichen (Einleitung, Kapitel 1.1.2). Die Hypothese, dass dies auch in der Fall ist, konnte in dieser Arbeit bestätigt werden.

Die Abbildung 30 fasst die Ergebnisse zusammen.

Das Protein Inscuteable bindet an die Kinase Domäne (KD) der aPKC, aber nicht an die regulatorische Domäne (RD) und auch nicht direkt an Bazooka. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu der Publikation von Schober et al., in der eine direkte Interaktion zwischen Insc und Baz postuliert wird (Schober et al., 1999). Die aPKC ihrerseits bindet mit der RD an den N-Terminus von Par6 und mit der KD an Bazooka. Die Bindung der aPKC an Par6 konnte auf die ersten 100 AS von Par6

beschränkt werden. An Bazooka kann die KD der aPKC an 2 Stellen binden: Eine schwache Bindung kann mit den PDZ Domänen zwei und drei beobachtet werden (Wodarz et al., 2000). Eine wesentlich stärkere Bindung entsteht, wenn ein Konstrukt aus den AS 863-1097 von Bazooka dazu verwendet wird, die Interaktion zwischen der KD der aPKC und Baz nachzuweisen.

Cdc42 existiert in einer aktiven, GTP-bindenden oder in einer inaktiven, GDP-bindenden Form. In *C. elegans*, wie auch in Vertebraten wurde gezeigt, dass die aktive Form an Par6 binden kann. In *Drosophila* kann die wt, wie auch die konstitutiv aktive Form Cdc42V12, an Par6 binden. Par6 besitzt eine CRIB Domäne, die als Bindungsstelle für Cdc42 und Rac1 identifiziert wurde, aber diese Domäne alleine reicht im Hefe-2-Hybrid System nicht aus, um Cdc42 zu binden. Zusätzlich muss die PDZ Domäne von Par6 vorhanden sein (Abb. 30).

Die Dimerisierung des Bazooka N-Terminus, die Benton et al. beschrieben haben, konnte bestätigt werden (Benton and St Johnston, 2003).

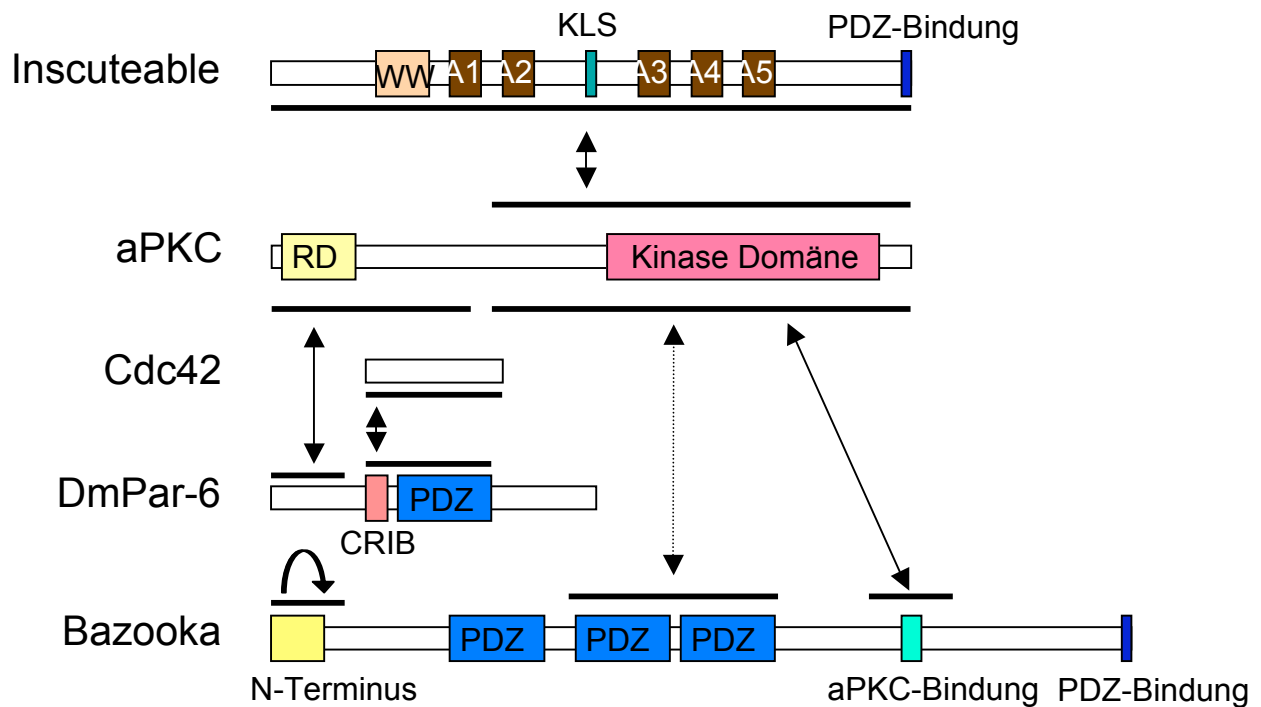


Abb. 30: Schematische Darstellung der direkten Interaktionen der Proteine des PAR/aPKC Komplexes im Hefe-2-Hybrid System

Die Pfeile stellen direkte Interaktionen dar und die Balken bezeichnen die Bereiche, die genommen wurden, um die jeweiligen Interaktionen zu testen. Der gepunktete Pfeil beschreibt eine schwache Interaktion zwischen den PDZ Domänen zwei und drei von Bazooka und der Kinase Domäne der aPKC. A1-5 = Ankyrin Wiederholungen; KLS = Kernlokalisationssignal; RD = regulatorische Domäne; CRIB = Domäne, die an Cdc42/Rac bindet.

Durch diese Interaktionstests konnten die Homologien, die zwischen den verschiedenen Mitgliedern der PAR/aPKC Komplexe in den verschiedenen Spezies vorhanden sind, verstärkt werden, da nicht nur die homologen Proteine in den homologen Komplexen vorhanden sind, sondern diese auch in homologer Weise aneinander binden.

3. Diskussion

Bazooka ist ein 3 PDZ Domänen Protein, das Teil des PAR/aPKC Komplexes ist. Dieser Komplex ist im apikalen Cortex von Epithelzellen und Neuroblasten von *Drosophila melanogaster* lokalisiert und bei der asymmetrischen Zellteilung in Neuroblasten verantwortlich für die korrekte Lokalisation von Insc und für die Rotation der Spindel um 90°. Trotz der weit fortgeschrittenen Forschung in diesem Bereich ist noch nicht bekannt, wie der Komplex mit dem Cytocortex verbunden ist, wie er die Rotation der Spindel und die korrekte Lokalisation der Zellschicksalsdeterminanten steuert und wie er mit dem Cytoskelett interagiert.

Um diese Fragen zu beantworten wurde ein Hefe-2-Hybrid Screen mit dem N-Terminus von Bazooka durchgeführt. Es konnten 34 neue Interaktionspartner isoliert werden.

3.1 Neue Interaktionspartner von Bazooka

3.1.1 Der Hefe-2-Hybrid Screen

Als Köder für den Hefe-2-Hybrid Screen wurde der N-Terminus von Bazooka gewählt, da er zwischen den verschiedenen Spezies hoch konserviert ist. Diese Tatsache lässt vermuten, dass der N-Terminus wichtig für die Funktion Bazookas ist. Diese Vermutung wurde kürzlich sowohl in *Drosophila* als auch in Vertebraten bestätigt. *Benton et al.* konnten zeigen, dass der Bazooka N-Terminus in der Lage ist, sich selbst zu binden. Die Autoren schließen aus ihren Daten, dass der N-Terminus die Assoziation des Komplexes an die apikale Plasmamembran stabilisiert und somit mitverantwortlich für die Funktion des PAR/aPKC Komplexes ist (Benton and St Johnston, 2003). Zum gleichen Schluss kamen auch *Shi et al.* bei ihren Untersuchungen an Neuronen des Ratten Hippocampus, die in Zellkultur gehalten

wurden. Es konnte in Überexpressionstudien dem N-Terminus von mPar3 eine entscheidende Rolle für die subzelluläre Lokalisation und die Funktion des ganzen Proteins zugeschrieben werden (Shi et al., 2003).

Es wurden ca. 7.5 Millionen Kolonien gescreent. Aber es kann nicht von einem gesättigten Screen ausgegangen werden. Das Kriterium für einen gesättigten Screen ist das wiederholte Isolieren von jedem Klon, oder mindestens von einem Großteil der Klone. Dies konnte teilweise in diesem Screen beobachtet werden, da sechs Gene je zweimal und ein Gen dreimal isoliert wurde. Um von einem gesättigten Screen zu sprechen müsste aber weiter gescreent werden. Da aber schon 34 Kandidaten isoliert wurden, wurde der Screen vorerst abgeschlossen.

Die Annahme einer geringen Ausbeute, bezüglich der anfänglichen Anzahl Kolonien (104) gegenüber der schlussendlich isolierten Gene (42), muss nach Betrachtung der folgenden Argumente relativiert werden: Das erste Kriterium für eine Interaktion entsprach dem Wachsen der Klone auf einem Medium ohne Histidin. Der verwendete Hefestamm hat immer noch eine sehr geringe Aktivität seines *HIS3* Gens, die mit 3-Aminotriazol stark unterdrückt werden kann. Eine komplette Ausschaltung des Gens ist allerdings nicht möglich. Um die so entstandenen falsch-positiven Kandidaten auszuschließen, wird mit einem anderen Reporter gen (*lacZ*), das hinter einer leicht unterschiedlichen GAL4 UAS Sequenz geschaltet ist, ein zweites Mal gescreent. Dabei wurden 33 Klone ausgesondert.

Weitere Falsch-Positive können entstehen, wenn das Gen im Beuteplasmid ohne die DNA Bindungsstelle die Transkription der Reportergene aktivieren kann. Um dies zu testen wurden die isolierten Klone mit einem Köderplasmid, das nichts mit Bazooka zu tun hat, erneut in Hefen transformiert und ein weiterer X-Gal Test wurde durchgeführt. Von den 54 übrig gebliebenen Kandidaten konnten 42 einem Gen zugeordnet werden. Den restlichen 12 Kandidaten konnten keine Gene zugeteilt werden, sie wurden als mitochondriale DNA, mitochondriale RNA oder nicht-kodierende DNA identifiziert. Aus Gesprächen mit Mitarbeitern, die ihrerseits einen Hefe-2-Hybrid Screen gemacht haben, oder aus Erfahrungsberichten im Internet, wurde deutlich, dass es immer eine erhebliche Anzahl Klone gibt, die nicht einem Gen zugeordnet werden können. Eine Antwort auf die Frage warum das so ist, konnte auch von Fachleuten nicht zufriedenstellend beantwortet werden. Es wäre jedoch möglich, dass die RNA, die zur Herstellung der cDNA isoliert wurde, nicht nur

mRNA, sondern auch mitochondriale RNA, tRNA oder kleine DNA Fragmente enthielt. Diese könnten dann von der Hefe translatiert werden und kleine Peptide hervorbringen, die womöglich mit Bazooka interagieren würden. Somit könnten die mitochondriale DNA/RNA und auch die nicht-kodierende DNA erklärt werden.

3.1.2 Die Klassifikation der Kandidaten

Die 34 Gene wurden in sechs Gruppen unterteilt (Tabelle 1). Die Kriterien für die Unterteilung waren die vorhergesagten Funktionen der Proteindomänen, die mit Hilfe des SMART Programms ermittelt wurden (Letunic et al., 2004; Schultz et al., 1998). Die Gene aus zwei dieser Gruppen können direkt mit einer möglichen Funktion im PAR/aPKC Komplex in Verbindung gebracht werden. Diese Gene enthalten Protein-Protein Interaktionsdomänen (Gruppe 1, Tabelle 1) oder PM/Cytoskelett-Assoziationsdomänen und Lipid-Bindungsmotive (Gruppe 2, Tabelle 1). Gene dieser Gruppen könnten Antworten auf noch offene Fragen in Bezug auf die Verankerung des PAR/aPKC Komplexes im Cortex und der Verbindung zwischen dem Komplex und der Spindel geben.

Eine etwas weniger direkte Verbindung zu Bazooka haben die 7 Kandidaten, die zur Gruppe 3 gehören: Enzyme im Cytoplasma und die 11 Kandidaten aus Gruppe 4: Enzyme im Kern. Es ist bekannt, dass Proteine, die eine Rolle im Aufbau oder der Aufrechterhaltung des Cytoskeletts haben, auch in Signaltransduktionswege verwickelt sein können, wie zum Beispiel der Dystrophin-Glycoprotein Komplex (Oak et al., 2003). Zusätzlich gibt es Proteine, die Teil des Cytocortex sind, aber in bestimmten Situationen, wie durch eine proteolytische Spaltung, in den Kern transportiert werden, um dort durch Bindung an Kernproteine ein Signal weiterzuleiten. Als Beispiel kann das Protein Armadillo, das *Drosophila* Beta-Catenin Homolog, aufgeführt werden. Armadillo ist einerseits Teil der Zonula Adherens im apikalen Cytocortex, kann aber auch proteolytisch gespalten werden, um in den Kern transportiert zu werden. Im Kern angelangt bindet es an TCF/LEF Transkriptionsfaktoren und rekrutiert chromatin-modifizierende und -remodulierende Komplexe, welche ihrerseits Wnt Zielgene transkribieren (Gallet et al., 1999; Townsley et al., 2004; Wodarz and Nusse, 1998). Vielleicht hat Bazooka eine ähnliche Funktion in Epithelzellen: Der PAR/aPKC Komplex ist für den Aufbau der

Zonula Adherens (ZA) in Epithelzellen verantwortlich, indem er apikal der ZA an die Membran bindet und weitere Proteine, wie zum Beispiel Crumbs, an die ZA rekrutiert (zusammengefasst in (Johnson and Wodarz, 2003)). Man könnte sich vorstellen, dass der N-Terminus von Bazooka in den Kern gelangt, um dort an eines oder mehrere dieser im Kern lokalisierten Kandidaten zu binden und somit die Transkription von Proteinen, die für die Aufrechterhaltung der Polarität in Epithelzellen verantwortlich sind, zu regulieren.

Die letzten beiden Gruppen beinhalten Gene, die entweder ein coiled coil Motiv besitzen oder die keine bekannte Domäne haben. Natürlich könnten auch diese Gene eine Funktion in der asymmetrischen Zellteilung der NB haben. Es konnten jedoch nicht alle Kandidaten in dieser Arbeit weiter untersucht werden und deshalb wurden vorerst nur Gene ausgewählt, die dank ihrer Funktion oder des Expressionsmusters ihrer mRNA eine Interaktion mit Bazooka wahrscheinlicher erscheinen ließen.

3.1.3 Experimente am *Drosophila* Embryo

Im nächsten Schritt musste getestet werden, ob die Kandidaten während der Entwicklung des Embryos exprimiert werden. Dies konnte mit *in situ* Hybridisationsdaten ermittelt werden. Von einem Großteil der Kandidaten sind schon RNA *in situ* Hybridisierungen durchgeführt worden. Dies wurde teilweise vom Berkeley *Drosophila* Genom Projekt (BDGP) (<http://www.fruitfly.org/cgi-bin/ex/insitu.pl>) publiziert. Ein weiterer Teil wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen, die einige der Kandidatengene schon untersucht haben, veröffentlicht (Tabelle 2). Von den restlichen 11 Interaktionspartnern, von denen noch kein Expressionsmuster bekannt war, wurden RNA *in situ* Hybridisierungen durchgeführt.

Von den 34 Kandidaten wurden 11 auf Grund ihres Expressionsmusters, das nicht mit dem Expressionsmuster von Bazooka überlappend ist, aus den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

Die Interaktionspartner, die im Weiteren ausgeschlossen wurden, können prinzipiell alle eine Funktion bei der asymmetrischen Zellteilung der NB haben. Da die genauere Untersuchung von 23 Proteinen den Rahmen einer Doktorarbeit aber

sprengen würde, musste die Anzahl Kandidaten reduziert werden. So wurden alle Proteine, die im Kern lokalisieren, die ein oder mehrere coiled coil Motive aufweisen oder die keine bekannte Domäne besitzen, vorerst ausgeschlossen.

Von den restlichen fünf Kandidaten, deren RNA in der Embryonalentwicklung teilweise mit der Bazookas coexprimiert wird und die Proteindomänen besitzen, die eine Funktion in der asymmetrischen Zellteilung der NB wahrscheinlich machen, wurden Antikörperfärbungen und/oder mutante Phänotypen untersucht.

3.1.4 Die weiter untersuchten Kandidaten

Pp2A-29B

Die Pp2A ist eine Protein Phosphatase, die in Vertebraten ein Antagonist der PKC ξ ist. Während der Neubildung der Zonula Occludens wird die Pp2A an die Plasmamembran relokalisiert, wo sie Ihre Funktion als negativer Regulator der Bildung der Zonula Occludens ausübt. Pp2A dephosphoryliert ZO-1, Occludin und Claudin, drei Proteine, die Teil der Zonula Occludens sind. Nur im phosphorylierten Zustand stabilisierten sie die Zonula Occludens (Nunbhakdi-Craig et al., 2002). Ob die Pp2A in *Drosophila* eine ähnliche Funktion hat wurde noch nicht untersucht. In dieser Arbeit, wie auch in einer Publikation von *Mayer-Jaekel et al.*, konnte gezeigt werden, dass die *Pp2A* RNA während der frühen Embryogenese ubiquitär exprimiert wird (Abb. 5). In späteren Stadien ist die Expression auf das Nervensystem, speziell auch auf NB, und die Gonaden beschränkt (Mayer-Jaekel et al., 1992). Zusätzlich wurde hier gezeigt, dass auch das Pp2A Protein in Embryonen exprimiert ist. Die Pp2A colokalisiert mit Bazooka im apikalen Cytocortex der Epithelzellen (Abb.10). Die Antikörperfärbungen konnten mit einem Antikörper gegen das menschliche Protein gemacht werden, da die beiden Proteine in Mensch und *Drosophila* hoch konserviert sind. Zusammen mit dem Expressionsmuster, den Antikörperfärbungen und der Funktion der Pp2A in Vertebraten ist die Homologie zwischen den Spezies ein starkes Indiz für eine Funktion der Pp2A zusammen mit Bazooka in einem Komplex.

Um eine gemeinsame Funktion zu beweisen, müsste entweder eine Mutation hergestellt werden, oder, wie dies in MDCK Zellen möglich ist, spezifische Inhibitoren für die Pp2A eingesetzt werden (Nunbhakdi-Craig et al., 2002). Diese Methode

wurde auch in adulten *Drosophila* Speicheldrüsen benutzt um eine Funktion der Pp2A in der Transkription zu erforschen (Nowak et al., 2003).

EG80:H7.5

Das Protein EG:80H7.5 besitzt 2 Lipidbindungsdomänen, PH und FYVE, die bevorzugt an phosphorylierte Inositole binden. Ein Protein, das an Lipide binden kann, ist sehr häufig mit der Membran assoziiert. Somit könnte EG80:H7.5 durch eine gleichzeitige Bindung an Bazooka und an Inositole in der Membran den PAR/aPKC Komplex an die Plasmamembran binden. Die RNA von *EG80:H7.5* ist ubiquitär während der Entwicklung im Embryo verteilt (siehe Anhang, Kapitel 6.9.1), aber der Antikörper, dessen Herstellung in Auftrag gegeben wurde (siehe Anhang, Kapitel 6.9.3), zeigt keine spezifische Färbung. Eine mögliche Erklärung dafür sind die verwendeten Fixierungsmethoden. Es wurden Standardfixierungen benutzt, die nicht speziell für Proteine, die an Lipide binden, ausgelegt sind.

Die P-Element Insertion (P{GT1}EG:80H7.5^{BG02357}), erwies sich als homozygot lebensfähig, obwohl sie in der 5' untranslatierten Region der *EG80:H7.5* mRNA liegt, was in vielen Fällen die Transkription des folgenden Gens stört. Es konnte aber gezeigt werden, dass diese Insertion keine Auswirkung auf die Transkription des Gens hat (Abb.6). Die Mobilisierung von P{GT1}EG:80H7.5^{BG02357} würde mit hoher Wahrscheinlichkeit auch ein Stück genomische DNA entfernen, was zu einer Mutation in EG80:H7.5 führen könnte, wenn die genomische DNA in Richtung von EG:80H7.5 herausgeschnitten würde. Mit diesem Fliegenstamm könnte anschließend getestet werden, ob EG80:H7.5 eine Rolle in der asymmetrischen Zellteilung spielt. Möglich wäre eine Funktion als Ankerprotein für den PAR/aPKC Komplex.

Lk6

Lk6 ist eine Serin/Threonin Kinase, die in einem Screen zur Identifikation neuer Proteine, die mit Mikrotubuli assoziieren, identifiziert wurde (Kidd and Raff, 1997). Da Lk6 zumindest teilweise an Zentrosomen bindet, könnte eine direkte Bindung an Bazooka die Frage nach der Verbindung zwischen der Spindelrotation und dem

PAR/aPKC Komplex beantworten. Um dies zu überprüfen wurden Antikörperfärbungen durchgeführt. Es konnten zu keinem Zeitpunkt in der Entwicklung eine Colokalisation von Bazooka und Lk6 beobachtet werden. Hier ist aber anzumerken, dass mit dem verwendeten Antikörper nur die 220kD Form des Lk6 Proteins gefärbt wurde. Diese ist die Form, die an die Zentrosomen bindet. Die kleinere Form (185kD) lokalisiert im Cytoplasma und könnte mit Bazooka interagieren. Ein Argument gegen eine Interaktion wäre, dass eine Überexpression von Lk6 keine Auswirkung auf die Expression oder Lokalisation von Bazooka hat (Abb. 13), wobei Lk6 jedoch auch hierarchisch unterhalb Bazookas liegen könnte. In diesem Fall würden sowohl eine Überexpression, wie auch eine Mutation in Lk6 keine Auswirkungen auf Bazooka haben. Interagiert die cytoplasmatische Form von Lk6 mit Bazooka so stellt sich die Frage nach der Funktion.

Dystrophin

Dystrophin wurde erstmals als Protein beschrieben, das bei Patienten mit einer muskulären Dystrophie mutant oder abwesend ist. In Säugetieren, wie auch in *Drosophila* ist Dystrophin ein spektrinähnliches, aktinbindendes Protein. Die *Dystrophin* RNA wird im Gegensatz zu den meisten anderen Kandidaten nicht maternal exprimiert. Die Expression beginnt erst während der Gastrulation (Anhang, Kapitel 6.8.1). Zur selben Zeit kann eine spezifische Färbung mit Antikörpern gegen das Dystrophin Protein beobachtet werden. Dystrophin wird hauptsächlich in Epithelzellen exprimiert, wo es im basalen Cortex lokalisiert (Abb. 10). Diese Lokalisation ist im Einklang damit, dass Dystroglycan und Dystrophin interagieren und dass Dystroglycan im basalen Cortex lokalisiert (Deng et al., 2003). In der gleichen Veröffentlichung wurde beschrieben, dass Dystroglycan benötigt wird, um Follikelzellen und die Oozyte zu polarisieren. Desweiteren kann bei einer Überexpression Dystroglycans eine Ausdehnung Bazookas in die basolaterale Membran beobachtet werden (Deng et al., 2003). Diese Fehllokalisierung könnte durch eine Bindung von Bazooka an Dystroglycan via Dystrophin erklärt werden. Mit dem hergestellten Antikörper wurden auch Westernblots gemacht. Um das zirka 380kD große Dystrophin sauber auftrennen zu können musste ein Polyacrylamidgel verwendet werden, das aus nur 5% Polyacrylamid besteht. Diese geringe Menge an

Polyacrylamid reduziert die Festigkeit des Gels, was zu einer erhöhten Reißgefahr führt. Obwohl der Westernblot mit einem 5% Polyacrylamidgel funktionierte, was eine positive Kontrolle bewies, konnten keine spezifischen Banden detektiert werden. Das kann einerseits daran liegen, dass so große Proteine schneller degradiert werden oder dass nur sehr geringe Mengen an Dystrophin in den Zellen vorhanden sind. Ein Westernblot mit Proteinextrakten aus Embryonen, die Dystrophin überexprimieren, könnte zu einem besseren Ergebnis führen.

CG17064

CG17064 besitzt eine GKAP Domäne, die als Bindedomäne für MAGUK Proteine beschrieben wurde (Kim et al., 1997). Zusätzlich ist CG17064 konserviert zwischen *Drosophila* und Säugern. Dieses Homolog von CG17064 in Säugern ist HURP (hepatoma up-regulated protein), welches an Mikrotubuli bindet und zellzyklusabhängig abgebaut wird (Tsou et al., 2003). Der Abbau HURPs wird in HeLa Zellen vom „anaphase promoting complex“ (APC) gewährleistet. Eine weitere Funktion des APC wurde im Fadenwurm *C. elegans* beschrieben. Dort ist der Komplex für den Aufbau der anterior-posterioren Achse im Ein-Zell-Embryo verantwortlich (Rappleye et al., 2002). Am gleichen Prozess beteiligt ist auch PAR-3, das *C. elegans* Homolog von Bazooka.

Um eine Verbindung zwischen CG17064 und Bazooka zu untersuchen wurde als erstes eine *in situ* Hybridisierung mit CG17064 RNA gemacht, aber es gelang nie eine unterschiedliche Färbung zwischen sense und antisense Strang zu erkennen. Dies könnte bedeuten, dass die RNA im Embryo nicht, oder nur in sehr geringen Mengen vorhanden ist. Bennett et al. konnten das Expressionsmuster von CG17064 ermitteln. Sie beschrieben eine erhöhte Expression von Mars (CG17064) im zentralen Nervensystem und im Hirn (Bennett and Alphey, 2004).

Die Antikörperfärbungen ergaben, dass CG17064 im Embryo exprimiert wird. Sichtbar wird die Expression ab dem syncytialen Blastoderm. CG17064 ist in den mitotischen Zellen an der Spindel lokalisiert, genauer an die Kinetochor Mikrotubuli. Kinetochor Mikrotubuli binden ab der Metaphase an die Kinetochore und an die Zentrosome und werden während der Anaphase mit Hilfe des Kinetochors verkürzt

und ziehen somit die Chromosomen in Richtung Zentrosomen (Abb. 17). Diese Lokalisation in mitotischen Zellen bleibt während der ganzen embryonalen Entwicklung bestehen und ist somit auch in NB zu beobachten. In diesen Zellen könnte eine Interaktion zwischen Bazooka und CG17064 stattfinden, wobei eine Colokalisation beider Proteine nicht beobachtet werden konnte. Anzumerken ist, dass die astralen Mikrotubuli, die von den Zentrosomen zum Cytocortex reichen, mit den benutzten Fixierungsmethoden nicht sichtbar sind. Eine Lokalisation von CG17064 an den astralen Mikrotubuli ist nicht ausgeschlossen und würde eine Interaktion Bazookas mit CG17064 an den astralen Mikrotubuli möglich machen.

Um aber eine Interaktion endgültig zu beweisen, müssten zusätzlich Mutanten von CG17064 untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die Kutikula von homozygoten Embryonen der P-Element Insertionslinie P{PZ}drk¹⁰⁶²⁶ untersucht. Der Phänotyp lässt eine Fehlfunktion der Epidermis vermuten, da keine Zähnenreihen mehr vorhanden sind. Bedauerlicherweise wird das Gen *downstream of receptor kinase* (*drk*) auch durch das P-Element beeinflusst, was eine eindeutige Zuordnung des Phänotyps zu CG17064 nicht möglich macht.

Weitere Untersuchungen, seien es biochemischer Art oder an neuen Mutanten, könnten eine eventuelle Funktion CG17064 während der asymmetrischen Zellteilung in NB aufdecken.

CG7739

CG7739 ist ein vorhergesagtes Protein, das 596 AS groß ist. Die ersten 551 AS sind extrazellulär. Darauf folgen eine Transmembrandomäne und ein 22 AS großer C-Terminus, der 63% identisch ist mit dem menschlichen Homolog TIP. TIP (T cell immunomodulatory protein) wurde als Protein identifiziert, das entweder ganz oder nur teilweise (extrazelluläre Domäne) sekretiert und glykosyliert wird. Die Überexpression von TIP in aufgereinigten Maus T Zellen stimuliert die Ausschüttung von Zytokinen wie Interferon- γ , IL-10 und TNF- α . Letzteres gehört zu den pro-entzündlichen Zytokinen, wohingegen Interferon- γ und IL-10 zu den contra-entzündlichen Zytokinen gehören. Um herauszufinden, ob TIP *in vivo* pro- oder contra-entzündlich ist, wurde Mäusen mit graft-*versus*-host Krankheit das TIP Protein injiziert. Es konnte einen schützenden Effekt auf die Mäuse festgestellt werden. Das

bedeutet, in 80% der Fälle überlebten die Mäuse den 10. Tag der Krankheit, im Gegensatz zu nur 20% der Kontrollmäuse (Fiscella et al., 2003).

Werden Westernblots mit dem CG7739 Antikörper gegen den extrazellulären Teil des Proteins gemacht, so kann man ein breites Signal zwischen 43kD und 49kD erkennen, welches einem sekretierten Teil von CG7739 entsprechen könnte. Da mit einem Antikörper gegen den C-Terminus aber eine Bande bei 65kD zu sehen ist, die dem vollständigen Protein entspricht, kann davon ausgegangen werden, dass nur ein Teil des exprimierten Proteins sekretiert wird.

Die RNA von CG7739 wird maternal exprimiert, ist ubiquitär verteilt und die Expression verringert sich mit zunehmendem Alter, bis sie ab Stadium 14 nicht mehr zu sehen ist (Anhang, Kapitel 6.6.1). Das heißt, dass das Protein schon sehr früh in der Entwicklung exprimiert wird und dass es entweder nach Stadium 14 nicht mehr gebraucht wird oder es eine so lange Halbwertszeit hat, dass die Produktion neuer RNA ab diesem Stadium nicht mehr notwendig ist.

Um die Expression und Lokalisation des Proteins zu erforschen wurden Antikörperfärbungen an Ovarien und wt Embryonen gemacht. CG7739 wird schon in der Oozyte exprimiert, wo es erst im Cytoplasma und später ausschließlich im Cytocortex lokalisiert ist (Abb. 25). Auch in Embryonen ist CG7739 im Cytokortex von Epithelzellen und NB lokalisiert, außer in mitotischen Zellen. In diesem Fall relokalisiert CG7739 an die Spindel (Abbildungen 20-23). Die apikale Lokalisation im Cytocortex ist in einem Großteil der untersuchten Zellen mit der Lokalisation Bazookas überlappend (Abb. 24). Die zeitliche und räumliche Nähe der beiden Proteine macht es sehr wahrscheinlich, dass sie miteinander interagieren.

Um zu testen, ob der Antikörper gegen CG7739 spezifisch ist, wurde eine Defizienz, die CG7739 eliminiert, mit $Rb\alpha$ CG7739 gefärbt. Es konnte keine signifikante Reduktion der Färbung in homozygot defizienten Embryonen beobachtet werden, was voraussichtlich an der maternalen Expression von CG7739 liegt.

Es wurde versucht, mit CoIPs oder GST-Pulldowns die Interaktion von Bazooka und CG7739 mit einer weiteren Methode zu beweisen.

Durch eine CoIP konnte keine Bindung von CG7739 an Bazooka nachgewiesen werden. Die möglichen Gründe werden im Folgenden erläutert. Erstens ist es möglich, dass in einem wt Proteinextrakt zu wenig Bazooka-CG7739 Komplex vorhanden ist um ihn nachweisen zu können. Um dieses Problem zu umgehen,

wurden Extrakte von Embryonen hergestellt, die Bazooka überexprimieren, aber auch hier konnte keine Bindung beobachtet werden. Zweitens könnte der Bazooka-CG7739 Komplex, obwohl er in vielen Zellen colokalisiert, nur eine kurze und labile Bindung eingehen, die nur in speziellen Zelltypen und bestimmten Stadien auftritt. Und drittens besteht die Möglichkeit, dass der Bazooka N-Terminus oder der CG7739 C-Terminus gewisse posttranskriptionelle Veränderungen durchmachen, die notwendig für eine Bindung sind, wie zum Beispiel eine Phosphorylierung.

Eine posttranskriptionelle Veränderung könnte auch erklären wieso es nicht gelang einen GST-Pulldown mit CG7739 und Bazooka zu machen. Obwohl die Hefe nur ein Einzeller ist, so ist sie doch eukaryontisch und somit, zumindest teilweise, in der Lage posttranskriptionelle Änderungen vorzunehmen. Anders ist das bei den Fusionsproteinen, die für den GST-Pulldown benutzt werden (Material und Methoden Kapitel 4.5.1). Sie werden in *E.coli* hergestellt, einem prokaryontischen Organismus, der nicht die gleiche posttranskriptionelle Maschinerie besitzt und somit eukaryontische posttranskriptions- Signale nicht erkennt.

Es wurde ein neuer Versuch gestartet, bei dem keins der oben genannten Probleme auftreten sollte. Der Versuch wird in Schneiderzellen (S2 Zellen) durchgeführt, die aus *Drosophila* Embryonen gewonnen wurden. Bazooka und CG7739 werden in wt S2 Zellen nur sehr schwach exprimiert, können aber als Plasmide in die Zellen transfiziert werden. Durch Aktivierung der Transkription kann eine große Menge Protein hergestellt werden, mit der eine CoIP durchgeführt werden kann. Die Zelllinien, die bei Aktivierung durch Kupfersulfat Bazooka und/oder CG7739 exprimieren, wurden hergestellt. In Antikörperfärbungen konnte gezeigt werden, dass CG7739 in einem gepunkteten Muster hauptsächlich im Cytocortex lokalisiert ist und dass die Lokalisation nicht von der An- oder Abwesenheit von Bazooka beeinflusst wird (Abb. 29).

Um eine Interaktion zwischen CG7739 und Bazooka festzustellen, kann sowohl nur die Bindung der beiden Proteine untersucht, als auch eine genetische Interaktion getestet werden. Zu diesem Zweck können Mutationen des Gens CG7739 untersucht werden. Es sind bis dato noch keine Mutanten verfügbar und deshalb wurde ein Versuch begonnen, in dem neue Mutanten mit Hilfe der P-Element Insertionslinien EY14009 und EP(GE24395) erzeugt werden sollen.

Die ausstehenden Untersuchungen mit den S2 Zellen und den Mutanten werden hoffentlich bestätigen, was der Hefe-2-Hybrid Screen und die immunohistologischen Färbungen an Ovarien und Embryonen vermuten lassen: CG7739 interagiert *in vivo* mit Bazooka.

Über die Funktion von CG7739 lässt sich nur spekulieren, aber möglich wäre, dass CG7739 entweder das Ankerprotein des PAR/aPKC Komplexes an der Plasmamembran ist, oder CG7739 ein Bindeglied zwischen der Spindel und dem PAR/aPKC Komplex ist. Eine gemeinsame Bindung von CG7739 an Bazooka und an die Spindel könnte letztere in die apiko-basale Position bringen.

Eine weitere wichtige Frage ist, wie ein Protein mit einer TMD überhaupt an die Spindel binden kann. Interessanterweise wurde in *C. elegans* ein Protein mit ähnlichen Merkmalen und einem ähnlichen Lokalisationsmuster beschrieben. Das Protein OOC-3 hat eine Funktion bei der Spindelorientierung und bei der Lokalisation von PAR-3, dem *C. elegans* Homolog von Baz, in der P₁ Zelle. OOC-3 besitzt 3 TMD und hat eine dynamische Verteilung in der Zelle. Im interphasen 2-Zell-Stadium ist OOC-3 im Cytoplasma, aber auch an den Zell-Zell-Grenzen lokalisiert und in der Mitose relokalisiert OOC-3 an die mitotische Spindel. Anzumerken ist, dass OOC-3 voraussichtlich ein ER Protein ist (Pichler et al., 2000). Dies könnte auch der Fall bei CG7739 sein, da es in einem gepunktet Muster exprimiert wird, wie es bei OOC-3 der Fall ist. Diese Punkte könnten aber auch Vesikel sein, die entweder das Protein nur transportieren, oder CG7739 ist eine Art Adresse, durch die die Vesikel (bzw. die Motorproteine) den vorhergesehenen Zielort des Vesikels erkennen können. Da viele Proteine in der Plasmamembran an eine bestimmte Stelle gelangen müssen, wäre es denkbar, dass Bazooka und CG7739 wie eine Art T- und V-Snares interagieren um andere Proteine an die apikale Membran zu führen.

CG17064 und CG7739 sind die vielversprechendsten Kandidaten zur Beantwortung der Fragen nach dem Protein, dass den PAR/aPKC Komplex an den Cytocortex bindet, und nach dem Bindeglied zwischen dem Komplex und der Spindel. Ob diese beiden Proteine eine Funktion während der asymmetrischen Zellteilung der NB haben und wenn ja, welche, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

3.2 Direkte Interaktionen der Protein im PAR/aPKC Komplex

Mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid Systems konnten die Domänen der Proteine des PAR/aPKC Komplexes bestimmt werden, die direkt miteinander interagieren.

Bazooka bindet mit der zweiten und der dritten PDZ Domäne schwach, und stärker mit der aPKC Bindungsdomäne, an die aPKC Kinase Domäne (KD). Diese KD kann auch an Insc binden, das dadurch mit dem Komplex verbunden ist. Eine Interaktion zwischen Insc und Bazooka konnte nicht nachgewiesen werden.

Die regulatorische Domäne (RD) der aPKC bindet an die ersten 100 AS von Par6 und Par6 bindet seinerseits mit der CRIB und der PDZ Domäne an Cdc42. Hier ist zu erwähnen, dass die wt Form von Cdc42 wie auch die konstitutiv aktive Form Cdc42V12 mit Par6 interagieren können.

Desweiteren wurde in *C. elegans* und bei Vertebraten beschrieben, dass Bazooka mit der ersten PDZ Domäne (bzw. mit einem Stück von Bazooka, das den N-Terminus, wie auch die erste PDZ Domäne, enthält) an die PDZ Domäne von Par6 bindet (Joberty et al., 2000; Lin et al., 2000) Diese Bindung konnte im Hefe-2-Hybrid System in *Drosophila* während dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Es ist möglich, dass Par6 und Bazooka in *Drosophila* nicht genau an der gleichen Stelle binden wie in den anderen Spezies. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass Bazooka im N-terminalen Bereich Stellen besitzt, in denen die verschiedenen Homologen unterschiedliche AS-Sequenzen aufweisen.

Zum großen Teil konnten die in anderen Spezies erforschten Bindungsdomänen auch im *Drosophila* PAR/aPKC Komplex nachgewiesen werden, was die funktionelle, wie auch strukturelle evolutionäre Nähe der Proteine im PAR/aPKC Komplex unterstreicht.

Dieser Fund beweist einmal mehr, dass zwischen der Fliege und den Menschen doch nicht ein so großer Unterschied besteht.

4. Material und Methoden

4.1 Chemikalien und sonstige Materialien

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

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

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

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

Kitsysteme:

- Jetquick Gel Extraction Spin Kit, *Genomed*, Bad Oeynhausen
- Nucleobond AX, *Macherey-Nagel*, Düren
- NucleoSpin Extract, *Macherey-Nagel*, Düren
- DIG RNA Labelling Kit, *Boehringer/Roche Diagnostics*, Mannheim
- TOPO TA Cloning Kit, *Invitrogen*, Groningen, Niederlande
- DES[®] Inducible Kit, *Invitrogene* (Groningen, Niederlande)
- μ MACS mRNA Isolation Kit, *Milteny Biotec*, Bergisch Gladbach
- Qiagen Plasmid Maxi Kit, *Qiagen*, Hilden
- OneStep RT-PCR Kit, *Qiagen*, Hilden

Photoarbeiten und Bildverarbeitung:

Röntgenfilm:	Fuji SuperRX, <i>Fuji</i> , Tokyo, Japan Kodak X-OMAT AR, <i>Kodak</i> , Rochester, USA
Röntgenfilm-Entwickler:	Tenetal Roentogen, <i>Tenetal</i> , Norderstedt
Röntgenfilm-Fixierer:	Tenetal Roentogen Superfix, <i>Tenetal</i> , Norderstedt
Photolichtmikroskop:	Zeiss Axiophot 2, <i>Zeiss</i> , Oberkochen
konfokales Mikroskop:	Leica TCS NT, <i>Leica</i> , Heidelberg
Computersystem:	Macintosh PowerPC, <i>Apple</i>
Bildverarbeitung:	Adobe Photoshop, <i>Adobe Systems</i> , San Jose, USA Canvas 6, <i>Deneba Systems</i> , Miami, USA

4.1.1 Lösungen

(In alphabetischer Reihenfolge)

Ampicillin:	100mg/ml Stammlösung in H ₂ O
BCIP:	50mg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat, Toluidin-Salz in DMF
Blockierlg.:	3% Milchpulver, 1% BSA in 1xTBST
Chloroform/Phenol:	50% Chloroform, 50% Phenol
DAB-Stock:	1mg/ml DAB (3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid, Aldrich, Steinheim) in 1xPBS, gelagert bei -20°C
Extraktions-Puffer:	100mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM EDTA pH 7.5, 0.5% SDS, 100mM NaCl
Färbelösung:	800 μ l 1xPBT + 200 μ l DAB-Stock (vorher aktiviert mit 1-2 μ l 30% H ₂ O ₂)
Fixierlösung, 4%:	200 μ l PBS, 125 μ l 37% Formaldehyd, 300 μ l Heptan
Fixierlösung, 8%:	100 μ l PBS, 250 μ l 37% Formaldehyd, 300 μ l Heptan

GST Pulldown Puffer:	20mM Tris-HCl pH 8, 0.2mM EDTA, 100mM NaCl, 1Mm DTT, 0.2% IGEPAL = Nonidet P40, Proteinase Inhibitoren
Hefe-Lysis-Lösung:	2% Triton X-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA
Hoyers/Lactat:	50ml H ₂ O + 30g Gummi arabicum ü.N. rühren, 200g Chloralhydrat und 16ml Glycerin zugeben; mindestens 3h bei 12000rpm zentrifugieren und den Überstand verwerfen; 1:1 mit Lactat mischen
Hybridisierlösung:	50% deionisiertes Formamid, 5xSSC, 100µg/ml denaturierte Lachsspermien-DNA, 100µg/ml Heparin, 0.1% Triton X-100
KAc/LiCl-Lösung:	1 Teil 5M Kaliumacetat : 2.5 Teile Lithiumchlorid
PEG/LiAc/TE:	40% PEG, 0.1M LiAc, TE
L1:	50mM Tris-HCl pH 8.0; 10mM EDTA; 100µg/ml RNaseA, gelagert bei 4°C
L2:	200mM NaOH; 1% SDS
L3:	3.0M Kaliumacetat pH 5.5
Lysis-Puffer	(E.-Extrakt): 150mM NaCl, 50mM Tris pH 8.0, 1% Triton X-100, inklusive folgenden Protease-Inhibitoren: Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin, Pefabloc (je 2µg/ml)
Matsch-Puffer:	10mM Tris pH8.2, 1mM EDTA, 25mM NaCl, 200_g/ml Proteinase K
Moviol:	5g Moviol/Elvanol mit 20ml PBS 16h bei RT mischen, 10ml Glycerin zufügen und nochmals 16h bei RT mischen, bei 4000rpm 10min zentrifugieren und aliquotieren
NBT-Puffer:	100mM NaCl, 50mM MgCl ₂ , 100mM Tris-HCl pH 9.5, 0.1% Triton X-100
NBT:	75mg/ml Nitroblau-Tetrazolium-Salz in DMF
PBS, 1x:	8g NaCl, 0.2g KCl, 1.44g Na ₂ HPO ₄ , 0.24g KH ₂ PO ₄ in 1l H ₂ O auflösen; pH auf 7.4 einstellen, autoklavieren
PBT, 1x:	1xPBS mit 0.1% Triton X-100

4. Material und Methoden

Sammelgel, 4%:	310 μ l 30% Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1), 235 μ l 1M Tris pH 6.8, 10 μ l 20% SDS, 1.3ml H ₂ O, 10 μ l 10% APS, 5 μ l TEMED
SDS-Elektrophoresep.:	25mM Tris, 250mM Glyzin pH 8.3, 0.1% SDS
SDS-Probenpuffer, 2x:	100mM Tris-HCl pH 6.8, 200mM DTT, 4% SDS, 0.2% Bromphenolblau, 20% Glyzerin
Stefanini Lösung:	1.1ml 37% Formdehyd, 1.5ml 500mM Pipes, 1.5ml gesättigte Pikrinsäure auf 10ml mit H ₂ O auffüllen
1xTBST:	50mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% Tween
TE:	10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0
Trenngel (10%):	2.5ml 30% Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1), 2.8ml 1M Tris pH 8.8, 38 μ l, 20% SDS, 2.1ml H ₂ O, 30 μ l 10% APS, 8 μ l TEMED 7.5%: 1.9ml 30% Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1), 2.7ml H ₂ O, 2.8ml 1M Tris pH 8.8, 38 μ l, 20% SDS, 30 μ l 10% APS, 8 μ l TEMED 12%: 3.1ml 30% Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1), 1.5ml H ₂ O, 2.8ml 1M Tris pH 8.8, 38 μ l, 20% SDS, 30 μ l 10% APS, 8 μ l TEMED
Triton-Salz Lösung:	40g NaCl, 3ml Triton X-100, bis zu 1l mit H ₂ O auffüllen
Ziegenserum:	Gibco/BRL, Eggenstein, inaktiviert durch 1h bei 56°C, gelagert bei -20°C

4.1.2 Medien

Bakterien

SOB -Mg ²⁺ :	2% Bactotrypton, 0.5% Bactoyeast, 10mM NaCl, 2.5mM KCl
LB:	1% Bactotrypton, 0.5% Bactoyeast, 1% NaCl
LB-Agar:	6.3g Agar/300ml LB

Fliegen

Standardmedium: 356g Maisschrot, 47.5g Sojamehl, 84g Trockenhefe, 225g Malzextra, 10% Nipagin, 22.5ml Propionsäure, 28g Agar, 200g Zuckerrübensirup mit 4.9l H₂O auffüllen

Hefen

YPDA: 20g/l Difco peptone, 10g/l Hefe-Extrakt, 300mg/l L-Adenine hemisulfat Salz autoklavieren

YPDA-Agar: 15g Agar/ l YPDA, autoklavieren

SD: 6.7g Difco yeast nitrogen base without amino acids in 850ml H₂O auflösen , autoklavieren, 100ml 10x Dropout Lösung und 50ml 40% Glukose hinzufügen; ggf. 10ml 100x Histidin und/oder 5ml 100x Leucin und/oder 100x Tryptophan zugeben

SD-Agar: 15g Agar/ l SD, autoklavieren

40% Glukose: 200g Glukose und 300g H₂O mischen und autoklavieren

10x Dropout Lösung: 300 mg/l L-Isoleuzin, 1500mg/l L-Valin, 300mg/l L-Adenine hemisulfat Salz, 200mg/l L-Arginin HCl, 300mg/l L-Lysin HCl, 200mg/l L-Methionin, 500mg/l L-Phenylalanin, 2000mg/l L- Threonin, 300mg/l L-Tyrosin, 200mg/l L-Urazil, autoklavieren

100x Histidin: 2000mg/l L-Histidin HCl monohydrate, autoklavieren

100x Leucin: 10g/l L-Leucin, autoklavieren

100x Tryptophan: 2000mg/l L-Tryptophan, autoklavieren

4.1.3 Bakterienstämme

XL1-blue MRF' Tetrazyklin-Resistenz

BL21 (DE3) pLysS Ampizillin-Resistenz

4.1.4 Vektoren

pBluescript KS+/SK+	Vektor für Subklonierung, Sequenzierung, <i>in vitro</i> -Transkription (<i>Stratagene</i> , Heidelberg)
pGEX	Vektor zur Erzeugung von GST-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i> (Smith and Johnson, 1988; <i>Amersham Pharmacia Biotech</i> , Buckinghamshire, England)
pUAS	Vektor zur Herstellung von UAS-Effektorlinien in <i>Drosophila</i> (Brand und Perrimon, 1993)
pGBT9	Hefe-Expressionsvektor zur Herstellung von Fusionsproteinen mit der DNA-Bindungsdomäne von GAL4 (<i>Clontech</i> , Heidelberg)
pGBKT7	Hefe-Expressionsvektor zur Herstellung von Fusionsproteinen mit der DNA-Bindungsdomäne von GAL4 (<i>Clontech</i> , Heidelberg)
pAS2-1	Hefe-Expressionsvektor zur Herstellung von Fusionsproteinen mit der DNA-Bindungsdomäne von GAL4
pACT2	Hefe-Expressionsvektor zur Herstellung von Fusionsproteinen mit der Aktivierungsdomäne von GAL4 (<i>Clontech</i> , Heidelberg)

4.1.5 Oligonukleotide

Die folgenden synthetischen Oligonukleotide (*BioTeZ*, Berlin-Buch) wurden im Rahmen dieser Arbeit für PCR und RT-PCR eingesetzt:

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
Dystrophin:		
pHSI83/486-504/for	GGACAACATTTTCATTGGAG	durch sequ.
pHSI83/801-19/for	CGCAGAGGAGATCATGGAG	durch sequ.
CG7739:		
CG7739/635-52for	<u>cggaattc</u> AAGGAAAAGCGCGAGGAT	C-term
CG7739/955-73/rev	c <u>cgctcgag</u> GAGCATCTCTATTGATTCC	C-term
CG7739if/1723-40for	<u>cggaattctc</u> AAGGAAAAGCGCGAGGAT	in frame

pHSI76/567-84/for	GACTGTAGGACTGGGCAG	durch sequ.
CG77391788rev	CTAATAGCAATAATACTTTCCAAC	MR-test
CG7739966for	GAAATATATTCACATATCTCTCTG	MR-test
EG:80H7.5:		
EG3'	CGCTGGATGAAAGTAAACTGC	mut. auswerten
EG5'	GAATCCGACGCTCGACAAAC	mut. auswerten
P(GT1)8340-59for	CGTCCGCACACAACCTTTCC	mut. auswerten
pHSI65/354-72/for	GTGTCGCAAGCGGCCAAG	durch sequ.
Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
pHSI65/517-36/for	CCTCCGGCAACAAGCTCAAC	durch sequ.
CG17064:		
pHSI57/649-67/for	GGACTGCGAGGAGGATATG	durch sequ.
pHSI57/806-25/for	CGAAACCGGTGCAGGCTGAG	durch sequ.
CG17492:		
pHSI31/681-99/for	CTGAACTCCGACGCAACAC	durch sequ.
DaPKC		
Rdom(KT7)/1-19/for	<u>gcgaattcc</u> ATGCAGAAAATGCCCTCGC	reg. Domain
R-dom/707-26/rev	<u>ccgctcgag</u> CACTATGTGCGCATGGTCGT	reg. Domain
R-dom/1-19/for	<u>gcgaattcct</u> ATGCAGAAAATGCCCTCGC	reg. Domain
Kin-dom/707-26/for	<u>cggaattc</u> ACGACCATGCGCACATAGTG	Kinase dom.
Kin-dom/1802-21/rev	<u>ccgctcgag</u> TCAGACGCAATCCTCCAGAG	Kinase dom.
Kdom(KT7)/707-26/for	<u>cggaattc</u> CGACCATGCGCACATAGTG	Kinase dom.
Bazooka		
aPKCbind/3272-91/rev	<u>ccgctcgag</u> CTGCAGCTCCTGCACCATAG	BAB
aPKCbind/2587-2607/for	<u>cggaattc</u> GCAGTGCAGCTCTGAGAAAC	BAB
aPKCbind(KT7)/2587-2607/for	<u>cggaattc</u> CAGTGCAGCTCTGAGAAAC	BAB
Dcdc42		
5'Cdc42	<u>tccccggg</u> GATGCAAACCATCAAGTGCGTG	cdc42
3'Cdc42	<u>cggaattc</u> TTATAAGAATTTGCACTTCC	cdc42
Par6		
CRIB5'	<u>ggaattc</u> GAGAAACCGAGAAACCTC	CRIB-dom
CRIB3'	<u>ggtgccccggg</u> TATGTAGAATCC	CRIB-dom
PDZ3'(par6)	<u>acagctccccggg</u> TCCTTGAAAAG	PDZ-dom

Tabelle 3: Eingesetzte Oligonukleotide

Anmerkung: Klein geschriebene Basen dokumentieren Abweichungen von der 'template'-DNA-Sequenz und die unterstrichenen Basen zeigen die eingeführten künstliche Restriktionsschnittstellen an.

4.2 Molekularbiologische Methoden

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

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte entweder unter Verwendung des Jetquick Gel Extraktion Spin Kits der Firma *Genomed*, Bad Oeynhausen oder des NucleoSpin Extrakt Kits der Firma *Macherey-Nagel*, Düren, beides nach Angaben des Herstellers. DNA-Sequenzierungen wurden von den Firmen *SEQLAB* (Göttingen), *AGOWA* (Berlin) oder *MWG* (Ebersberg) durchgeführt.

4.2.1 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

(modifiziert nach Hanahan et al., 1991)

- Animpfen von 50ml SOB -Mg²⁺ mit einer frischen Bakterien-Einzelkolonie (bei *E. coli* XL1-blue-Zellen 12.5µg/ml Tetrazyklin hinzufügen) und ü.N. bei 37°C, 225rpm inkubieren
- 500ml vorgewärmtes SOB -Mg²⁺ ohne Antibiotikum mit 7.5ml der ü.N.-Kultur animpfen und bei 37°C, 150rpm bis zu einer OD von 0.6-0.8 wachsen lassen
! alle weiteren Arbeitsschritte sollten auf Eis/im Kühlraum erfolgen!
- überführen in vorgekühlte Zentrifugenbecher und 15min auf Eis inkubieren
- 15min bei 4°C, 4000rpm zentrifugieren, Überstand vorsichtig abgießen
- Pellet vollständig in 500ml kaltem 10% Glycerin resuspendieren
- nochmals 15min bei 4°C, 4000rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Pellet erneut in 500ml kaltem 10% Glycerin resuspendieren

- nochmals 15min bei 4°C, 4000rpm zentrifugieren
- Überstand vollständig entfernen und Pellet in 1.5ml kaltem 10% Glycerin resuspendieren
- Aliquots à 50µl in Eppendorf-Gefäße überführen, in flüssigem Stickstoff schockgefrieren und bei -70°C lagern (frühestens 1h nach Herstellung verwenden)

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

4.2.2 Transformation elektrokompetenter Zellen

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

- Ligation 1:5 bis 1:10, Mini/Midi 1:50 bis 1:100 in H₂O verdünnen
- auf Eis 1µl der DNA-Lösung zu 50µl kompetenten Zellen geben, mischen und in vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettieren
- Elektroporation durchführen, die Bakteriensuspension mit 600µl LB auffüllen und in ein Eppendorf-Gefäß überführen
- 1h bei 37°C inkubieren
- eine geeignete Menge auf eine LB_{amp}-Agarplatte (100µg/ml Ampicillin) ausstreichen und ü.N. bei 37°C inkubieren

4.2.3 Transformation von Plasmid DNA in *Saccharomyces cerevisiae*

(Modifiziert nach dem Protokoll der Firma *Clontech*, Palo Alto, USA)

- ü.N.-Kultur eines beliebigen Hefestammes auf OD₆₀₀ 0.2 verdünnen und dann bis zur exponentiellen Phase wachsen lassen (OD₆₀₀ zwischen 0.6-0.8)
- 50ml dieser Kultur für 5min bei 5000rpm zentrifugieren
- Pellet mit 20ml H₂O waschen und erneut bei 5000rpm für 5min zentrifugieren
- Pellet mit 20ml 0.1M LiAc waschen und zentrifugieren
- Pellet in 0.1M LiAc bis zu einem Endvolumen von 300µl resuspendieren
- 15min bei 30°C inkubieren

- In der Zwischenzeit DNA vorbereiten: 2µl Heringssperm DNA, 1µg zu transformierende Plasmid DNA und 300µl PEG/LiAc/TE Lösung mischen
- 150µl der Hefelösung mit der DNA Lösung mischen und 30min bei 30°C inkubieren
- Mischen und dann bei 42°C 20min hitzeschocken
- 30sec bei 7000rpm zentrifugieren
- Pellet in 1ml YPDA resuspendieren und 1Std. bei 30°C inkubieren
- 30sec bei 7000rpm zentrifugieren und Pellet in 50µl H₂O resuspendieren
- Auf selektiver SD-Agarplatte ausstreichen und 2-5 Tage wachsen lassen

4.2.4 Haltung von Schneider Zellen (S2 Zellen) und Transfektion von Plasmid DNA in S2 Zellen

Die Haltung der S2 Zellen, wie auch die Transfektion der DNA in die Zellen wurde mit Hilfe des Kits: *DES[®] Inducible Kit* der Firma *Invitrogene* (Groningen, Niederlande) genau nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Lösungen wurden von der Firma *Gibco/BRL Life Technologies* (Karlsruhe) bezogen.

4.2.5 Isolierung von DNA und RNA

4.2.5.1 Präparation von Plasmid-DNA

Um nach einer Bakterientransformation möglichst schnell viele Bakterien-Einzelkolonien auf die enthaltene Plasmid-DNA zu testen, wird eine sog. 'Mini-Präp' durchgeführt. Diese erfolgte nach einem laborintern modifizierten Protokoll der Firma *Qiagen*, Hilden.

- 1.5ml einer ü.N.-Kultur für 2min bei 13000rpm abzentrifugieren
- Pellet in 300µl L1 resuspendieren
- 300µl L2 zusetzen, invertieren
- 5min bei RT inkubieren
- 300µl L3 zusetzen, invertieren

- 10min bei 13000rpm zentrifugieren, Überstand in frisches Eppendorf-Gefäß überführen und mit 640µl Isopropanol fällen
- 20min bei 13000rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet mit kaltem 70% Ethanol waschen und 5min bei 13000rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Pellet lufttrocknen und in 40µl H₂O aufnehmen

4.2.5.2 *Präparation von genomischer DNA aus Drosophila*

(modifiziert nach Hamilton und Zinn, 1994)

- ca. 30 betäubte Fliegen in einem Eppendorf-Gefäß sammeln und in flüssigem Stickstoff schockgefrieren
- Fliegen mit einem Homogenisator (Bio-Vortexer, *Biospec Products*, Bartlesville, USA) weitestgehend pulverisieren
- 200µl Extraktionspuffer zugeben, homogenisieren und portionsweise weitere 200µl Extraktionspuffer zugeben (Überschäumen verhindern)
- 30min bei 65°C inkubieren
- 800µl KAc/LiCl-Lösung hinzufügen, vorsichtig mischen
- mind. 10min auf Eis inkubieren
- 15min bei 13000rpm zentrifugieren, Überstand vorsichtig in frisches Eppendorf-Gefäß überführen (dabei Scherung der DNA durch zu enge Pipettenspitze vermeiden -> Pipettenspitze abschneiden)
- 600µl Isopropanol zugeben, mischen, 15min bei 13000rpm zentrifugieren
- Pellet mit 70% Ethanol waschen, 5min bei 13000rpm zentrifugieren, Pellet trocknen und in 100µl TE aufnehmen
- 20mg/ml RNaseA hinzufügen, bei -20°C lagern

4.2.5.3 *Präparation von genomischer DNA aus Saccharomyces cerevisiae*

(modifiziert nach Hoffman und Winter, 1987)

- 1.5ml einer ü.N. -Kultur für 5min bei 13000rpm abzentrifugieren, Überstand verwerfen

- Pellet wird im restlichen Überstand resuspendiert
- 200µl Hefe-Lysis-Lösung zufügen, mischen
- 200µl Chloroform/Phenol und 300µl Glasperlchen (425-600µm; Sigma #G-8772) hinzufügen
- 2min vortexen
- 5min bei 13000rpm zentrifugieren
- Überstand in frisches Eppendorf-Gefäß überführen und mit 0.3 vol NaCl und 2.5 vol Ethanol fällen
- Pellet mit kaltem 70% Ethanol waschen und 5min bei 13000rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Pellet lufttrocknen und in 50µl TE aufnehmen

4.2.5.4 Isolierung von polyA⁺-RNA

Die Isolierung von polyA⁺-RNA aus der zuvor gewonnenen Gesamt-RNA (s.o.) erfolgte nach Herstellerangaben mithilfe von Dynabeads Oligo (dT)₂₅, *Dynal AS*, Oslo, Norwegen. Der Anreicherungseffekt beruht dabei auf der Bindung des poly(A)-Schwanzes der meisten mRNA's an die oligo(dT)₂₅-Reste der paramagnetischen Dynabeads. RNA-Populationen ohne poly(A)-Schwanz (rRNA und tRNA) werden dagegen ausgewaschen. Die so gewonnene polyA⁺-RNA wurde für OneStep RT-PCR verwendet.

4.2.6 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Die Polymerase-Kettenreaktion erlaubt die gezielte Amplifikation ausgewählter DNA-Sequenzen (Mullis und Faloona, 1987). Zwei auf den entgegengesetzten DNA-Strängen lokalisierte Oligonukleotide ('Primer') dienen dabei als Startstellen für eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase (z.B. Taq-Polymerase). Durch sich wiederholende Zyklen aus Aufschmelzen der DNA, Bindung der Oligonukleotide und Strangsynthese wird die zwischen den 'Primern' liegende DNA-Sequenz exponentiell

vervielfältigt. Neben der Standard-PCR wurden im Laufe dieser Arbeit auch einige Weiterentwicklungen wie RT-PCR angewandt. Für alle PCR-Anwendungen wurde der Minicycler von der Firma *Biozym*, Oldenburg, eingesetzt. Die Aufreinigung aller PCR-Produkte erfolgte mit dem NucleoSpin Extrakt Kit von *Macherey-Nagel*, Düren.

4.2.6.1 Standard-PCR

Die PCR auf Plasmid DNA oder genomischer DNA erfolgte nach einem Standardprotokoll.

Die typischen Komponenten eines 50µl Reaktionsansatzes stellten sich dabei wie folgt dar:

1µl	'template'-DNA (ca. 10ng)
1µl	'Primer' 1 (12.5mM)
1µl	'Primer' 2 (12.5mM)
5µl	10xReaktionspuffer
6µl	25mM MgCl ₂ (falls nicht im Puffer inbegriffen)
5µl	10xReaktionspuffer
2µl	dNTP-Mix (je 25mM)
0.5µl	Taq-Polymerase (5U/µl)
33.5 µl	H ₂ O

Ein passendes Standard-PCR-Programm sah folgendermaßen aus:

	Dauer	Temperatur	Bedeutung
	2min	94°C	Denaturierung der DNA
35x wdh	30sec	94°C	Denaturierung der DNA
	1min	'Primer'- abhängig	Bindung der 'Primer' an die 'template'-DNA ('Annealing')
	1min	72°C	DNA-Synthese ('Elongation')
	10min	72°C	finale DNA-Synthese ('Elongation')
	∞	4°C	Reaktionsende

Tabelle 4: Standard-PCR-Programm

4.2.6.2 OneStep RT-PCR

Bei der RT-PCR geht der eigentlichen PCR eine reverse Transkription ('RT') voraus, in der ausgehend von polyA⁺-RNA einzelsträngige DNA gebildet wird. Ermöglicht wird dies durch reverse Transkriptasen aus RNA-enthaltenden Retroviren wie z.B. dem avian myeloblastosis virus (AMV), dem Moloney murine leukemia virus (MMLV) oder dem human immunodeficiency virus (HIV). Neben ihrer RNA-abhängigen DNA-Polymerase-Funktion besitzen diese eine RNase H-Aktivität zum Abbau der RNA im entstehenden RNA-DNA-Hybrid. Zunächst wird die RNA in der eigentlichen RT-Reaktion revers transkribiert, entweder die gesamte polyA⁺-RNA-Population mithilfe eines Oligo-dT-'Primers' oder nur die gewünschte Subpopulation durch den Einsatz eines genspezifischen 'Primers', gefolgt von einer PCR mit genspezifischen 'Primern'. Die Firma *Qiagen*, Hilden hat ein System entwickelt, um beide Schritte auf einen zu reduzieren. Dieses „OneStep RT-PCR“ System wurde nach Herstellungsangaben verwendet. Das anschließende PCR-Programm wurde aus dem OneStep RT-PCR Kit, *Qiagen*, Hilden, übernommen.

Nachfolgend ist ein typischer Reaktionsansatz dargestellt:

1µl	polyA ⁺ -RNA (ca. 1µg)
2µl	dNTP-Mix (je 10mM)
10µl	5x <i>Qiagen</i> OneStep RT-PCR Puffer
0.5µl	spezif. vorwärts 'Primer' (25µM)
0.5µl	spezif. rückwärts 'Primer' (25µM)
2µl	<i>Qiagen</i> OneStep RT-PCR Enzyme Mix
0.5µl	RNase Inhibitor
13µl	RNase freies H ₂ O

Das vorgegebene PCR-Programm sah wie folgt aus:

	Dauer	Temperatur	Bedeutung
	30min	50°C	Reverse Transkriptions- Reaktion
	15min	95°C	Initialer PCR Aktivierungsschritt
35x wdh	30sec	94°C	DNA Denaturierung
	1min	'Primer'- abhängig	Bindung der 'Primer' an die 'template'-DNA ('Annealing')
	1min	72°C	DNA-Synthese ('Elongation')
	10min	72°C	finale DNA-Synthese ('Elongation')
	∞	4°C	Reaktionsende

Tabelle 5: PCR-Programm bei OneStep RT-PCR

4.2.6.3 Single Fly PCR

Um herauszufinden ob und wenn ja in welche Richtung ein mobilisiertes P-Element ein Stück genomische DNA mitgenommen hat wurde an einzelnen Fliegen eine PCR gemacht. Die Präparation der Fliege für die PCR wurde wie folgt gemacht:

- 1 Fliege betäuben und ein Reaktionsgefäßchen überführen
- in flüssigem Stickstoff schockgefrieren
- 50_µl Matsch-Puffer zufügen und mit gelber Pipettenspitze die Fliege 5-10sec zermatschen
- 30min bei 37°C inkubieren
- Proteinase K durch Erhitzen bei 90°C für 1-2min inaktivieren
- Gemisch bei 4°C lagern
- 10-15_µl dieser Lösung für PCR (siehe Standard-PCR) verwenden

4.2.7 Die Herstellung der verwendeten Plasmid-Konstrukte

4. Material und Methoden

In Tabelle 4 sind alle in dieser Arbeit hergestellten Plasmide aufgelistet. Die eingefügten DNA-Stücke, die mit hellgrau unterlegt sind, wurden mit einer PCR hergestellt, anschließend wurden sie, wie auch die Vektoren, mit den Restriktionsenzymen (RE) 5' und 3' geschnitten, ligiert und in *E. coli* transformiert um die DNA zu amplifizieren.

Alle anderen eingefügten DNA-Stücke wurden aus den Vektoren, die in der Tabelle unter „Ausgangs-DNA“ geführt werden, ausgeschnitten (mit 5' RE und 3'RE), mit den Vektoren, die auch mit 5' RE und 3'RE geschnitten wurden, ligiert und ebenfalls in *E. coli* transformiert.

Vektor	Eingef. DNA	5' RE	3' RE	Ausgangs-DNA	Kommentar
pACT2	dys2	Sma I	Sal I	pHSI83	Dystrophin AS 1514-2690
	cdc42V12	Sma I	EcoR I	genom. DNA P{UAS-Cdc42.V12}	konstitutiv aktive Form von Cdc42
	BazBAB	EcoR I	Xho I	pGEX/BAB	aPKC Bindungsst. in Baz (AS875-1085)
	Par6CRIB	EcoR I	Sal I	pGBT9/Par6CRIB	CRIB Domäne von Par6 (AS135-151)
	Par6CRIB/PDZ	EcoR I	Sal I	pGBT9/Par6CRIB+PDZ	CRIB+PDZ Dom. von Par6 (AS135-253)
	cdc42	Sma I	EcoR I	genom. DNA wt-Fliegen	wt Form von cdc42
	aPKC RD	EcoR I	Xho I	pGEX/RD	Regulatorische Domäne aPKC (AS1-242)
	aPKC KD	EcoR I	Xho I	pGEX/KD	Kinase Domäne aPKC (AS235-Stop)
	BNT	Sma I	BamH I	pGBT9/BNT (von A. Ramrath)	Baz N-Terminus (AS1-318 (w/o PDZ))
	CT	EcoR I	Xho I	pHSI76	C-Terminus von CG7739 w/o TMD
	EG; FYVE	EcoR I	Xho I	pHSI65	FYVE Dom. von EG:80F7.5 (AS144-213)
pAS2-1	Par6NT (133)	Nar I	Pst I	pAS2-1/DmPar6 (A.Ramrath)	ersten 133AS von Par6
	Par6NT (100)	Sma I	Pst I	pAS2-1/DmPar6 (A.Ramrath)	ersten 100AS von Par6
pBS	1	Xho I	BamH I	pHSI 1	Umklonierung für <i>in situ</i> Hybridisierung
	8	Xho I	BamH I	pHSI 8	Umklonierung für <i>in situ</i> Hybridisierung
	9	Xho I	BamH I	pHSI 9	Umklonierung für <i>in situ</i> Hybridisierung
	10	Xho I	BamH I	pHSI 10	Umklonierung für <i>in situ</i> Hybridisierung
	16	Xho I	BamH I	pHSI 16	Umklonierung für <i>in situ</i> Hybridisierung
	32	Xho I	BamH I	pHSI 32	Umklonierung für <i>in situ</i> Hybridisierung
	56	Xho I	BamH I	pHSI 56	Umklonierung für <i>in situ</i> Hybridisierung

Vektor	Eingef. DNA	5' RE	3' RE	Ausgangs-DNA	Kommentar
	57	Xho I	BamH I	pHSI 57	Umklonierung für in situ Hybridisierung
	65	Xho I	BamH I	pHSI 65	Umklonierung für in situ Hybridisierung
	67	Xho I	BamH I	pHSI 67	Umklonierung für in situ Hybridisierung
	70	Xho I	BamH I	pHSI 70	Umklonierung für in situ Hybridisierung
	76	Xho I	BamH I	pHSI 76	Umklonierung für in situ Hybridisierung
	80	Xho I	BamH I	pHSI 80	Umklonierung für in situ Hybridisierung
	83	Xho I	BamH I	pHSI 83	Umklonierung für in situ Hybridisierung
	85	Xho I	BamH I	pHSI 85	Umklonierung für in situ Hybridisierung
pGBT9	Par6CRIB	EcoR I	Sma I	pAS2-1/DmPar6 (A.Ramrath)	CRIB Domäne von Par6 (AS135-151)
	Par6CRIB/PDZ	EcoR I	Sma I	pAS2-1/DmPar6 (A.Ramrath)	CRIB+PDZ Dom. von Par6 (AS135-253)
pGBKT7	BNT	EcoR I	BamH I	pGBT9/BNT (von A. Ramrath)	Baz N-Terminus (AS1-318 (w/o PDZ))
	Insc	Sma I	Sal I	pGBT9/Insc (A. Ramrath)	ORF von Insc
	aPKC KD	EcoR I	Xho I	pBS/aPKC (A. Ramrath)	Kinase Domäne aPKC (AS235-Stop)
	aPKC RD	EcoR I	Xho I	pBS/aPKC (A. Ramrath)	Regulatorische Domäne aPKC (AS1-242)
	BazBAB	EcoR I	Xho I	pACT2/baz (A.Ramrath)	aPKC Bindungsst. in Baz (AS875-1085)
	Par6NT (100)	Sma I	Pst I	pAS2-1/Par6NT (100))	N-term Par6 (AS1-100)
pGEX	57	EcoR I	Xho I	pHSI57	Umklonierung für GST-Pulldown
	76	EcoR I	Xho I	pHSI76 in frame	Umklonierung für GST-Pulldown
	83	EcoR I	Xho I	pHSI83	Umklonierung für GST-Pulldown
	85	EcoR I	Xho I	pHSI85	Umklonierung für GST-Pulldown
	Par6	Xma CI	Xho I	pAS2-1/DmPar6 (A.Ramrath)	Par6 FL für GST-Pulldown
	aPKC KD	EcoR I	Sma I	pBS/aPKC (A. Ramrath)	Kinase Domäne aPKC (AS235-Stop)
	aPKC RD	EcoR I	Sma I	pBS/aPKC (A. Ramrath)	Regulatorische Domäne aPKC (AS1-242)
	BazBAB	EcoR I	Sma I	pACT2/baz (A.Ramrath)	aPKC Bindungsst. in Baz (AS875-1085)
	CT	EcoR I	Xho I	pHSI76 in frame	C-Term von CG7739 o. TMD (AS 574-Stop)
pMBP	CT	Nde I	Xho I	pACT2/CT	C-Terminus von CG7739 w/o TMD
pMT/V5-His 1-3	CG7739	Not I	Xba I	pUAST/D1 (Silke Schreiber)	cDNA von CG7739

Tabelle 6: Liste der hergestellten Konstrukte

4.3 Genetische Methoden

4.3.1 Fliegenzucht

Die Haltung der Fliegen erfolgte im Wesentlichen wie von Ashburner (1989) beschrieben auf Standardmedium bei 18°C, RT und 25°C. Eiablagen wurden auf Apfelsaft-Agarplatten angesetzt, die zur Stimulation der Eiablage mit einem Tupfer Hefe wurden.

4.3.2 Fliegenstämme, Chromosomen und Allele

In den folgenden Tabellen sind alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Fliegenstämme (Balancer-Chromosomen, mutante und transgene Fliegenstämme) zusammengefasst.

4.3.2.1 Balancer-Chromosomen

Stämme	Bemerkung	Referenz
<u>1. Chromosom</u>		
FM7blue ^{ftz}	Balancer-Chr. mit P(<i>ftz-lacZ</i>)-Insertion	Y.Hiromi
<u>3. Chromosom</u>		
TM3	Balancer-Chr.	Lindsley und Zimm, 1992
TM6B	Balancer-Chr.	Lindsley und Zimm, 1992
TM3/blue ^{ftz}	Balancer-Chr. mit P(<i>ftz-lacZ</i>)-Insertion	Y. Hiromi

Tabelle 7: Verwendete Balancer-Chromosomen

4.3.2.2 Mutante Fliegenstämmen und P-Element Insertionslinien

Stämme	Bemerkung	Referenz
<u>1. Chromosom</u>		
P{lacW}Nnp-1 ^{k07826}	P-Element Insertion vor dem Gen <i>Nnp-1</i>	Kiss et al. 1997
<u>2. Chromosom</u>		
P{PZ}drk ¹⁰⁶²⁶	P-Element Insertion vor dem Gen <i>drk</i>	Spradling et al. 1993
P{lacW}zf30C ^{k02506}	P-Element Insertion vor dem Gen <i>zf30C</i>	Kiss et al. 1997
P{GT1}EG:80H7.5 ^{BG02357}	P-Element Insertion vor dem Gen <i>EG:80H7.5</i>	Bellen et al. 2001
EP(3R)3409	P-Element Insertion vor dem Gen <i>Lk6</i>	FlyBase, 1992
Df(2L)TE29Aa-11	Defizienz 28E4-7; 29B2-C1	Aguarde et al. 1999
Stämme	Bemerkung	Referenz
<u>3. Chromosom</u>		
Df(3L)XG8	Defizienz 71D; 71F	(Grosshans et al., 2003)
P{lacW}l(3)s1754	P-Element Insertion vor dem Gen <i>CG7739</i>	Scott et al. 1994
EY14009	P-Element Insertion vor dem Gen <i>CG7739</i>	Bellen et al. 2004
EP(GE24395)	P-Element Insertion vor dem Gen <i>CG7739</i>	Bellen et al. 2004

Tabelle 8: Verwendete Mutante Fliegenstämmen und P-Element Insertionslinien

4.3.2.3 UAS-Effektorlinie und GAL4 Aktivationslinien

Stämme	Bemerkung	Referenz
UAS-Cdc42V12	Cdc42V12-Effektor	Luo et al. 1994
<i>daG32</i>	<i>daughterless</i> -GAL4	Wodarz et al., 1995
<i>en</i> -GAL4	<i>engrailed</i> -GAL4	Harrison et al. 1995

Tabelle 9: Verwendete UAS-Effektorlinie und GAL4 Aktivationslinien

4.3.3 Das GAL4/UAS-System

Bis vor einigen Jahren konnte die Bedeutung eines Gens für die Entwicklung von *Drosophila* nur anhand von vorhandenen Mutationen ermittelt werden. Deren Untersuchung erlaubt zwar Vorhersagen darüber, an welchem Ort und zu welchem Zeitpunkt die Genfunktion wahrscheinlich benötigt wird, einer vollständigen Charakterisierung des Gens sind hierbei allerdings Grenzen gesetzt. Wird das Genprodukt nämlich an mehreren Punkten der Entwicklung benötigt, so können die späteren Funktionen verdeckt werden, wenn ein früher Verlust bereits letal wirkt. Sind andererseits gar keine Mutationen im zu untersuchenden Gen bekannt, lassen sich überhaupt keine Aussagen über seine funktionelle Relevanz machen.

Die Funktion eines Gens lässt sich jedoch nicht nur anhand von Verlust-Mutationen beschreiben, sondern auch durch dessen Expression an ektopischen Orten oder in unphysiologisch hohen Dosierungen. Möglich wurde dies durch den Einsatz des Hitzeschock-induzierbaren *hsp70*-Promotors. Dem zu untersuchenden Gen vorgeschaltet aktiviert dieser durch Inkubation bei 37°C dessen Transkription. Dies ermöglicht zwar eine zeitliche, aber keine räumliche Kontrolle der Genexpression, da diese ubiquitär erfolgt. Außerdem besitzt der *hsp70*-Promotor bereits bei niedrigeren Temperaturen eine Basalaktivität, die je nach zu untersuchendem Gen letal sein kann.

Erst mithilfe des von Brand und Perrimon im Jahre 1993 entwickelten GAL4/UAS-Systems wurde eine zeitlich und räumlich beeinflussbare Genexpression möglich. Unter dem Einfluss zeit- und gewebespezifischer Enhancer wird in einem als 'Aktivator' bezeichneten Fliegenstamm der Hefe-Transkriptionsfaktor GAL4 exprimiert. In einem zweiten, 'Effektor' genannten Fliegenstamm steht das zu

untersuchende Gen unter dem Einfluss von UAS-Sequenzen ('upstream activating sequences'), den Bindungsstellen für GAL4. Durch Kreuzung von 'Aktivator'- und 'Effektor'-Stamm gelangen beide Komponenten in einen Organismus und führen zur GAL4/UAS-vermittelten Expression des Zielgens unter der räumlichen und zeitlichen Kontrolle der Enhancer.

4.3 Histologische Methoden

4.4.1 Verwendete Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Verdünnung	Fixierung	Referenz
_Baz N-term	monoklonaler Kaninchen-Antikörper	1/1000	4%, HF	Wodarz, et al.
_Baz N-term	monoklonaler Ratten-Antikörper	1/250	4%, HF	Wodarz, et al.
_aPKC	monoklonaler Kaninchen-Antikörper	1/1000	4%	<i>Sigma</i>
_CG7739	monoklonaler Kaninchen-Antikörper (EP023003)	1/500	Steffanini, 4%	diese Arbeit
_CG17064	monoklonaler Kaninchen-Antikörper (Hase Nr. 738)	1/1000	HF, 4%	diese Arbeit
_Dys	monoklonaler Kaninchen-Antikörper (EP023002)	1/500	4%, HF	diese Arbeit
_Tubulin	monoklonaler Maus-Antikörper	1/500	Strong Fix	Hybridoma Bank
Esel-_-Kaninchen-Cy2/Cy3/ALEXA	polyklonaler Esel-Antikörper	1/200		<i>Dianova</i>
Esel-_-Ratte-Cy2/Cy3/ALEXA	polyklonaler Esel-Antikörper	1/200		<i>Dianova</i>
Esel-_-Maus-Cy2/Cy3/ALEXA	polyklonaler Esel-Antikörper	1/200		<i>Dianova</i>
Esel-_-Meerschweinchen-Cy2/Cy3/ALEXA	polyklonaler Esel-Antikörper	1/200		<i>Dianova</i>
Ziege-_-Maus-HRP	polyklonaler Ziegen-Antikörper	1/10000		<i>Dianova</i>

Antikörper	Beschreibung	Verdünnung	Fixierung	Referenz
Ziege-_- Kaninchen-HRP	polyklonaler Ziegen- Antikörper	1/10000		<i>Dianova</i>
Ziege-_-Ratte-HRP	polyklonaler Ziegen- Antikörper	1/10000		<i>Dianova</i>

Tabelle 10: Verwendete Antikörper

Alle Antikörper, die unter dem Doppelstrich aufgelistet sind, sind zweit Antikörper.

4.4.2 Fixierungsmethoden von Embryonen für Antikörperfärbung

Für die verschiedenen verwendeten Antikörper mussten die Embryonen auf verschiedene Weise fixiert werden, da manche Antikörper zum Beispiel bei Formaldehyd-Fixierung nicht mehr färben. Zusätzlich können verschiedenen Fixierungsmethoden verschiedene Strukturen besser erhalten, bei einer Stong Fixierung zum Beispiel werden die Mikrotubuli erhalten, wobei nach dieser Fixierung nur die äußerste Zellschicht der Embryonen von den Antikörpern durchdrungen werden kann.

4.4.2.1 4% oder 8% Formaldehyd Fixierung

- Embryonen dechorionisieren (ca. 4 min in Natriumhypochlorid), anschließend gut mit H₂O waschen
- Embryonen in syntilisations Röhren mit 4ml Fixierlösung überführen und 20min am Über-Kopf-Rotor fixieren
- Embryonen devitellinisieren: wässriges Fixativ (untere Phase) abziehen, 500µl Methanol zugeben und 30sec kräftig schütteln, Embryonen absinken lassen und Überstand abziehen, 3x mit Methanol waschen
- Embryonen in Methanol bei -20°C lagern

4.4.2.2 *Hitze Fixierung*

- 2ml Triton-Salz Lösung in scintillations Röhrchen im Wasserbad aufkochen
- Embryonen dechorionisieren (siehe oben) und anschließend gut mit H₂O waschen
- Embryonen in die heiße Triton-Salz Lösung überführen und 15sec kräftig schütteln
- schnell 10-15ml eiskalte Triton-Salz Lösung zu den Embryonen geben und Röhrchen auf Eis auskühlen lassen
- Lösung vorsichtig abschütten
- Embryonen mit 1:1 Heptan: Methanol devitellinieren (siehe oben)
- 3x mit Methanol waschen und in Methanol bei -20°C lagern

4.4.2.3 *Strong Fixierung*

- Embryonen dechorionisieren (siehe oben) mit PBS waschen
- höchstens 1min in Heptan-PBS Interphase inkubieren lassen
- 4min in 4ml 37% Formaldehyd: Heptan 1:1 Mischung schütteln
- nach Fixierung Formaldehyd (untere Phase) entfernen, 80% Ethanol zufügen (1:1 mit Heptan) und kräftig schütteln bis Embryonen sinken
- 2x mit 80% Ethanol waschen
- je 5 min in 70%, 50%, 30% Ethanol waschen
- 3x mit PBS waschen
- Embryonen in PBS bei 4°C lagern

4.4.2.4 *Steffanini Fixierung*

- Embryonen dechorionisieren (ca. 4 min in Natriumhypochlorid), anschließend gut mit H₂O waschen

- Embryonen in syntonisations Röhren mit 4ml Steffanini Lösung überführen und 20min am Über-Kopf-Rotor fixieren
- Embryonen devitellinisieren: wässriges Fixativ (untere Phase) abziehen, 500µl Methanol zugeben und 30sec kräftig schütteln, Embryonen absinken lassen und Überstand abziehen, 3x mit Methanol waschen
- Embryonen in Methanol bei -20°C lagern

4.4.2 Antikörperfärbung an Embryonen

- Embryonen 1x mit Methanol waschen (nur, wenn die Embryonen in Methanol gelagert wurden)
- 3x 15min mit PBT waschen
- Embryonen 1h in 1xPBT + 5% NHS (Pferdeserum) 'blocken'
- Inkubation der Embryonen mit dem ersten Antikörper (in 1xPBT + 5% NHS) ü.N. bei 4°C
- ersten Antikörper abziehen (mehrfach wieder verwendbar) und durch 1xPBT ersetzen
- 4 x 15min in 1xPBT waschen
- Inkubation der Embryonen mit dem zweiten Antikörper (in 1xPBT + 5% NHS) für 2h bei RT, anschließend zweiten Antikörper abziehen und durch 1xPBT ersetzen
- 4 x 15min in 1xPBT auf dem Taumler waschen
- Embryonen in Moviol eindeckeln

4.4.3 Antikörperfärbungen an Schneiderzellen (S2 Zellen)

Als Ausgangspunkt können entweder transiente oder stabile S2 Zelllinien verwendet werden (siehe Kapitel 4.2.4).

- Chamber-Slides mit Polylysin beschichten (Polylysin 1:10 mit Wasser verdünnen, 0,5ml in jede Kammer geben, 1h stehen lassen, Lösung abziehen und trocknen lassen).

- 0,5ml frisches Medium in jede Kammer füllen
- 2-3 Tropfen S2 Zellen (in der exponentiellen Phase) dazu geben
- Chamber-Slide über Nacht bei 25°C inkubieren lassen
- Medium abziehen
- Zellen mit 1x PBS waschen und 15min stehen lassen
- 0,5ml Fixierlösung (4% FA in PBS) in jede Kammer geben und 15min inkubieren
- Fixierlösung abnehmen und mit 1x PBT waschen (15min stehen lassen)
- 1. Antikörper in PBT/5% NHS ansetzen (insg. 300µl pro Kammer) und über Nacht bei 4°C in feuchter Kammer stehen lassen
- Zellen mit 1x PBT waschen, 15min inkubieren
- 2. Antikörper in PBT/5% NHS 1h inkubieren (evtl. In Alufolie)
- 3x mit PBT waschen (je 15min)
- Chamber Slid's abziehen (mit der Gummidichtung)
- Auf jedes Feld einen Tropfen Mowiol geben und eindeckeln

4.4.4 *in situ*-Hybridisierung an Embryonen

Erkenntnisse über die räumliche und zeitliche Verteilung von Transkripten in Geweben lassen sich durch deren Detektion mithilfe von DNA- bzw. RNA-Sonden gewinnen. Bei der Herstellung der Sonden wird Digoxigenin-markiertes dUTP (DIG-dUTP) eingebaut und nach erfolgter Hybridisierung mit einem gegen das Digoxigenin gerichteten Antikörper *in situ*-nachgewiesen (Tautz und Pfeifle, 1989). Ein Hauptvorteil von RNA-Sonden gegenüber DNA-Sonden ist ihre höhere Sensitivität. Außerdem erlauben sie beim zu untersuchenden Transkript eine Unterscheidung von Sense- und Antisense-Strang. Aufgrund der allgegenwärtigen RNasen erfordern RNA-Sonden allerdings besondere Sorgfalt und sind anfälliger für unspezifische Hintergrundfärbungen.

Embryonen für die *in situ*-Hybridisierung (DNA- und RNA-Sonden) wurden wie bereits beschrieben dechorionisiert, in einem Gemisch aus 425µl 1xPBS, 75µl 37% Formaldehyd und 500µl Heptan für 15min am Über-Kopf-Rotor fixiert und mit Methanol devitellinisiert. Die Lagerung von Embryonen für *in situ* Hybridisierungen erfolgt allerdings anders als im Falle von Antikörperfärbungen nicht in Methanol,

sondern in 100% Ethanol bei -20°C. Für die bei Verwendung von DNA- bzw. RNA-Sonden identische Färbereaktion mit alkalischer Phosphatase ('AP') wurden 4.5µl NBT und 3.5µl BCIP in 1ml NBT-Puffer gemischt und mit den Embryonen im Dunkeln inkubiert. Die Färbung wurde unter dem Binokular verfolgt und bei Bedarf durch mehrfaches Waschen mit 1xPBT abgestoppt. Nach Entwässern der Embryonen in einer aufsteigenden Ethanolreihe (je 5min in 30%, 50%, 70%, 90%, 95% Ethanol, dann 2 x 10min in 100% Ethanol) erfolgte das Einbetten in Kanadabalsam.

4.4.4.1 RNA/RNA *in situ*-Hybridisierung

DIG-markierte RNA-Sonden wurden durch *in vitro*-Transkription mithilfe des DIG RNA Labeling Mix von *Boehringer/Roche Diagnostics*, Mannheim, nach Angaben des Herstellers gewonnen. Qualität und Quantität der RNA-Sonden wurden durch denaturierende Gelelektrophorese ermittelt.

- Embryonen in einem 1:1 Gemisch aus Xylol und Ethanol für 30min inkubieren
- 4 x kurz mit Ethanol, 2 x kurz mit Methanol, 3 x kurz mit 1xPBT waschen
- 25min in 1xPBS + 5% Formaldehyd fixieren
- 4 x kurz mit 1xPBT waschen
- 8min in 1xPBT + 4µg/ml Proteinase K inkubieren
- 4 x kurz mit 1xPBT waschen
- 25min in 1xPBS + 5% Formaldehyd nachfixieren
- 5 x kurz mit 1xPBT waschen
- kurz in einem 1:1 Gemisch aus 1xPBT und Hybridisierlösung inkubieren
- 2 x kurz mit Hybridisierlösung waschen
- mindestens 1h in Hybridisierlösung bei 55°C vorhybridisieren
- Überstand abziehen und 100µl Hybridisierlösung + 1-2µl RNA-Sonde (5min in Hybridisierlösung auf 65°C erwärmt und auf Eis abgekühlt) zugeben
- ü.N. bei 55°C hybridisieren
- 4x über 90min in Hybridisierlösung bei 55°C waschen
- kurz in einem 1:1 Gemisch aus 1xPBT und Hybridisierlösung waschen
- 4 x über 1h mit 1xPBT waschen

- 1h mit präadsorbiertem α -DIG-Antikörper (1:2000, verdünnt in 1xPBT) inkubieren
- 4 x 15min mit 1xPBT waschen
- 3 x 5min mit NBT-Puffer waschen
- Färbereaktion durchführen, Embryonen entwässern und Dauerpräparat anfertigen

4.4.5 Präparation embryonaler Kutikula

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

4.5 Proteinbiochemische Methoden

4.5.1 Herstellung eines GST-Fusionsproteins

Die komplette cDNA eines beliebigen Genes (z. B. bazooka) oder nur Teile davon (z.B. der N-Terminus) wurden *in frame* an das 3'-Ende der Glutathion-S-Transferase (GST) in den pGEX-4T-1, 2 oder 3-Vektor kloniert.

Das pGEX- Konstrukt sowie der pGEX-Vektor alleine wurden separat in elektrokompente XL1-blue Bakterienzellen transformiert und in diesen durch Zugabe von IPTG jeweils die Expression des GST-Fusionproteins (z.B. GST-N-Terminus) bzw. des GST-Proteins induziert. Nach Aufarbeitung, SDS-PAGE-Gelelektrophorese und Coomassie blue-Färbung konnte dann durch Vergleich mit der GST-Kontrolle (es sollte nur das 29kDa große GST-Protein entstehen) die

Bildung des GST-Fusionsproteins (z.B. GST-N-Terminus; ca. 75kDa) nachgewiesen werden. Größere Mengen des Fusionsproteins wurden dann folgendermaßen aus einem positiven pGEX -Klon isoliert:

- Animpfen einer LB_{amp}-Vorkultur mit einem einzelnen pGEX-Klon und ü.N.- Inkubation bei 37°C im Schüttler
- 400ml vorgewärmtes LB_{amp} mit 10ml der Vorkultur animpfen und Kultur bei 37°C im Schüttler bis zu einer OD = 1 wachsen lassen
- Bakterien durch Zugabe von 400µl 1M IPTG (= 1mM) induzieren und weitere 4h wachsen lassen
- 15min bei 10000rpm zentrifugieren, um Bakterien zu pelletieren
- Überstand verwerfen, Pellet kann bis zur Aufarbeitung bei -20°C gelagert werden
- Pellet in 10ml kaltem 1xPBS vollständig resuspendieren
- 3 x 40sec auf Eis sonifizieren (Kontrollprobe nehmen!)
- schrittweise 500µl 20% Triton X-100 (= 1%) zugeben
- 30min bei Raumtemperatur auf dem Taumler inkubieren
- 15min bei 10000rpm, 4°C, zentrifugieren (Kontrollprobe vom Pellet nehmen!)
- Überstand in frische Gefäß überführen
- 100µl des Überstandes in ein Gefäß überführen und 50µl Glutathion Sepharose 4B zugeben, den Rest des Überstandes einfrieren
- 60min bei Raumtemperatur auf dem Taumler inkubieren
- 15min bei 10000rpm, 4°C, zentrifugieren (Kontrollprobe vom Überstand nehmen!)
- Glutathione Sepharose 4B dreimal mit je 500µl 1xPBS waschen (zwischen durch jeweils 2min bei 13000rpm zentrifugieren und Überstand abziehen)
- Glutathione Sepharose 4B mit 50µl 2xSDS Probenbuffer aufkochen, auf Eis abkühlen lassen und kurz zentrifugieren

Jeweils 15µl des finalen Überstandes und aller Kontrollproben wurden mit 10µl 2xSDS Probenpuffer für 5min aufgekocht und anschließend durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie blue-Färbung

analysiert. Dass auch das richtige Protein isoliert worden war, konnte mithilfe eines Western-blots ermittelt werden. Als Primärantikörper wurde ein polyklonales Ratten-a-Bazooka-Antiserum (1:4000) verwendet. Es konnte eine Bande von ca. 75kDa detektiert werden, was der erwarteten Größe entspricht.

4.5.2 Herstellung von Embryonenextrakten

- Embryonen von 4-5 ü.N.-Ablagen sammeln, dechorionisieren und waschen
- je ca. 100µl Embryonen mit 500 µl Lysis-Puffer versetzen
- auf Eis homogenisieren (Bio-Votexer, *Biospec Products*, Bartlesville, USA)
- 30min auf Eis inkubieren
- 10min bei 13000rpm, 4°C, zentrifugieren
- Überstand in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführen
- 10min bei 13000rpm, 4°C, zentrifugieren
- Überstand erneut in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführen
- Proteinbestimmung wie folgt durchführen: 800µl H₂O + 200µl RotiQuant (*Roth*, Karlsruhe) + 2µl Embryonenlysat mischen und OD₅₉₅ bestimmen; OD₅₉₅ = 0,1 entspricht ca. 1mg/ml Gesamtprotein
- Embryonenlysat bei -70°C lagern

4.5.3 SDS-PAGE-Gelelektrophorese und Western-blotting

Für SDS-PAGE-Gelelektrophorese und Western-blotting wurde ein kombiniertes Gelelektrophorese-/Nassblotgerät der Firma *Biorad*, München ('Mini Trans-blot'), gemäß den Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Proteine wurden in Polyacrylamidgelen, die je nach Größe der aufzutrennenden Proteine 7,5%-12% Acrylamid enthielten, aufgetrennt, im Western-blot auf Nitrozellulosemembranen (*Schleicher und Schüll*, Dassel) übertragen und der Transfer durch eine Ponceau S-Färbung überprüft. Bei der Proteindetektion wurde weiterhin wie folgt vorgegangen:

- Nitrozellulosemembran für 1h in Blockierlösung inkubieren

- Inkubation mit dem entsprechend verdünnten ersten Antikörper in Blockierlösung (möglichst kleines Volumen, 3-5ml) ü.N. bei 4°C auf dem Taumler
- 4 x 15min in 1xTBST waschen
- Inkubation mit dem entsprechend verdünnten zweiten Antikörper (POD-gekoppelt; POD = HRP = Meerrettich-Peroxidase) in Blockierlösung für 2h bei RT auf dem Taumler
- 4 x 15min in 1xTBST waschen
- Detektion mit dem Chemilumineszenz-Substrat (BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD), *Boehringer/Roche Diagnostics*, Mannheim) nach Herstellerangaben

4.5.4 *in vitro*-Transkriptions-/Translationsreaktion

Die *in vitro*-Transkriptions-/Translationsreaktion erfolgte nach Herstellerangaben mithilfe des 'TNT Coupled Reticulocyte Lysate Systems' und des 'Transcend Non-Radioactive Translation Detection Systems' der Firma *Promega*, Madison, USA. Ein Retikulozyten-Lysat aus Kaninchen stellt dabei alle für die Transkription und Translation notwendigen Komponenten bereit. Durch Zugabe einer biotinylierten Lysin-tRNA in den Reaktionsansatz wird das so markierte Lysin in das gewünschte Protein mit eingebaut und kann mittels eines Streptavidin-POD-Konjugates und anschließender Chemilumineszenz nachgewiesen werden. Parallel zum eigentlichen Versuch wurde das Verfahren in einer Kontrollreaktion mit der mitgelieferten Luciferase-DNA durchgeführt.

Die Reaktionsansätze sahen folgendermaßen aus:

<u>Eigener Versuch</u>		<u>Luciferase-Kontrolle</u>	
25 μ l	Rabbit Reticulocyte Lysate	25 μ l	Rabbit Reticulocyte Lysate
2 μ l	TNT Reaction buffer	2 μ l	TNT Reaction buffer
1 μ l	T3- bzw. T7-RNA-Polymerase	1 μ l	T3- bzw. T7-RNA-Polymerase
1 μ l	AA-mixture (2 minus AA mixtures mixed)	1 μ l	AA-mixture (-Leu)
1 μ l	AA-mixture (-Met)	1 μ l	AA-mixture (-Met)
1 μ l	RNase Inhibitor (40U/ μ l)	1 μ l	RNase Inhibitor (40U/ μ l)
1 μ l	template DNA (1 μ g)	2 μ l	Luciferase
1 μ l	transcend tRNA	1 μ l	transcend tRNA
18 μ l	H ₂ O	16 μ l	H ₂ O

Die Inkubation erfolgte für 2h bei 30°C. Anschliessend wurden je 2µl der Reaktionsansätze wie unter 4.5.3 beschrieben durch SDS-PAGE-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und das synthetisierte, mit biotinyliertem Lysin markierte Protein mithilfe des Streptavidin-POD-Konjugates (1:2000, *Boehringer/Roche Diagnostics*, Mannheim) und Chemilumineszenz detektiert.

4.5.5 GST-Pulldown

- 200µl des Überstandes, der während der Herstellung eines GST-Fusionsproteins gemacht wurden, werden mit 100µl Glutathione Sepharose 4B gekoppelt (siehe oben).
- 1min bei 13000rpm, 4°C, zentrifugieren
- Glutathione Sepharose 4B dreimal mit je 500µl 1xPBS waschen (zwischendurch jeweils 1min bei 13000rpm zentrifugieren und Überstand abziehen)
- 15µl *In vitro* transkribiertes/ translatiertes Protein zugeben und auf 500µl Volumen mit GST Pulldown-Puffer auffüllen
- ü.N. auf 4°C im Überkopftaumler inkubieren
- Glutathione Sepharose 4B dreimal mit je 500µl GST-Pulldown Puffer waschen (zwischendurch jeweils 1min bei 13000rpm zentrifugieren und Überstand abziehen)
- 100µl 2xSDS-Probenpuffer mit der Glutathione Sepharose 4B aufkochen und auf ein SDS-Gel auftragen.

4.5.6 Co-Immunopräzipitation

- 0.5-1mg Gesamtprotein (siehe: Herstellung von Embryonenextrakten) werden mit 20µl Protein-A-Agarose oder Protein-G-Agarose 1h 30min auf 4°C preinkubiert (Taumler)

Die Entscheidung welches der beiden Protein-Agarosen genommen wird, hängt vom Wirtstier ab, in welchem der verwendete Antikörper hergestellt wurde. Protein-A ist kann bei Kaninchen und Meerschweinchen genutzt werden und Protein-G ist eher geeignet für Pferd, Kuh, Schaf und Ziege.

- 1min bei 13000rpm zentrifugieren und mit dem Überstand weitermachen
- Überstand auf 500 μ l mit Lysis-Puffer auffüllen, 10 μ l Antikörper beifügen und ü.N. bei 4°C inkubieren
- 20 μ l Protein-A-Agarose oder Protein-G-Agarose zufügen und weitere 2h auf RT inkubieren
- kurz zentrifugieren und Überstand absaugen
- 3x mit eiskaltem Lysis-Puffer waschen (jeweils 5min auf RT taumeln lassen)
- pelletierte Agarose mit 20 μ l 2x SDS-Probenpuffer 5min aufkochen und auf SDS-Gel auftragen.

5. Zusammenfassung

Um Zelldiversität in einem Organismus zu erzeugen, bedarf es, zusammen mit anderen Mechanismen, der asymmetrischen Zellteilung. Die Stammzellen des zentralen Nervensystems von *Drosophila*, so genannte Neuroblasten, durchlaufen einer Reihe solcher asymmetrischer Teilungen, um jeweils eine Gangliemutterzelle (neuronal Vorläuferzelle) und einen weiteren Neuroblasten zu bilden. Dem evolutionär hoch konservierten PAR/aPKC Komplex konnte eine zentrale Funktion bei der Kontrolle der apiko-basalen Polarität, der asymmetrischen Lokalisierung von Zellschicksalsdeterminanten und bei der korrekten Ausrichtung der mitotischen Spindel in Neuroblasten zugeschrieben werden. Wie der PAR/aPKC Komplex diese Prozesse kontrolliert, ist nicht bekannt. Eines der Mitglieder des PAR/aPKC Komplexes in *Drosophila* ist das PDZ-Protein Bazooka. In dieser Arbeit wurde mit Hilfe eines Hefe-2-Hybrid Screens nach neuen Bindungspartnern des Bazooka N-Terminus gesucht, um die Funktionsweise des PAR/aPKC Komplexes besser zu verstehen. Es konnten 34 neue Interaktionspartner des Bazooka N-Terminus isoliert werden. 11 Gene wurden auf Grund ihres Expressionsmusters aus den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Aus den restlichen Kandidaten wurden 6 ausgewählt, da deren vorhergesagte Proteinstruktur eine Funktion bei der asymmetrischen Zellteilung der Neuroblasten vermuten lässt. Darunter CG7739, ein Protein mit einer vorhergesagten Transmembrandomäne und einem hoch konservierten intrazellulären C-Terminus, der alleine ausreicht, um Bazooka zu binden. CG7739 und Bazooka colokalisieren in Interphase Neuroblasten am apikalen Cortex. CG7739 relokalisiert an die mitotische Spindel, sobald diese in der Metaphase aufgebaut wird. Interessanterweise kann eine stärkere Assoziation des Proteins mit dem apikalen Spindelarm beobachtet werden, was eine Funktion von CG7739 in der Spindelausrichtung vermuten lässt. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die genaue Funktion von CG7739 in der asymmetrischen Zellteilung der Neuroblasten zu beschreiben. Dazu müssten unter anderem Mutanten von CG7739 hergestellt und analysiert werden.

6. Referenzen

- Alberts, B. J., Alexander; Lewis, Julian; and Raff, M. R., Keith; Walter, Peter.** (2002). *Molecular Biology of the Cell*: Garland Publishing.
- Artero, R., Furlong, E. E., Beckett, K., Scott, M. P. and Baylies, M.** (2003). Notch and Ras signaling pathway effector genes expressed in fusion competent and founder cells during *Drosophila* myogenesis. *Development* **130**, 6257-72.
- Bachmann, A., Schneider, M., Theilenberg, E., Grawe, F. and Knust, E.** (2001). *Drosophila* Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity. *Nature* **414**, 638-43.
- Bennett, D. and Alphey, L.** (2004). Cloning and expression of mars, a novel member of the guanylate kinase associated protein family in *Drosophila*. *Gene Expr Patterns* **4**, 529-35.
- Benton, R. and St Johnston, D.** (2003). A conserved oligomerization domain in *drosophila* Bazooka/PAR-3 is important for apical localization and epithelial polarity. *Curr Biol* **13**, 1330-4.
- Boyd, L., Guo, S., Levitan, D., Stinchcomb, D. T. and Kempfues, K. J.** (1996). PAR-2 is asymmetrically distributed and promotes association of P granules and PAR-1 with the cortex in *C. elegans* embryos. *Development* **122**, 3075-84.
- Broadus, J. and Doe, C. Q.** (1997). Extrinsic cues, intrinsic cues and microfilaments regulate asymmetric protein localization in *Drosophila* neuroblasts. *Curr Biol* **7**, 827-35.
- Cai, Y., Yu, F., Lin, S., Chia, W. and Yang, X.** (2003). Apical complex genes control mitotic spindle geometry and relative size of daughter cells in *Drosophila* neuroblast and pI asymmetric divisions. *Cell* **112**, 51-62.
- Campos-Ortega, J. A. H., V.** (1997). *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster*: Springer Verlag.
- Cheng, N. N., Kirby, C. M. and Kempfues, K. J.** (1995). Control of cleavage spindle orientation in *Caenorhabditis elegans*: the role of the genes par-2 and par-3. *Genetics* **139**, 549-59.
- Deng, W. M., Schneider, M., Frock, R., Castillejo-Lopez, C., Gaman, E. A., Baumgartner, S. and Ruohola-Baker, H.** (2003). Dystroglycan is required for polarizing the epithelial cells and the oocyte in *Drosophila*. *Development* **130**, 173-84.
- Ebnet, K., Suzuki, A., Horikoshi, Y., Hirose, T., Meyer Zu Brickwedde, M. K., Ohno, S. and Vestweber, D.** (2001). The cell polarity protein ASIP/PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM). *Embo J* **20**, 3738-48.

- Etemad-Moghadam, B., Guo, S. and Kemphues, K. J.** (1995). Asymmetrically distributed PAR-3 protein contributes to cell polarity and spindle alignment in early *C. elegans* embryos. *Cell* **83**, 743-52.
- Fiscella, M., Perry, J. W., Teng, B., Bloom, M., Zhang, C., Leung, K., Pukac, L., Florence, K., Concepcion, A., Liu, B. et al.** (2003). TIP, a T-cell factor identified using high-throughput screening increases survival in a graft-versus-host disease model. *Nat Biotechnol* **21**, 302-7.
- Gallet, A., Angelats, C., Erkner, A., Charroux, B., Fasano, L. and Kerridge, S.** (1999). The C-terminal domain of armadillo binds to hypophosphorylated teashirt to modulate wingless signalling in *Drosophila*. *Embo J* **18**, 2208-17.
- Gao, L., Joberty, G. and Macara, I. G.** (2002). Assembly of epithelial tight junctions is negatively regulated by Par6. *Curr Biol* **12**, 221-5.
- Grawe, F., Wodarz, A., Lee, B., Knust, E. and Skaer, H.** (1996). The *Drosophila* genes crumbs and stardust are involved in the biogenesis of adherens junctions. *Development* **122**, 951-9.
- Grosshans, J., Muller, H. A. and Wieschaus, E.** (2003). Control of cleavage cycles in *Drosophila* embryos by fruhstart. *Dev Cell* **5**, 285-94.
- Guo, S. and Kemphues, K. J.** (1995). par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* **81**, 611-20.
- Hill, D. P. and Strome, S.** (1990). Brief cytochalasin-induced disruption of microfilaments during a critical interval in 1-cell *C. elegans* embryos alters the partitioning of developmental instructions to the 2-cell embryo. *Development* **108**, 159-72.
- Hirose, T., Izumi, Y., Nagashima, Y., Tamai-Nagai, Y., Kurihara, H., Sakai, T., Suzuki, Y., Yamanaka, T., Suzuki, A., Mizuno, K. et al.** (2002). Involvement of ASIP/PAR-3 in the promotion of epithelial tight junction formation. *J Cell Sci* **115**, 2485-95.
- Hong, Y., Stronach, B., Perrimon, N., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (2001). *Drosophila* Stardust interacts with Crumbs to control polarity of epithelia but not neuroblasts. *Nature* **414**, 634-8.
- Huang, A. M. and Rubin, G. M.** (2000). A misexpression screen identifies genes that can modulate RAS1 pathway signaling in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **156**, 1219-30.
- Hulskamp, M., Pfeifle, C. and Tautz, D.** (1990). A morphogenetic gradient of hunchback protein organizes the expression of the gap genes Kruppel and knirps in the early *Drosophila* embryo. *Nature* **346**, 577-80.
- Hung, T. J. and Kemphues, K. J.** (1999). PAR-6 is a conserved PDZ domain-containing protein that colocalizes with PAR-3 in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development* **126**, 127-35.

- Izumi, Y., Hirose, T., Tamai, Y., Hirai, S., Nagashima, Y., Fujimoto, T., Tabuse, Y., Kempfues, K. J. and Ohno, S.** (1998). An atypical PKC directly associates and colocalizes at the epithelial tight junction with ASIP, a mammalian homologue of *Caenorhabditis elegans* polarity protein PAR-3. *J Cell Biol* **143**, 95-106.
- Janssens, V. and Goris, J.** (2001). Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J* **353**, 417-39.
- Joberty, G., Petersen, C., Gao, L. and Macara, I. G.** (2000). The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat Cell Biol* **2**, 531-9.
- Johansson, A., Driessens, M. and Aspenstrom, P.** (2000). The mammalian homologue of the *Caenorhabditis elegans* polarity protein PAR-6 is a binding partner for the Rho GTPases Cdc42 and Rac1. *J Cell Sci* **113 (Pt 18)**, 3267-75.
- Johnson, K. and Wodarz, A.** (2003). A genetic hierarchy controlling cell polarity. *Nat Cell Biol* **5**, 12-4.
- Kempfues, K. J., Priess, J. R., Morton, D. G. and Cheng, N. S.** (1988). Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell* **52**, 311-20.
- Kidd, D. and Raff, J. W.** (1997). LK6, a short lived protein kinase in *Drosophila* that can associate with microtubules and centrosomes. *J Cell Sci* **110 (Pt 2)**, 209-19.
- Kim, E., Naisbitt, S., Hsueh, Y. P., Rao, A., Rothschild, A., Craig, A. M. and Sheng, M.** (1997). GKAP, a novel synaptic protein that interacts with the guanylate kinase-like domain of the PSD-95/SAP90 family of channel clustering molecules. *J Cell Biol* **136**, 669-78.
- Knoblich, J. A., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1997). The N terminus of the *Drosophila* Numb protein directs membrane association and actin-dependent asymmetric localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13005-10.
- Knust, E., Tepass, U. and Wodarz, A.** (1993). crumbs and stardust, two genes of *Drosophila* required for the development of epithelial cell polarity. *Dev Suppl*, 261-8.
- Kraut, R. and Campos-Ortega, J. A.** (1996). inscuteable, a neural precursor gene of *Drosophila*, encodes a candidate for a cytoskeleton adaptor protein. *Dev Biol* **174**, 65-81.
- Kraut, R., Chia, W., Jan, L. Y., Jan, Y. N. and Knoblich, J. A.** (1996). Role of inscuteable in orienting asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Nature* **383**, 50-5.
- Kuchinke, U., Grawe, F. and Knust, E.** (1998). Control of spindle orientation in *Drosophila* by the Par-3-related PDZ-domain protein Bazooka. *Curr Biol* **8**, 1357-65.
- Letunic, I., Copley, R. R., Schmidt, S., Ciccarelli, F. D., Doerks, T., Schultz, J., Ponting, C. P. and Bork, P.** (2004). SMART 4.0: towards genomic data integration. *Nucleic Acids Res* **32 Database issue**, D142-4.

- Lin, D., Edwards, A. S., Fawcett, J. P., Mbamalu, G., Scott, J. D. and Pawson, T. (2000).** A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat Cell Biol* **2**, 540-7.
- Ma, Y., Zhang, S., Xia, Q., Zhang, G., Huang, X., Huang, M., Xiao, C., Pan, A., Sun, Y., Lebo, R. et al. (2002).** Molecular characterization of the TCP11 gene which is the human homologue of the mouse gene encoding the receptor of fertilization promoting peptide. *Mol Hum Reprod* **8**, 24-31.
- Manabe, N., Hirai, S., Imai, F., Nakanishi, H., Takai, Y. and Ohno, S. (2002).** Association of ASIP/mPAR-3 with adherens junctions of mouse neuroepithelial cells. *Dev Dyn* **225**, 61-9.
- Mayer-Jaekel, R. E., Baumgartner, S., Bilbe, G., Ohkura, H., Glover, D. M. and Hemmings, B. A. (1992).** Molecular cloning and developmental expression of the catalytic and 65-kDa regulatory subunits of protein phosphatase 2A in Drosophila. *Mol Biol Cell* **3**, 287-98.
- Mishima, A., Suzuki, A., Enaka, M., Hirose, T., Mizuno, K., Ohnishi, T., Mohri, H., Ishigatsubo, Y. and Ohno, S. (2002).** Over-expression of PAR-3 suppresses contact-mediated inhibition of cell migration in MDCK cells. *Genes Cells* **7**, 581-96.
- Muller, H. A. and Wieschaus, E. (1996).** armadillo, bazooka, and stardust are critical for early stages in formation of the zonula adherens and maintenance of the polarized blastoderm epithelium in Drosophila. *J Cell Biol* **134**, 149-63.
- Nagai-Tamai, Y., Mizuno, K., Hirose, T., Suzuki, A. and Ohno, S. (2002).** Regulated protein-protein interaction between aPKC and PAR-3 plays an essential role in the polarization of epithelial cells. *Genes Cells* **7**, 1161-71.
- Nance, J. and Priess, J. R. (2002).** Cell polarity and gastrulation in *C. elegans*. *Development* **129**, 387-97.
- Nowak, S. J., Pai, C. Y. and Corces, V. G. (2003).** Protein phosphatase 2A activity affects histone H3 phosphorylation and transcription in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* **23**, 6129-38.
- Nunbhakdi-Craig, V., Machleidt, T., Ogris, E., Bellotto, D., White, C. L., 3rd and Sontag, E. (2002).** Protein phosphatase 2A associates with and regulates atypical PKC and the epithelial tight junction complex. *J Cell Biol* **158**, 967-78.
- Oak, S. A., Zhou, Y. W. and Jarrett, H. W. (2003).** Skeletal muscle signaling pathway through the dystrophin glycoprotein complex and Rac1. *J Biol Chem* **278**, 39287-95.
- Petritsch, C., Tavosanis, G., Turck, C. W., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (2003).** The *Drosophila* myosin VI Jaguar is required for basal protein targeting and correct spindle orientation in mitotic neuroblasts. *Dev Cell* **4**, 273-81.

- Petronczki, M. and Knoblich, J. A.** (2001). DmPAR-6 directs epithelial polarity and asymmetric cell division of neuroblasts in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* **3**, 43-9.
- Pichler, S., Gonczy, P., Schnabel, H., Pozniakowski, A., Ashford, A., Schnabel, R. and Hyman, A. A.** (2000). OOC-3, a novel putative transmembrane protein required for establishment of cortical domains and spindle orientation in the P(1) blastomere of *C. elegans* embryos. *Development* **127**, 2063-73.
- Preston, C. R. and Engels, W. R.** (1996). P-element-induced male recombination and gene conversion in *Drosophila*. *Genetics* **144**, 1611-22.
- Preston, C. R., Sved, J. A. and Engels, W. R.** (1996). Flanking duplications and deletions associated with P-induced male recombination in *Drosophila*. *Genetics* **144**, 1623-38.
- Qiu, R. G., Abo, A. and Steven Martin, G.** (2000). A human homolog of the *C. elegans* polarity determinant Par-6 links Rac and Cdc42 to PKCzeta signaling and cell transformation. *Curr Biol* **10**, 697-707.
- Rappleye, C. A., Tagawa, A., Lyczak, R., Bowerman, B. and Aroian, R. V.** (2002). The anaphase-promoting complex and separin are required for embryonic anterior-posterior axis formation. *Dev Cell* **2**, 195-206.
- Rolls, M. M., Albertson, R., Shih, H. P., Lee, C. Y. and Doe, C. Q.** (2003). *Drosophila* aPKC regulates cell polarity and cell proliferation in neuroblasts and epithelia. *J Cell Biol* **163**, 1089-98.
- Ruhf, M. L., Braun, A., Papoulas, O., Tamkun, J. W., Randsholt, N. and Meister, M.** (2001). The domino gene of *Drosophila* encodes novel members of the SWI2/SNF2 family of DNA-dependent ATPases, which contribute to the silencing of homeotic genes. *Development* **128**, 1429-41.
- Russo, V. E. A. B., S Cove, D Ottolenghi, S.** (1992). *Development: The Molecular Genetic Approach*: Springer Verlag.
- Schaefer, M., Shevchenko, A. and Knoblich, J. A.** (2000). A protein complex containing Inscuteable and the Galpha-binding protein Pins orients asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Curr Biol* **10**, 353-62.
- Schober, M., Schaefer, M. and Knoblich, J. A.** (1999). Bazooka recruits Inscuteable to orient asymmetric cell divisions in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* **402**, 548-51.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. and Ponting, C. P.** (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5857-64.
- Shen, C. P., Knoblich, J. A., Chan, Y. M., Jiang, M. M., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1998). Miranda as a multidomain adapter linking apically localized Inscuteable and basally localized Staufien and Prospero during asymmetric cell division in *Drosophila*. *Genes Dev* **12**, 1837-46.
- Shi, S. H., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (2003). Hippocampal neuronal polarity specified by

spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell* **112**, 63-75.

Siderovski, D. P., Diverse-Pierluissi, M. and De Vries, L. (1999). The GoLoco motif: a Galphai/o binding motif and potential guanine-nucleotide exchange factor. *Trends Biochem Sci* **24**, 340-1.

Suzuki, A., Yamanaka, T., Hirose, T., Manabe, N., Mizuno, K., Shimizu, M., Akimoto, K., Izumi, Y., Ohnishi, T. and Ohno, S. (2001). Atypical protein kinase C is involved in the evolutionarily conserved par protein complex and plays a critical role in establishing epithelia-specific junctional structures. *J Cell Biol* **152**, 1183-96.

Tabuse, Y., Izumi, Y., Piano, F., Kempfues, K. J., Miwa, J. and Ohno, S. (1998). Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **125**, 3607-14.

Tepass, U. and Knust, E. (1993). Crumbs and stardust act in a genetic pathway that controls the organization of epithelia in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **159**, 311-26.

Townsley, F. M., Cliffe, A. and Bienz, M. (2004). Pygopus and Legless target Armadillo/beta-catenin to the nucleus to enable its transcriptional co-activator function. *Nat Cell Biol* **6**, 626-33.

Tripoulas, N. A., Hersperger, E., La Jeunesse, D. and Shearn, A. (1994). Molecular genetic analysis of the *Drosophila melanogaster* gene absent, small or homeotic discs1 (*ash1*). *Genetics* **137**, 1027-38.

Tsou, A. P., Yang, C. W., Huang, C. Y., Yu, R. C., Lee, Y. C., Chang, C. W., Chen, B. R., Chung, Y. F., Fann, M. J., Chi, C. W. et al. (2003). Identification of a novel cell cycle regulated gene, HURP, overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* **22**, 298-307.

Tsubota, S. and Schedl, P. (1986). Hybrid dysgenesis-induced revertants of insertions at the 5' end of the rudimentary gene in *Drosophila melanogaster*: transposon-induced control mutations. *Genetics* **114**, 165-82.

Watts, J. L., Etemad-Moghadam, B., Guo, S., Boyd, L., Draper, B. W., Mello, C. C., Priess, J. R. and Kempfues, K. J. (1996). *par-6*, a gene involved in the establishment of asymmetry in early *C. elegans* embryos, mediates the asymmetric localization of PAR-3. *Development* **122**, 3133-40.

Watts, J. L., Morton, D. G., Bestman, J. and Kempfues, K. J. (2000). The *C. elegans par-4* gene encodes a putative serine-threonine kinase required for establishing embryonic asymmetry. *Development* **127**, 1467-75.

Wittwer, F., van der Straten, A., Keleman, K., Dickson, B. J. and Hafen, E. (2001). Lilliputian: an AF4/FMR2-related protein that controls cell identity and cell growth. *Development* **128**, 791-800.

Wodarz, A. and Huttner, W. B. (2003). Asymmetric cell division during neurogenesis in *Drosophila* and vertebrates. *Mech Dev* **120**, 1297-309.

Wodarz, A. and Nusse, R. (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 59-88.

Wodarz, A., Ramrath, A., Grimm, A. and Knust, E. (2000). Drosophila atypical protein kinase C associates with Bazooka and controls polarity of epithelia and neuroblasts. *J Cell Biol* **150**, 1361-74.

Wodarz, A., Ramrath, A., Kuchinke, U. and Knust, E. (1999). Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in Drosophila neuroblasts. *Nature* **402**, 544-7.

7. Anhang

Im Anhang werden von allen 34 Interaktionspartnern einerseits die Expressionsmuster oder, falls nicht vorhanden, die Expressionsprofile und andererseits die Sequenzen der isolierten Fragmente aufgezeigt. Es wurde nicht von allen Kandidaten die ganzen Fragmente sequenziert. In den meisten Fällen wurden die Konstrukte nur ansequenziert. Die cDNA Fragmente wurden mit EcoRI (GAATTC) und mit XhoI (CTCGAG) in den pACT2 Vektor kloniert (Abb. 31). Zusätzlich wurde während der Produktion der cDNA ein Linker (in den Sequenzen in rot hervorgehoben) vor jedes cDNA Stück eingesetzt, der einen genügend großen Abstand zwischen der Gal4 Aktivierungsdomäne und dem cDNA Stück garantieren soll.

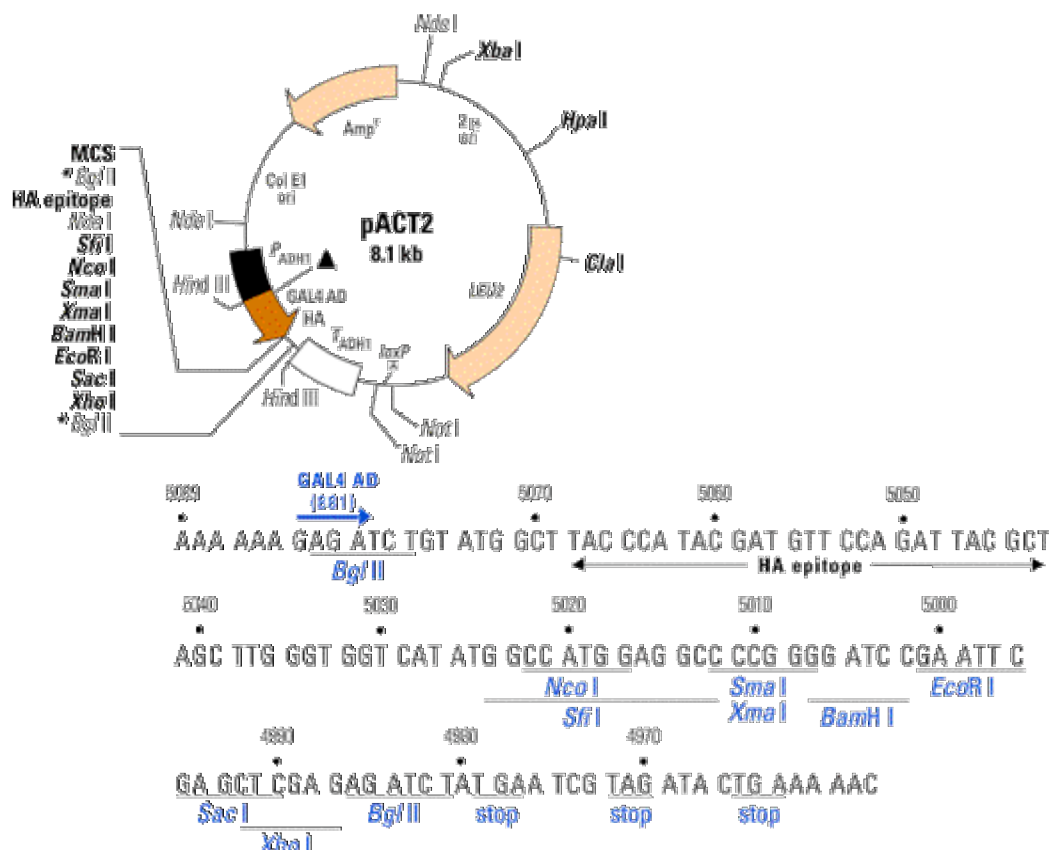


Abb. 31: Schematische Darstellung des pACT2 Vektors

In hellbraun sind die Gene angezeigt, die in den Bakterien (Amp^R) oder in den Hefen (LEU2) zur Selektion dienen. Der dunkelbraune Balken markiert die GAL4AD. Im unteren Teil ist die "multiple cloning site" mit den Restriktionsschnittstellen beschrieben.

(Bild stammt von <http://www.clontech.com>)

Die Interaktionspartner sind nach ihrer Reihenfolgen in den Tabellen 1 und 2 aufgelistet.

7.1 CG17492

7.1.1 Expressionsmuster von CG17492

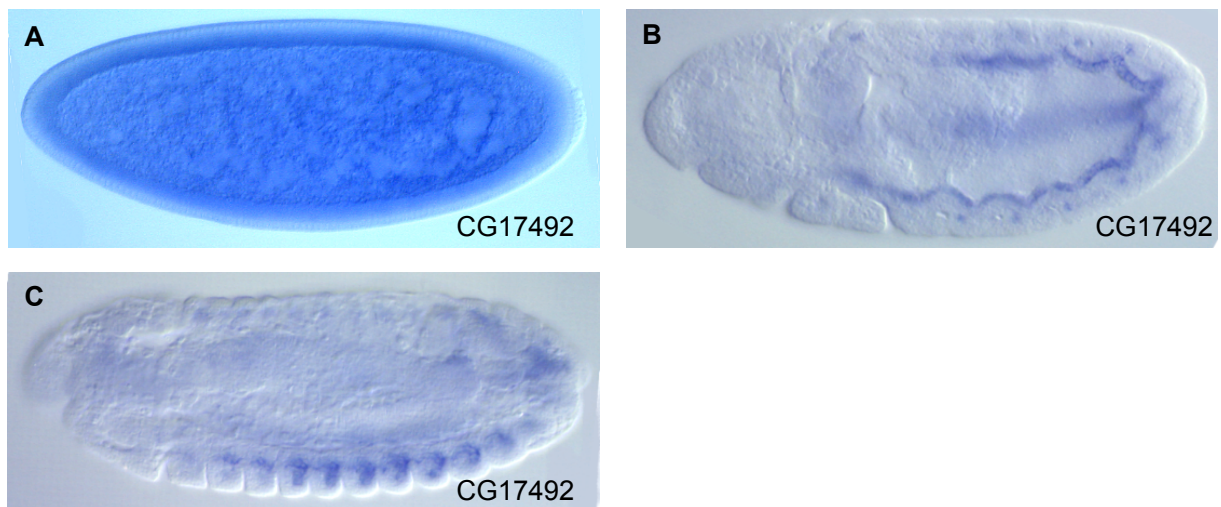


Abb. 32: Das Expressionsmuster des Gens CG17492

In situ Hybridisierung mit antisense RNA des Gens CG17492 (A-C). In frühen Stadien (Stadium 5 (A)) ist CG17492 ubiquitär verteilt. Ab dem Stadium 11 (B) zeigt CG17492 eine spezifische Muskelzellerfärbung, die sich in späteren Stadien (C, Stadium 16) bestätigt.

7.1.2 Sequenz des isolierten Fragmentes von CG17492

```

GAATTCGCGGCCGCGTCGACCCGGGGTAATCGAGCGACTCGTTTCGCCTCT 50
CCTGCGACGTGAATGCCAAGGATGAGGATGGCGACAATGCGATGCACTTG 100
TGCGTCATTAAGAAGTCCAATCTGCAGTCGGCCGCGGAGCCTCAGCCAGA 150
GGAGGCTCCTGAGATTCACAAGTTTTACCTGAGTCTAGTACACTCGAGCA 200
TTCGTCCTGAGGATCGTTTTGATGTACAGTATATTGATCTATCTTTTCGAGG 250
GCCGGCTGCCGAGTGGAGCTGAACAACGCCAATGCAAGCATTTTTGAGTG 300
GATAACGGACCGCCACATCAGGCAACTGATTTTTGGGCAGCAGGGCGAAG 350
CTGAATCGCTGCCTAGGAATCTTCAAGCTTTGGAAGTGTCCGCAGGATCA 400
GCCGACGGTGAGGAGAGCTCTGCGTCTGCTGGAGCTGAATCCAATGGAGC 450
CGGACCTGGAAGCGTTGCAGCACCCCCACCACCGCAGCGCCAGACATTTG 500
AACTAATGCCAAAGCCAAACGATATCCCAGCCATTGGAGTTGGAGCATCT 550
CCATCCACGCCCTCCGCCTCGCCGGGCGTAAAGAACTGAACTCCGACGC 600
AACACCGCAAACGTCTCTCCACAGGTGGCACCGCGCAAGAAGGCGCCCA 650
AGCCTCCGGTTACCACTAGCTCGAGCAGCACCCGCGTTGGAAGCCGGAGCG 700
GCGGGACCCAGTACCAGTCCGGTGATCGTCCCCGGTCCCCATGAGTGCAT 750

```

```

TGTGTGCAATGAGATCCTGCCGATGGTGCCTTTGAGCCGTGTCAGCATC 800
AGATCGCCTGCGAGGAGTGCGGCATCCGAATGAAAAAGTGTCTCCGCTGT 850
GCCGTGGCGATCGAGCGGGCATTGACGGTCAGCGGCCGAGTGGTGGCCCT 900
GCCCACGTCCACGTGTCACCTAGTGACCCCACTCGCCTACCGTCCGGGG 950
ATCTACTTCGCTATCTGGAGAACAAGTGCTGGAGTTTGAGGAGTCGCAC1000
TTCTGCGGTATTTGCATGGAGCGAAAAAGGGATGTGGCCTTCTGTGCGG1050
GCACGGCGCGTGTCTCCATTGTGCCGAAACGCTCCGCACATGCCACATGT1100
GTCGCAAGACAATACTCAAGAAGATCAACCTGTACTGAACGGCGGTAACG1150
GAAACGAAAGAAAAGCAAAGGCGGCAGGATCAGCAGCAATTCAAACAGCA1200
ACCAAAGTGGCTTGTATATATACATACACAAAACAAACACACACTCACAT1250
TGCCGTGTCATGTGCAAATCGAAATTATTATTTATTGATCACAAACGAAA1300
TTTACGAGTTCTTTTTTAATCGGTTTCATCATCGGCATCGTCGCAACACGC1350
AACAAATTAATGTGCACCTTCTCGTGTCTAGTTATTAGCCCCGTTTAACC1400
ATGTCTGGTAACGATAAATACATAGGAACTAACTAAAGCATACAAATAT1450
TTAATAGTCATTTAAATGCAAATATACAAATATAAAATTATTCAAAAAAA1500
AAAAAAAAAACTCGAG 1517

```

Abb. 33: Sequenz des isolierten Fragmentes von CG17492

Das cDNA Fragment von CG17492 wurde durchsequenziert. Es ist ca. 1500 Basenpaare (Bp) lang und beinhaltet die letzten 1110 Bp des Gens CG17492. In rot ist der Linker eingezeichnet und die blauen Buchstaben markieren die XhoI Schnittstelle.

7.2 CG7991

7.2.1 Expressionsprofil des Gens CG7991

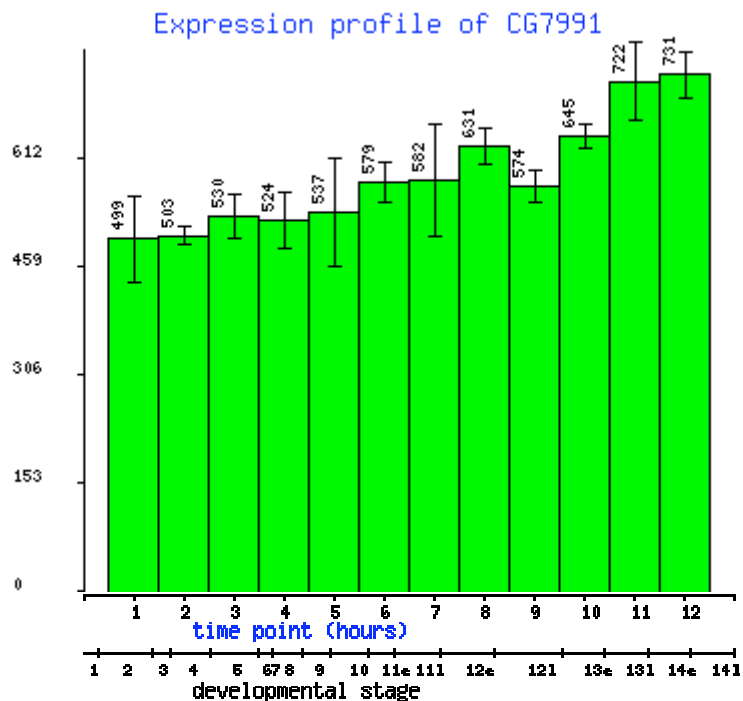


Abb. 34: Expressionsprofil des Gens CG7991

CG7991 ist während der ganzen Entwicklung des Embryos exprimiert, wobei eine stetige Zunahme des Genproduktes zu beobachten ist.

7.2.2 Sequenz des isolierten Fragmentes von CG7991

```

ATGATGAAGATACCCCACCCAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTAC 50
CCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGA 100
GGCCCCGGGGATCCGAATTCGCGGCCGCGTTCGACCTTCTGGCCAGAAAGC 150
GAAACGAGATCCGTAAGAAGCTGGCCTCCCGCCTGCAGCAGGCAAGATCC 200
AGTGCCTCGCAGGCGGGTGAGGCCAGGGGATCGGTACGGGAGCGGAGTC 250
TGTAAGTGCACCTCCTACTCGGAGCCAGTTTGGTGGCTGCCTCGGAGG 300
GCGGCGGAGTGGGGGGCTCGGGCGGAGGAGCAGCTGCCCCCCAGCAGCAG 350
CGGAGACATAGGCATCGCAAGCGTCGGGATCGCAATCGTGTGCAGAGATT 400
TGGCTATGAGATCCACAATGTGGACGAGTTTCTCTCCCGCTGCTCTCTGG 450
CCACTCCCGGCAATATTCCCGTGGTTCTTTCCACGGCCAGCACCCCTATA 500
CAAACGAGACCAGGTGGCTACCAACTGGAGATCCCTCTGCCCCCTGGGCAT 550
GGTGGTGAATGCGGTTTTCAAGAACCAGAACTGGCTGTATGTGCAAACGC 600
CCCACGCGGAGGAGGGCTATGTGGGCTATGCCTGCTGCCTGCCCCCTTGGG 650
ATTCTGCCCCAGCAGGCAAGAGCGGGCTCCAGGAACACCCCTGCTGGGA 700
GTCCAATGCGGATGTCTTCCCCCGCCATGTGGCAACATGACAGACTCGG 750
AGAAGGAGATCCGCCTGCGTGGTGGCACCCGATCCGATGGCGCCCGCACT 800
CCTCGCAGCTCAAGCCACTGAAGATGTCTCAAGATCGGATCCACCACC 850
ATCAACAACAACAACAACCATA 872

```

Abb. 35: Sequenz des isolierten Fragmentes von CG7991

Das cDNA Fragment von CG7991 wurde nur ansequenziert. Es ist ca. 870 Bp lang und startet beim 1158 Bp des Gens CG7991. In rot ist der Linker eingezeichnet.

7.3 CG17064

Das Expressionsmuster von CG17064 wurde publiziert (Bennett and Alpey, 2004). Die Autoren beschrieben eine erhöhte Expression im zentralen Nervensystem und im Kopf.

7.3.1 Sequenzen des isolierten Fragmentes CG17064

CG17064 wurde zwei Mal isoliert. Ein größeres Fragment, von ca. 1600 Bp (Fragment 1) und ein kleineres Fragment von ca. 1000 Bp (Fragment 2). Beide Fragmente beinhalten den C-Terminus des Gens CG17064.

Fragment 1:

```

GAATTCGCGGCCGCGTTCGACCTTTTGGAGGCGTTTGGCGACGCCATCTTG 50
TTGAGCCCGGTGGCACCCGGTCAAAGCTGAAGGAGAAAGTTCGGTCAAAG 100
GCAGTTGCTGCCGGAAGGTAAGAAAGAGGCGTCAGGTCCGGTGGCAAAGA 150

```

AAAAGTTCGACTTTACGCGTTACTCGGTGGCGAATTCGCCGGCGGAGGAC 200
 TCGCTCATCTTGATCCTCAGCAGACGACGGTTAAAGAAGACTGGAGA 250
 TTCCACTTTGGTGCCAGAGGGTACAAAGACACCGCCACGTCGCGAATCCA 300
 ATGGAATGCCCAACTATCTCAGTCCGTTTGTAGTGTCTCGCGGGGAAAG 350
 GTGAACTCGCGCTGTGAGAAGGAGAAACGCAATAGCTTCTACCTGTCCAA 400
 TGAGGAATCGCCCTTGGAAGTTCGCCGTGCCATCGAATCGGTTCTGTACT 450
 TCCGACTGCAGCTGGAAAACGAGATCACGCGCCTCCAAGCGCTTTGCGCT 500
 GAATGGGAGGCGTATAGCAAGGAGAATGAGGCACGGCTGCAGGAAACGGG 550
 CGGCATTGACATGATCAACGTGACCATCGGCCAAACACGTCTGCTGACCA 600
 CCAAAAAGATGATGCAGTTCAGCGGCCTGATCGATCGTTGCGAAGCTGGA 650
 GCGACCGGAAAGAACAGTCAGCCAAACGATGGCAGTGAGGATTCGAAACC 700
 GGTGCAGGCTGAGGATCTGGAGGGCTGGTGGGACATGCTGCGCCTGCAGA 750
 GCGAGAACGTGGACAGCGTTTCGATAACCTGAAACGTTGGAAGGCCAACG 800
 ACTGGCTGGATCCGGATGCCGTGGCCGAGGAACCCAAACAGCCGAAGCCC 850
 AAGCCCAAGATAAGTCGCAACATGAAGATCAAATCGAAGGCCAAGCCGAG 900
 CAGCAATCTGCAGCAGTTCCTCCGCAAAGCCCATGCCAACATGAAGAAGA 950
 CCAAGGTGGAGGAGCCAACGCTGGAGGATGGCCTGCCC GCCACGTCCTCG 1000
 CGCCACAGTTCGCCGCGAGTAATCGTAGTTCGCAACCGCCGATCTTTTTTC 1050
 GCCCCGCCGCACAGTTCCTCCGCATGTCCACCGGCGAGGGGCGTCAGTCGA 1100
 TTGCGCCAAATGCGCTCCTGAAATCAGCAATTCTTGCAGCCGCCGAACAG 1150
 AACGCTGCCAAGACGCCGCCGCTAAGCCGCGCACCTCCATCCTCAAGAC 1200
 GCCCCGGCACCACGAAGCGCCAGACCGGGGGGGCGGTGCTCTTCAGCGCCA 1250
 AGAAGAGCGGTACGACGATTCCAGTTCACCTACGAGGAGGGAAACATTAGC 1300
 AACGACGAGACGGTGGGCGCCGACAAGTTGGAGGACTGCGAGGAGGATAT 1350
 GTCGCTTGAGGCCTCCACGAAAGCAGATCCCTGGAACAGAATCCGGGA 1400
 AGGGATTCCATCAGGAGAATGAAGCAACTCCTCGCACGTACACGCTGCGC 1450
 AACCGGCGGGTGAATCTGCGTCCCTCCTCCGAGTTTATGTAGTTTTGTCT 1500
 ATTGACAGTAATTGTCCGTTGTGGAATTGTTTATACTTTTATCTTCTTAG 1550
 TTTAATATTTTTTTGCGGATGCCATTAAGTGTTAATTTATTAAGATGTTG 1600
 AAAATTAAATTA 1650
 AAAAAAAAAAAAAAAAAA **CTCGAG** 1670

Fragment 2:

GAATTC **GCGGCCGCGTTCGAC** GATAACCTGAAACGTTGGAAGGCCAACGAC 50
 TGGCTGGATCCGGATGCCGTGGCCGAGGAACCCAAACAGCCGAAGCCCAA 100
 GCCCAAGATAAGTCGCAACATGAAGATCAAATCGAAGGCCAAGCCGAGCA 150
 GCAATCTGCAGCAGTTCCTCCGCAAAGCCCATGCCAACATGAAGAAGACC 200
 AAGGTGGAGGAGCCAACGCTGGAGGATGGCCTGCCC GCCACGTCCTCGCG 250
 CCACAGTTCGCCGCGAGTAATCGTAGTTCGCAACCGCCGATCTTTTTTCGC 300
 CCGCCC GCACAGTTCCTCCGCATGTCCACCGGCGAGGGGCGTCAGTCGATT 350
 GCGCCAAATGCGCTCCTGAAATCAGCAATTCTTGCAGCCGCCGAACAGAA 400
 CGCTGCCAAGACGCCGCCGCTAAGCCGCGCACCTCCATCCTCAAGACGC 450
 CCGGCACCACGAAGCGCCAGAACCGTGGCGTGCTCTTCAGCGCCAAGAAG 500
 AGCGTACGACGATTCCAGTTCACCTACGAGGAGGGAAACATTAGCAACGA 550
 CGAGACGGTGGGCGCCGACAAGTTGGAGGACTGCGAGGAGGATATGTGCG 600
 TGGAGGCCTCCACGAAAGCAGATCCCTGGAACAGAATCCGGGAAGGGAT 650
 TCCAATCAGGAGAATGAAGCAACTCCTCGCACGTACACGCTGCGCAACCG 700
 GCGGGTGAATCTGCGTCCCTCCTCCGAGTTTATGTAGTTTTGTCTATTGA 750

```

CAGTAATTGTCCGTTGTGGAATTGTTTATACTTTTATCTTCTTAGTTTAA 800
TATTTTTTTTGC GGATGCCATTAAGTGTTAATTTATTAAGATGTTGAAAAT 850
TACATTTGGCGTTTTAAATGTTTCGACGAGTATGTTCTGTGAAAATGAAAG 900
CTTATTTTTATTTTTAATTATCTATCTTACCTTGATTATAATTTAGACATA 950
GTTGAAGGAATAAAAAAGAGAAGAATAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1000
AAACTCGAG 1009

```

Abb. 36: Sequenzen der isolierten Fragmente von CG17064

Die cDNA Fragmente von CG17064 wurden durchsequenziert. Fragment 1 ist ca. 1600 Bp lang und beinhaltet die letzten 1464 Bp von CG17064. Fragment 2 ist ca. 1000 Bp lang und enthält die letzten 711 Bp von CG17064. In rot ist der Linker eingezeichnet und die blauen Buchstaben markieren die XhoI Schnittstelle.

7.3.2 Proteinsequenz von CG17064 und Epitope für die Antikörper

```

      10      20      30      40      50      60
MQRHKELYKE QSLVLS PRNH CQENRDRLQA ARAKKREDCF YQNRIISVSP TPVKIKQLAA

      70      80      90      100     110     120
AQAALTQENV APKLES PERL DTKPAELLKE SNPKVSRQKL YLQRYMEWKI AKTKEHKQQD

      130     140     150     160     170     180
QKRRGAAINV PTVKQSKALP KSQTFRVPDN LASAKQKEAA PMFQPPKRC S LYMIANPTGK

      190     200     210     220     230     240
GKAAEPIKPS IPKPTSAAAP PSSNTVAASS ALARHKSAAS ATKIVPAIRQ NNNPVALARQ

      250     260     270     280     290     300
KAAARPIPNT TKQTTSVRQP GIEAKKITT IPRPTPATVT KAKTPGIRQQ PPVVSTKPRL

      310     320     330     340     350     360
PEPPAPRTAR LPNVLSKPF E KPLGNKAPVT R RANVVKPQP IRGGGGAAAK FKDTAGATSK

      370     380     390     400     410     420
AASHSIRMKA TKIKSQYTRL QDNVRKLPQL KAELLHAATL DIPPLTPLDD IHNPFIDQAT

      430     440     450     460     470     480
STQCKSNNS GHLL EAFGDT ILLSPVAPVK AEGESSVKRQ LLPEGKKEAS GPVAKKKFDF

      490     500     510     520     530     540
TRYSVANSPÄ ED SLILDPQQ TTVKEDTGDS TLVPEGTKTP PRRESNGMPN YLSPFVSVSR

      550     560     570     580     590     600
GKVNSRCEKE KRNSFYLSNE ESPLEVRAI ESVLYFRLQL ENEITRLQAL CAEWEAYSKE

      610     620     630     640     650     660
NEARLQETGG IDMINVTIGQ TRLLTTKMM QFSGGLIDRCE AGATGKNSQP NDGSEDSKPV

      670     680     690     700     710     720
QAEDLEGWWD MLRLQSENVD KRFDNLKRWK ANDWLD PDAV AEEP KQPKPK PKISRNMKIK

```

```

      730          740          750          760          770          780
SKAKPSSNLQ QFLRKAHANM KTKVVEEPTL EDGLPATSSR HSSPRVIVVR NRRSFSPART

      790          800          810          820          830          840
VLRMSTGEGR QSIAPNALLK SAILAAAEQN AAKTPPPKPR TSILKTPGTT KRQNRGVLF S

      850          860          870          880          890          900
AKKSVRRFQF TYEEGNISND ETVGADKLED CEEDMSLEAS TESGSLEQNP GRDSNQENEA

      910          920
TPRTYTLRNR RVNLRPSSEF M

```

Abb. 37: Proteinsequenz von CG17064-PA und die Epitope für die Antikörper

Die Sequenz wurde bei Swiss-Prot (<http://au.expasy.org/sprot/>) kopiert und enthält alle 921 AS des Proteins CG17064. In Lila unterlegt sind die beiden Peptide, die benutzt wurden um Antikörper gegen CG17064 herzustellen.

7.4 CG12340

7.4.1 Expressionsprofil von CG12340

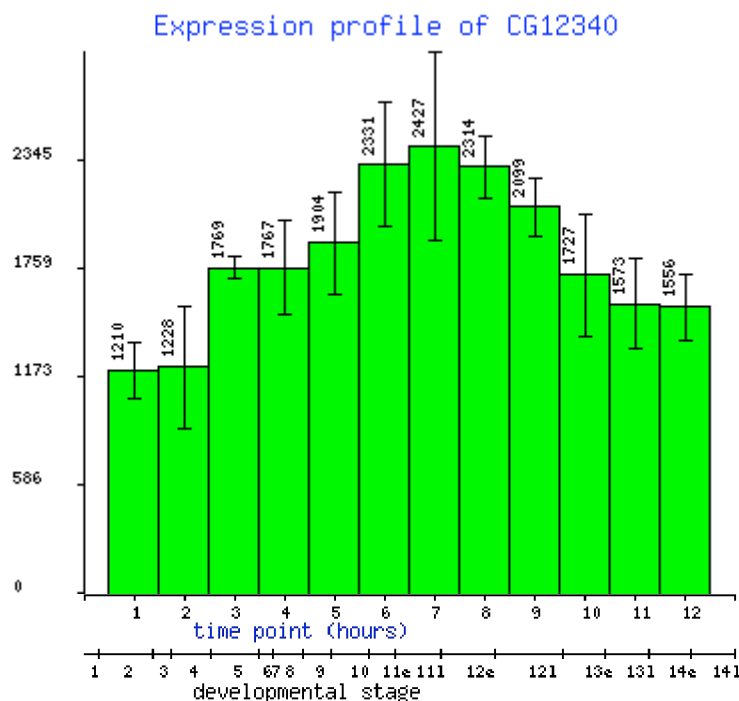


Abb. 38: Expressionsprofil des Gens CG12340

CG12340 ist während der ganzen Entwicklung des Embryos exprimiert, wobei ein Peak der Expression im späten 11. Stadium zu beobachten ist.

7.4.2 Sequenz des isolierten Fragmentes von CG12340

CG12340 wurde zwei Mal isoliert. Ein größeres Fragment, von ca. 720 Bp (Fragment 1) und ein kleineres Fragment von ca. 550 Bp (Fragment 2).

Fragment 1 (pHSI102):

```

CGATGATGAAGATACCCACCCACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTT 50
ACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATG 100
GAGGCCCGGGGATCCGAATTCGCGGCCGCGTCCGACAGCAACAGCAGCA 150
ACAACAGCAACAACACCTGCAACAACAACAAAAGCAACAACAGGCGCAGC 200
AACAGTTCCTACTACCTCGACCTAGTCCCGGTCCCACGCCAGGTTCGAGT 250
CCCGCCAAGCAAGTGCCGAAGTGCACAACCTAAAGTGCGCGCCAAGCAGCC 300
ACCGCTTTCGGGGGCCACGGTCTCGGTGCCCATCTCATCTAGCAGCAGTG 350
GATCGGAATTGGGCAGCTATGGACAGCAGCAGGAGTCCAGCTTGGCGCCG 400
GCCAAGCCCAAGGAGAAGGCAGTCATTGACCTCACAGATGAGGATGATGC 450
AGCGGCTGCGGCGGGCTAGGGCTGCCCAAGCACAAAACGCTCGTTTGC 500
GTATGGAGATGCTTAAGCGGAATGCTCAGACTGCAGCAGCGACGAGAGGA 550
GGACGAGGAGGCGGAAATGTGGTGCGAGCTTCTCCAATGCAATTGCCTCG 600
CGTAAATGCTCGACAGATAGTCCATAATAATGGAGGAGGTCAGCAAAGTC 650
CCTTGGGCTCAAACGTAACCTATGCAGATACGTTTCGGAAAACACCCCGCCT 700
CCAGCGTCTCGTCTAAGAT 719

```

Fragment 2 (pHSI72):

```

ATGATGAAGATACCCACCCACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTAC 50
CCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGA 100
GGCCCCGGGGATCCGAATTCGCGGCCGCGTCCGACAGCAACAGTTCCTAC 150
TACCTCGACCTAGTCCCGGTCCCACGCCAGGTTCGAGTCCCGCCAAGCAA 200
GTGCCGAAGTGCACAACCTAAAGTGCGCGCCAAGCAGCCACCGCTTTCGGG 250
GGCCACGGTCTCGGTGCCCATCTCATCTAGCAGCAGTGGATCGGAATTGG 300
GCAGCTATGGACAGCAGCAGGAACCCAGCTTGGCGCCGGCCAAGCCCAAG 350
GAGAAGGCAGTCATTGACCTCACAGATGAGGATGATGCAGCGGCTGCGGC 400
GGCGGCTAGGGCTGCCCAAGCACAAAACGCTCGTTTGCATGAGATGC 450
TTAAGCGGAATGCTCAGACTGCAGCAGCGACGAGAGGAGGACGAGGAGGC 500
GGAATGTGGTGCGAGCTTCTCCAATGCAATTGCCTCGCGTAAATGCT 549

```

Abb. 39: Sequenze der isolierten Fragmente von CG12340

Die cDNAs der Fragmente von CG12340 wurden nur ansequenziert. Fragment 1 ist ca. 720 Bp lang und startet bei Bp 3600 des Gens CG12340. Fragment 2 ist ca. 550 Bp lang und beginnt bei Bp 3600 von CG12340. In rot ist der Linker eingezeichnet.

7.4.3 Proteinsequenz von CG12340 und Epitope für die Antikörper

10 20 30 40 50 60
 MMGVNQTMEL KELSTEEALM RTLSTELGNE VEPLSTPAIL NESSQTSVDE VDLCELTNGV

70 80 90 100 110 120
 DSSDNVKVIL **D KPKKISDRER NPGS** DLDALL DKISSIVDCS PRNSDDIDSL DRDEECDSAS

130 140 150 160 170 180
 AKKRTAADTD ENLKEQREKP EEEEEGEEVL SSLEGEECID PDSELKTEEK LDETEEHASA

190 200 210 220 230 240
 KESTQKTEDL ADSDEILKSK EEDEV PANTA DNIKEDRKNT STDDVFMIAL DCISSADEFD

250 260 270 280 290 300
 AFASQDSKKA KPSKKLNTEN NSSVNDLEDI SSDDDDIIKE TEKPNTVID LDSSSECVPC

310 320 330 340 350 360
 EAESEVEETE ANTEDTEVLT HGKVSTKKSĻ NLQNNISEKS ASAAEYESVK ADQHLTEGKE

370 380 390 400 410 420
 PMLVGDEVTE KSKESIPIQS EESIQVDEPE ESKESEEEĻĻ HKEKEEPDYĈ KETKDSEEAT

430 440 450 460 470 480
 EKEKSEIKII KASKVAQILG DTKEEEDPSP TQEVEDVKET EEPENKKEIE DTEELEEPVV

490 500 510 520 530 540
 IEGEETEDPQ KKVQKEFDVR TADHEMNYTT IDDKLDEAVK DVVEIEEKKA AEDELGVIK

550 560 570 580 590 600
 GDKEPTTNGA CEISTDGNLK DLESNESTVV EEETKETESD DEVIFFEPLD KTENVGTTAN

610 620 630 640 650 660
 PTNENSVKPQ AKDDEVVLVS EDEDETPQNG ISEKEVQTIQ KETALKGLPN ESTTESVEAK

670 680 690 700 710 720
 NLQIDNSDNA CDQFEKLTHT DMVKQTTTED GNSNSSNLLR PAEYAEESVP KRLRLSTDEK

730 740 750 760 770 780
 NEFEAETNQE SLPILSRAEG GLKDVTKRSH EHLDSSPQEE IPNKKAKTED SDSNSSHEGT

790 800 810 820 830 840
 LQIDMGQED KEESPKKDTQ KKLDFDLNPV PEIKQNVKPL RLEFFKTFRR SFDTMTRDDL

850 860 870 880 890 900
 EELVLQKVVE AMMVKSDFAE IRMQLDKCES TLANYRRKIÄ EVSKQFLDLE TVHKRVLKDĻ

910 920 930 940 950 960
 EAKNSHFTAP VRITRAVGLQ VGIPFKAIKP TVAAPETHÄ AGSVLAPPSG TPPKASTSPT

970 980 990 1000 1010 1020
 RATVRPRPPP PTFGPSTSSS ETGAGVSVTP NSNHQQQPA ARSSQSLTTA SVTPPVRRGC

1030 1040 1050 1060 1070 1080
 LQKVTPHRPV PTNLQPAPML MNQSSVQRLQ SSPPIAQRTM HASKHTGTPG STPSSVANAI


```

1090      1100      1110      1120      1130      1140
NKTVMRARN S EAAFLAQKQQ QKQHQQQQQQ QQQHLQQQQK QQQAQQQFLL PRPSPGPTPG

1150      1160      1170      1180      1190      1200
SSPAKQVPKC TTKVRAKQPP LSGATVSVPI SSSSSGSELG SYGQQQESSL APAKPKEKAV

1210      1220      1230      1240      1250      1260
IDLTDDEDDA AAAAAARAAQA QNARLRMEML KRNAQTAAAT RGGRGGGNVV RASPMQLPRV

1270      1280      1290      1300      1310      1320
NARQIVHNGG GGQQSPLGSN VTMQIRSENT PPPASRLRYS HPAPLPTSPP QPFNPSWKVP

1330      1340      1350      1360      1370      1380
PSRPVIRISL LDTGIVISWT LEDSSPRFAE CVMYQIYAYQ ETINEPSTDS WRHVGDVSAM

1390      1400      1410      1420
LLPMAVTLNQ FQENQRYIFA VRGVDSHERF GPFSVPKTWS

```

Abb. 40: Proteinsequenz von CG12340-PA und die Epitope für die Antikörper

Die Sequenz wurde bei Swiss-Prot (<http://au.expasy.org/sprot/>) kopiert und enthält alle 1420 AS des Proteins CG12340. In Lila unterlegt sind die beiden Peptide, die benutzt wurden um Antikörper gegen CG12340 herzustellen.

7.5 CG11148

7.5.1 Expressionsprofil von CG11148

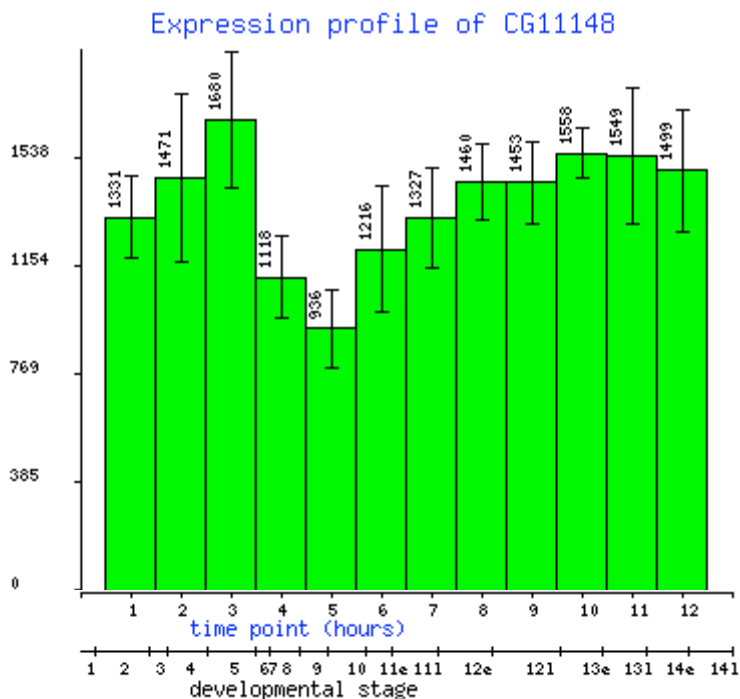


Abb. 41: Expressionsprofil des Gens CG11148

CG11148 ist während der ganzen Entwicklung des Embryos exprimiert, wobei ein Minimum im Stadium 9 zu sehen ist.

7.5.2 Sequenz des isolierten Fragmentes von CG11148

```

GATGATGAAGATACCCACCCAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTA 50
CCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGG 100
AGGCCCCGGGGATCCGAATTCGCGGCCGCGTTCGACCGAGAACAGACAGAA 150
GAAAAAAAAGGCCAAAGAGAGGAACGCAAGCGCCAGCAATTGGAAGATGA 200
TAAACGTCGGGCGTTGAATGAATCTGAAGAACAGACCCGCCAAATTCAAG 250
AGGAAAAGGAAAGGCAACAGCAAATACAAGCCCAACGTCGAAAGGCATTG 300
TTGGGCAATGTCCATTCTCTATCAGTTCAAAATGGGATGTCAGGAACATT 350
AGCGTCTGCACAAAGCAAGAAGAACGACGATGCCAAAACAGCAGAACCCC 400
AAGTATCCTCGCGCTTGCCGTCTACATCCGTAGCGCCTTGGTCTTTTCAG 450
TTGCAAAATTCATGAGATCGGCGCCTGGTCTGGCAGAAATACAAAAGGC 500
AGAACGTCGAGAGCGTCGCGCAGACCAACAGCGACATCAAGAGCTATTAG 550
ACAAGCAATTGCGTGCCAATGCCGCAGCTGCGGCTGAAGCCAACGATGCT 650
TTGCTTAAATGGCAGTCAACACCAGCGTCGGCGCCCGTAATGAGTCTCGC 700
CGAAATTC AAGCAGAAGAGGCAAGGCGGTTGGCCAATGACCTTGTGGATC 750
GGCAGCGTCGACGAGA ACTGGAACATCACCAACAAGCTCCTTTGTCATCA 800
GCGGTTTTGGTTACGAGTGC ACTTCCAACATCTGGGGTAACGCCAATAAA 850
GCATGGAGTTCGTCCGCTGCTCAATCACTTTCGTTAAAACAGTTCTGGAA 900
CTGGTCTGTGGGACGAACCGAATCCATTAGTTCTATG 933

```

Abb. 42: Sequenz des isolierten Fragmentes von CG11148

Die cDNA Fragmente von CG11148 wurde nur ansequenziert. Es ist ca. 933 Bp lang und startet bei Bp 3293 des Gens CG11148. In rot ist der Linker eingezeichnet.

7.6 CG7739

7.6.1 Expressionsmuster von CG7739

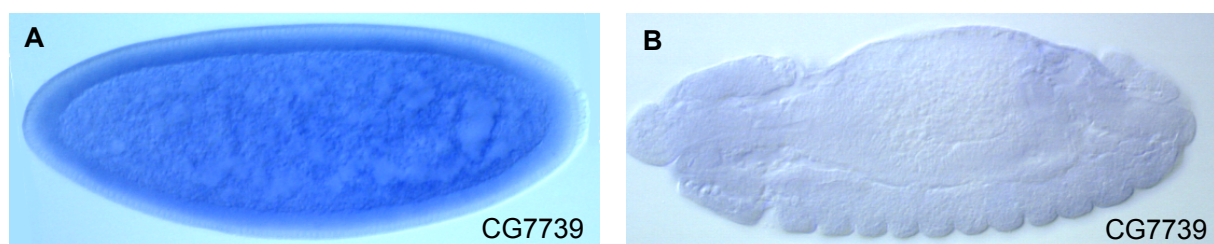


Abb. 43: Das Expressionsmuster des Gens CG7739

In situ Hybridisierung mit antisense RNA des Gens CG7739 (A+B). CG7739 ist in frühen Stadien stark exprimiert (A, Stadium 5) wird aber schwächer bis die Expression ganz verschwindet (B, Stadium 14).

7.6.2 Sequenz des isolierten Fragmentes von CG7739

```

GAATTCGCGGCCGCGTTCGACGCTGGAACGCCCTTTCGCCAATGGGCAACA 50
ACACGGTGGCAGGTGCATTCTACGACTTCTACCAAGACGGTGTGCTCGAT 100
GTGATTCTTATTCGAAAAGATGGAAAGGGCAAATACCAGCCACTCGCTTT 150
CCGGAACACGCTTGACTATGACGCGAACTTGTGAAGGTGATTGTGCTAA 200
CTGGCTTGGATAACAAGCAGAACCCGGAGAGACGCACTCCTTTGGGTAGG 250

```

```

AAAAGCGAACCTATGGCACTAACTTGCCAGGACCACGGATCACCTACAG 300
TACCACTACTCAGGATGGTGATCAGCAGTGCGGCAGTAGCGTTCAACTAC 350
CGCAGGCCTCGTATTTTGGCTCTGCAACTACCGTATACGTGCTTTGGCTTG 400
GGCCGAACGCCAAATTTCTGTGGATCAATTGACTGTAGGACTGGGCAGCAA 450
GTTGCGCAACTGGACGCAACTTATAACCGAACTCTCAGATAATTGTGGTTC 500
CAAAACCCCTAAACGAACCGTTCGCACTGGAAGGCTCAGCTTTTTTGTACAG 550
CCTAGCAAACCTGATTCTGATGAGCGTTCGTGGCGCTGGGTGGCACCTGCCT 600
GGTTATCGTCTTTATCATCCTTGTGCTATATATCAAGGAAAAGCGCGAGG 650
ATAAACAGGAACGCTTGCAGGAGTCTCACAGATTCCATTTTCGATGCAATG 700
TAAGGTGGTCGCCCCATTAAATGTAAATTAATAACTAATTAACACTTTTTGATT 750
CAACCCATAAGATGAGCTTTTTAATTTTATTATTATATAATGTTGATTAAT 800
ATTCCTAAAAGAAAGGAGCGCTCTATTAACTCCATTATAAGCTTTCCAAC 850
CATATTGATGTCCTAAAATGCCACAAACAAATTGATAAAAATGTAAAGTA 900
GAACAATATTTGGCGGACCATCTCAAGGCGGCTTTTAAAATCATAGCTCA 950
TCATGGAATCAATAGAGATGCTCCTTTACATAATTTATATTTGTAATATG1000
GTTTAAGAAATGTGATAATATAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGAG 1045

```

Abb. 44: Sequenz des isolierten Fragmentes von CG7739

Das cDNA Fragment von CG17492 wurde durchsequenziert. Es ist ca. 1050 Bp lang und beinhaltet die letzten 1000 Bp Gens CG7739. In rot ist der Linker eingezeichnet und die blauen Buchstaben markieren die XhoI Schnittstelle.

7.6.3 Proteinsequenz von CG7739 und Epitope für die Antikörper

```

    10      20      30      40      50      60
MTRCSLVLGL LLALGNLIHA SNITDKVFAD IKEGIVAAFG DFNSDELTDV FVIRDGMKRL

    70      80      90     100     110     120
QILFGHYTEP LLKLGPDQY  GDKTIVSVIP  GDFDGDALMD VLVNLKKGDE ETYEVHINWG

   130     140     150     160     170     180
NTTELKCSNK SLFTSKGEVM ALDFNRDMI  DLYGLDSAER RTFWIFNSSR LPPEAVHQAE

   190     200     210     220     230     240
PTEFKENLSI PNANAYLDLN GDFLADLFLQ TKSSYEIWHG INERDKQENF SYQYQIKFQP

   250     260     270     280     290     300
IGGNDYYIGQ AVFMDFELKG VQNIIVVFCI LSNCRNSSIM VHDGTDFRNL HVNFRDPQGV

   310     320     330     340     350     360
TWAFVPPVSD DVYLRTITAR  SGDFNLDGYP DLLVTLQPLN VDKPVMQTFI LENVPCTTCN

   370     380     390     400     410     420
KPLKRTFEVR WNALSPMGN  TVAGAFYDFY QDGVLDVILI RKDGGKGYQP LAFRNTLDYD

   430     440     450     460     470     480
ANFVKVIVLT GLDNKQPER RTPLGRK KRT YGTNLPGPI TYSTTTQDGD QQCGSSVQLP

   490     500     510     520     530     540
QASYFALQLP YTCFGLGRTP NFVDQLTVGL GSKLRNWTQL IPNSQIIVVP KPLNEPSHWK

```

550 560 570 580 590
 AQLFVTPSKL ILMSVVALGG TCLVIVFIIL VLYIKEKRED KQERLQESH^R FHFDAM

Abb. 45: Proteinsequenz von CG7739-PA und die Epitope für die Antikörper

Die Sequenz wurde bei Swiss-Prot (<http://au.expasy.org/sprot/>) kopiert und enthält alle 596 AS des Proteins CG7739. In Lila unterlegt sind die beiden Peptide, die benutzt wurden um Antikörper gegen CG7739 herzustellen.

7.7 CG13034

7.7.1 Expressionsmuster von CG13034

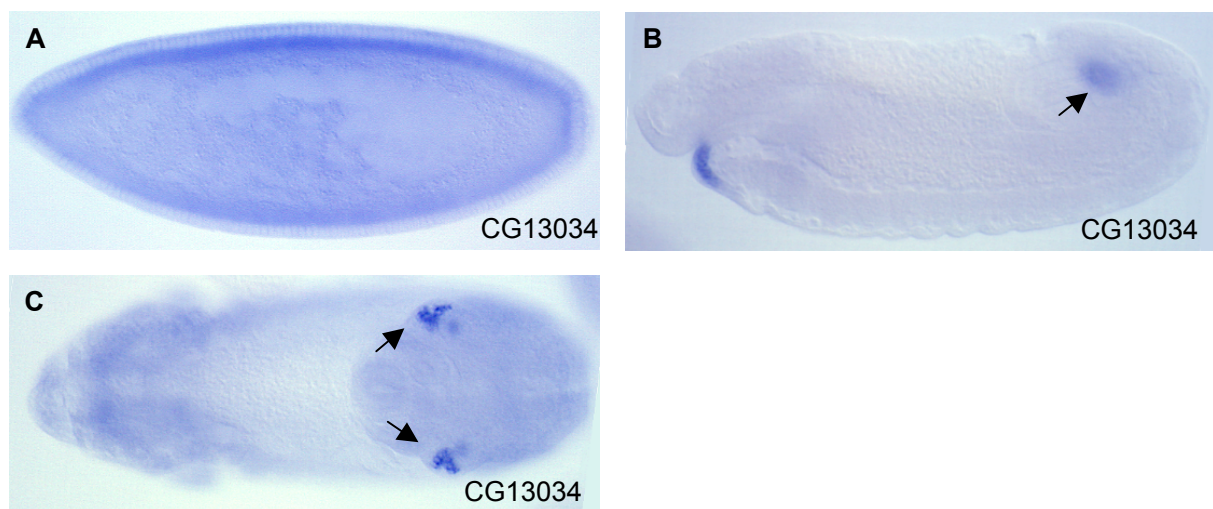


Abb. 46: Das Expressionsmuster des Gens CG13034

In situ Hybridisierung mit antisense RNA des Gens CG13034 (CA-C). CG13034 zeigt in frühen Stadien eine ubiquitäre Expression (A, Stadium 5). In Stadium 14 (B und C dorsale Sicht) ist CG13034 spezifisch in den posterioren Spirakeln (Pfeile, B+C) und dem ventralen Ende des Vorderdarmes exprimiert.

7.7.2 Sequenz des isolierten Fragmentes von CG13034

```
TATTCGATGATGAAGATACCCACCCAACCCAAAAAAGAGATCTCTATG 50
GCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGC 100
CATGGAGGCCCGGGGATCCGAATTCGCGGCCGCGTCGACGGAAACTTA 150
AGAATCGGGCCACTAAGCGACCCTTCGCCATAAGGTCACCGCCGCCCTG 200
AAACGAGGAGGTCAGCGTCCGAGTAGCGTGAGTGCGGCAGCTGCGAGTGC 250
GGCAGCGGCCTCAAACCCAGTAGCAGCACCACCACCGCCGCCGCCCA 300
GCAGCACCACCCAGAAACAGAAATTGGCCACCAACAGTTTCCAGCAGAAG 350
CAGCAGCAAGCGAAGCCCCTGCAAAGGTCACACCTTCGATTGGCGGTGG 400
TGGATCATCCAACCCGTCTCGGCATCCATTCCCTCGGCTACCACGAATT 450
CCGCAGCTCCCTCCTTGCCATCGAGCAATTGTATACCCGTACCTCCCCAG 500
GCCAATATCCCATTGGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACCTCATCCGCCTC 550
AGCAGCGGCAGCAGCAGGATCAGCAGGATCGGGAGCCACACCAGCCACCT 600
ACAGCAGCCAGCATGACAGCATGGTATACGATGGACATGTCAATGCGTGC 650
```

```

GCCTTGATCGACAGCCTGAACACAAACGCTCGGGAGGAATACTACCAGCA 700
GAAACTAGGAGCAGGCAACAAGGATAACAAGAAACGGCGACAGCGAAACG 750
ACGAAATATCATTATTATCCGCACAATCAGCACATCTATCTGCTGCCAGA 800
GTGTGCCATTACCAAGTTTGTAAACGCCGTCTACGTGAGATTGAACTACA 850
CCCACCACTGTGCGCCTGTCATCCAGAATCGTGATCCTGCTCG          893
    
```

Abb. 47: Sequenz des isolierten Fragmentes von CG13034

Die cDNA Fragmente von CG13034 wurde nur ansequenziert. Es ist ca. 900 Bp lang und startet bei Bp 1218 des Gens CG13034. In rot ist der Linker eingezeichnet.

7.8 Dystrophin

7.8.1 Expressionsmuster von Dystrophin

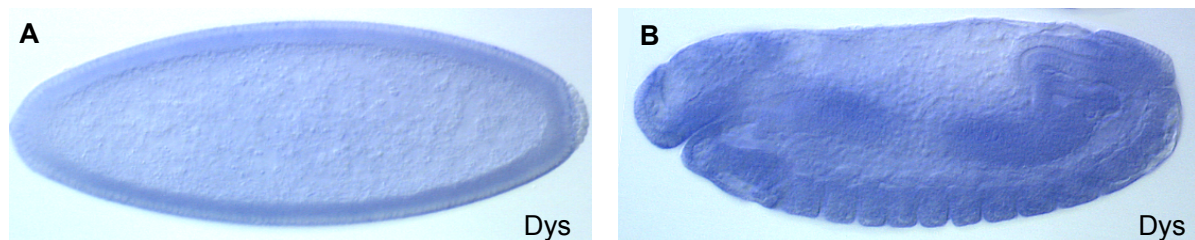


Abb. 48: Das Expressionsmuster des Gens Dystrophin

In situ Hybridisierung mit antisense RNA des Gens Dys (CA+B). Die Expression Dystrophins ist in frühen Stadien (A, Stadium 5) erst noch schwach, verstärkt sich aber mit zunehmendem Alter (B, Stadium 14).

7.8.2 Sequenz des isolierten Fragmentes von Dystrophin

```

GACTCCAAATTGAACGGAAGTGATGGTGCTAGCAGTCAAGATCTTCGAAA 50
ACTGGAGATCGATGTGATAAGCGCTCGAAATTTTCAGCGAAATTTCTGATCA 100
AGGAGGCGGAGCCAGCCCAAAAGGAATCGCTACAATCACAGATAAGGGCT 150
CTCAATACGTTGTACGATCAAGTGGAACAGGTTTCATCGGGAGAAGAAGGA 200
ACAGCAGACGGTCTGCAATCCCATATTGATCTTATCCAGCTTAGGCTCA 250
AGGAAACCGATCAGTGGTTAACTGATCTGGAGAGTAATACACCCAAATCG 300
GGTATTAGCGATATAGTAAACTCCAACGAGTTGTTCCAGAGCAAGAGTCG 350
CTTTCAGACTCTTAAAGAAACATGCGAAAGGGAAACCACACAGTTTAGGG 400
ATCTCAACGAACGTGGTGGTGAGCTGCTCCTCCAAATGGATGAGCTTCAG 450
GACCAGGATAGGGAGTCCCGATACGGATCGCTAGCAAAGCAATTCACACG 500
CATCAATGCCAGATGGACGGAGGTCACCGAGCTGGTTTATGCGAAGACAG 550
CTCTTCTCGAGCATATATCAACGCAGCTGGGGGAGTTCAAGAAGTTCATG 600
GTTAGCGAGACGGGTTACCTGGACAAGTTGGAAAACAAGATACGCAACAC 650
ACCAGAGAATGCAGCCGACGCAGAGGAGATCATGGAGGAGCTTGATGATC 700
TGGAGAACGTTCTGCGCTCGCACTCTGAGGAATGGCTGGACAAGATTCAG 750
GAAATTGGCAACGAGCTAATTGACAACGAATTCATGGCCGACTCCATACG 800
ACGAGACATTTGATGAAACCGTTCAACGGTGGACGCAACTCCAGCAGCAGG 850
    
```

```

CAAAGAAGCGAACTGAGCTCCTGGAGCAAAAGGTCAGCGAGGCGGAACAG 900
TCCGAGAAGTGCATCGTGCAGTTCGAGAAGTGGCTGACACGTGTAGACGA 950
CATACTCAGCGATCATCTGGATAACGATGTGACCATTGTAGATCAGCCGG1000
AGGAATTCCAGCGCTTGGCACACGAGTTTGTGGCCAATGAGAAAAACTTT1050
AAGGAGATCAGCGAACTTATTGACGAGCACACGAGGAACGGCAAAGTGGG1100
AGCTGCCAATCGGCTACAGGAGCAGCTTAACCTGATGGAGGTGCGGTTCA1150
AGTACTGTCAGGCAAAGCTGAGCAAGTGCACCGCAATCCAACATTCTTAC1200
GAATCGCGTTTGAATAGGGCCTATACGGATCTTCGAAATGTGGAGCGATC1250
CACTGAGGGAGTAGATGTGCGATTTCGCCGGACCCAACACGGTTCAGACTC1300
AATACCAAAAATGTCTGCAAATTTATCGCACTCTGTGCGGAGATAAAGTCG1350
GAAATCGAGAGCACGATTA AAAACCGGTCGCAGGGTTT GCGAGGACAGGTA1400
CACAAAATCGCCGAAGCAACTTAGTCAGCGGATTGATGCGTTGAAGCACCC1450
TGTACAATAACCTCGGAGAGAATGTGACCCAGTCAAAGGCGACCCTGGAA1500
AGGCTGCTCACATTAGCGAGGCAATTAGAGGAGTGTTCGATTCGGCAGA1550
CAACCTAATCCGGCGCTTTGAGTCGCCGCAAGAGGTCCATGACAGGAACT1600
CCATACTCCTGGAGTTCGAGGATGTGCTGCGAAGTTGCGAGGACCACTAC1650
AATGAGTATAACAAATCCTGTGACCAGAGCTGCATGGTGGAAACCCGTCA1700
AAGGATCGATGGATTGAAGGCTACGTACCACAAGTTGACCAGTGC GGACA1750
TAATCAAGCGGCTCACCGAGATGAAGACCACCCTGCAGAACCTGGACAAC1800
ATTTCAATTGGAGACTTTAAGGGCAATGGAGCACGACCTGAAGGAGATAAA1850
TGTGCCCTCGAATCCGGAAATTGAGAAATTGCAGCAGCAAGTAATTGCAA1900
TTGTGCTGAGTCGCATTATGACGCCTTCTACCAAAAAATCCCAATCCCTTC1950
CTGAGCAAGGTCCTGGAATCATTGTCTTCTCCGGTGGATGACTCAAATGT2000
AACGCTCAAAGCCCGCTCAGCGAACAGCTGCCCCAGAATCTGGATGATC2050
GTGTCCGGGAGTTCGACAAGCAGGCCAAGCAGATGATCTACAAGTTGAAG2100
CTTACGAAGGCCAAGATTGAACAGTGTACGAAAGCGAAGCATAGGACCT2150
GCGGCTCCTAATAGCACCTGATGCAGCCACCTTGATATCCCAAGGCGACT2200
CATTGGTTCGGAAACTCATGGAAGACAGGGCAGCATATCCCGCCTGGTG2250
ATGCGCACACAAATAATATTGAGGGAACAATTCCTATAAGTGCAGCAAGC2300
AAGATCCAAGACCTCGGGAAGCGGGGCACCAGCTCCTCCACTGGACAGCG2350
TAAACATCGAGGAGCTGGTCACCAAAGGACTGCGTCGCATCAACGTTCTC2400
ATAGAAAAGACCGTCGATCTAAAGTCTAGCACTGATCTTGAGAAGCGCAT2450
GGAGGATATCAACGAGCGGCACGACGATTTGCAGGTGATTGTCAGCGCCA2500
TTGGCAAGAACGCCAGATGCCGAAGGTCACGCCCTTATGATGAACGAA2550
ATTGAAAAGACGAAAAACAATTTGATAGCTCATGCGGATTCCATTGAGCT2600
CTCGTTGACGGAACCTTAGAAATGGCCCCGAATTTCCAATGGCAAGGAGC2650
GCCCAGATGCATCCAGTGC GGCCACCATGAGCTGTCGTTCCGACGCCACA2700
ACTTGACGCGGCTGCGTTCCGGGTCCCATGTCCTGAATCCCGCTGGTGG2750
CCAGGACCGTGTTAGCTGTCCTCCTTGACTTGGCATTTGTCGCCAAAAT2800
CCCTGTCTTGCAGACCGGCCTAATCCTGCGAGGGACACTGCGAAAACCT2850
ACAAACGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2877

```

Abb. 49: Sequenz des isolierten Fragmentes von Dystrophin

Die cDNA Fragmente von Dys wurde durchsequenziert. Es ist ca. 2880 Bp lang und beinhaltet die Bp 2993-5682 des Transkripts Dys-RC. Die Sequenz startet direkt nach dem Linker und endet direkt vor der XhoI Schnittstelle.

7.8.3 Proteinsequenz von Dystrophin und Epitope für die Antikörper

10 20 30 40 50 60
MEPGILIDER QHIQKKTFTK WINSHLIDTQ CTPVKDLFLD LRDGHRLLAL LSTLTQTNLK

70 80 90 100 110 120
PEKGRMRVHH INNLNKVITE IQQHGVKLVN ISSDDIVGGN AKLTLGLIWL IALEFNGQHL

130 140 150 160 170 180
VKSHSSNGVE KSLLAWARQY TEPHGLQLND FSSSWSDGRA FLMILDAHVE ELNLQAALQQ

190 200 210 220 230 240
HALKRLHLAF DLAHRHFKIE KLLDAEDVHT HKPDNKS IQM YVMCLYHAME SMRTRQQEQE

250 260 270 280 290 300
QDEGQDQDPG RVPCTSITDL DEVPLDNDQT SLGLYTSDSA GSMEQRSSGE LKTHSMRPLS

310 320 330 340 350 360
TATNASVEIS GYQSALEAVL TLLLEDEQLL SQNLDPDPQDF QTAKLQFHEN ESFMLKLTEH

370 380 390 400 410 420
QEYVGEALEE GSNLINESQK AGAGLSQEDQ NEVRQQMVLL NERWETLRLR ALDVQAKILM

430 440 450 460 470 480
RLAEFQKQKL EQLRQFLTSV EDRISHMSDI GPTLEEAQKQ LLEAQKQKAD LSEQQELVDS

490 500 510 520 530 540
LSSMVVIVND TSGNFNDLED RLSALGERWS HVVKWSDLRK EKLQQYKCIS RWLDAREQDL

550 560 570 580 590 600
KLMESRDVTD VGGITQRINE LNYCAKDLE LQRYLIDLRQ MVAATLQDGD DKGERVLIQL

610 620 630 640 650 660
ESYEDRLDAL KQIVEVQTVR IETKGFNFGR DRASYDDSRV VRPEGWVDYQ MIIRFGEDDS

670 680 690 700 710 720
QEDDDEHDLA SKKRKLRLNAD NFNALENHIM EHFQYVQVEVE QKLQQLQRQS LRQOCELLKE

730 740 750 760 770 780
LQAENSRRCG TLPKLLKLYE VCELEDPSRN LLEETHIKQ LEQRYANLSQ KLSSQQSESH

790 800 810 820 830 840
TLLAKEKYVN SLTGFKLVLA DSRDQYKQHA GSASGNELEQ RLSHMESLAS EISEAKTATE

850 860 870 880 890 900
ELDDNLIEWK QDFGLFYDSW HDMKQALQAL IQQRGGESLS RQLKQIQDFV TKVSNQKVRV

910 920 930 940 950 960
SNLEVMQEQQ HFLNQLLDEM ESLRLTYDNI PKHLIGEEELQ TAWNRLPEQL NERVIKQTTA

970 980 990 1000 1010 1020
IENLNHFQAE YNAIIAMLR S AADSKLNGSD GASSQDLRKL EIDVISARNF SEILIKEAEP

1030 1040 1050 1060 1070 1080
AQKESLQSQI RALNTLYDQV EQVHREKKEQ QTVLQSHIDL IQLRLKETDQ WLTDLSENTP

1090	1100	1110	1120	1130	1140
KSGISDIVNS	NELFQSKSRF	QTLKETCERE	TTQFRDLNER	GGELLLQMDÉ	LQDQDRESRY
1150	1160	1170	1180	1190	1200
GSLAKQFTRI	NARWTEVTEL	VYAKTALLEH	ISTQLGEFKK	FMVSETGYLD	KLENKIRNTP
1210	1220	1230	1240	1250	1260
ENAADAEEIM	EELDDLENVL	RSHSEEWLDK	IQEIGNELID	NEFMADSIRR	DIDETVQRWT
1270	1280	1290	1300	1310	1320
QLQQQAKKRT	ELLEQKVSEA	EQSEKCIVQF	EKWLTRVDDI	LSDHLDNDVT	IVDQPEEFQR
1330	1340	1350	1360	1370	1380
LAHEFVANЕК	NFKEISELID	EHTRNGKVGА	ANRLQEQLNL	MEVRFKYCQA	KLSKCTAIQH
1390	1400	1410	1420	1430	1440
SYESRLNRAY	TDLRNVERST	EVVDVASAGP	NTVQTQYQKC	LQIYRTLSEI	KSEIESTIKT
1450	1460	1470	1480	1490	1500
GRRVCEDRYT	KSPKQLSQRI	DALKHLYNTL	GENVTQSKAT	LERLLTLARQ	LEECFDSADN
1510	1520	1530	1540	1550	1560
LIRRFESPQE	VHDRNSILLE	FEDVLRRCED	HYNEYNKSCD	QSCMVETRQR	IDGLKATYHK
1570	1580	1590	1600	1610	1620
LTSADI IKRL	TEMKTTLQNL	DNISLETLRА	MEHDLKEINV	PSNPEIEKLQ	QQVIAIVVDV
1630	1640	1650	1660	1670	1680
LKTRFNEATT	LAARNTSSPD	NDDTEIVVVS	DTVRQRRART	PQSGESPSSA	HTSSSESPTK
1690	1700	1710	1720	1730	1740
GVENSPGAVG	DQVMPDLLPP	QTFRLAESST	LFSQISLNPQ	KVTNTPPPKP	AKTKRKAPSS
1750	1760	1770	1780	1790	1800
PAQVVEIRVK	NIQNDKMSVQ	NIDLEPQQGE	IVDTVNILES	VEPFVPEYVE	TVQIVDLSED
1810	1820	1830	1840	1850	1860
SDSSVRVDSQ	GKEMRRSKSK	HSLNETPLPK	VSDNDEDSAE	QEEDLLRPSA	ENTSTPFLRV
1870	1880	1890	1900	1910	1920
EKRRI SFDEK	RKRVANERDI	LRDSEEEEPK	TPDTPRAAQV	SKPKRWRQLQ	PEMDALEPES
1930	1940	1950	1960	1970	1980
PGRDSFYSPD	KESGFDAEPL	VFSDDDEDIPR	FSLEMTSTID	SDSDTSRIMT	PSTKNPNPFL
1990	2000	2010	2020	2030	2040
SKVLESLSPP	VDDSNVTLKS	PISEEQPQNL	DDRVREFDKQ	AKQMIYKLLK	TKAKIEQCHE
2050	2060	2070	2080	2090	2100
SEAEDLRLLI	APDAATLISQ	GDSLVLLETHG	RQGSISRLVM	RTQIILREQF	REVQQARSKT
2110	2120	2130	2140	2150	2160
SGSGAPAPPL	DSVNIEELVT	KGLRRINVLI	EKTVDLKSST	DLEKRMEDIN	ERHDDLQVIV

7. Anhang

2170	2180	2190	2200	2210	2220
SAIGKNAQMP	KVTPLMMNEI	EKTKNNLIAH	ADSIELSLTE	LRNGPRISNG	KERPDASSAA
2230	2240	2250	2260	2270	2280
TMSCRSEYNN	EPSGTGALAG	SFDKSVLQIS	DWLTWEQNMI	KIQSVLVDDG	DAVRLAIEKQ
2290	2300	2310	2320	2330	2340
EKVLRELKMK	KPQLNELVHT	AEVLKGDVKR	QQLQEKELKQ	FSLAPHCSAD	LDYMRCCCLKV
2350	2360	2370	2380	2390	2400
TRLREHWDET	SQCVLQRAAQ	LKNMLSDSQR	FEAKRLELEK	WLARMEQRAE	RMGTIATTAD
2410	2420	2430	2440	2450	2460
ILEAQQKEQK	SFHAELHQNK	QHFDIFNELT	QKLIAVYPND	DTTRIKKMTI	VINQRYANLN
2470	2480	2490	2500	2510	2520
SGVINRGKQL	HAAVHSLQSF	DRAMDQFLAF	LSETETLCEN	AESDIERNPL	MFKDLQSEIE
2530	2540	2550	2560	2570	2580
THRVVYDRLD	GTGRKLLGSL	TSQEDAVMLQ	RRLDEMNQRW	NNLKSKSIAI	RNRLESNSEH
2590	2600	2610	2620	2630	2640
WNALLLSLRE	LTEWVIRKDT	ELSTLGLGPV	RGDAVSLQKQ	LDDHKAFRRQ	LEDKRPIVES
2650	2660	2670	2680	2690	2700
NLTSGRQYIA	NEAAVSDTSD	TEANHSDSDR	YMSAEEQSRE	LTRSIRREVG	KLSEQWNNLI
2710	2720	2730	2740	2750	2760
DRSDNWKHRL	DEYMTKMRQF	QKILEDLSSR	VALAEQTKTS	WLPPSSVGEA	NEQMQLQRL
2770	2780	2790	2800	2810	2820
RDKMTTASAL	LDDCNEQQSF	FTANQVLVPT	PCLSKLEDLN	TRMKLLQIAM	DERQKVLCAQ
2830	2840	2850	2860	2870	2880
GAQQTHENGD	DGRTTNSNGT	IGPLPNLQSS	VKPPWERATT	AANVPYYIDH	ERETHWDHP
2890	2900	2910	2920	2930	2940
EMIELMKGLA	DLNEIRFSAY	RTAMKLRVSV	KRLALDRISM	STACESFDRH	GLRAQNDKLI
2950	2960	2970	2980	2990	3000
DIPDMTTVLH	SLYVTIDKID	LTLMLDLAIN	WILNVYDSQR	TGQIRVLSFK	VGLVLLCKGH
3010	3020	3030	3040	3050	3060
LEEKYRYLFR	LVADTDRRAD	QRRLGLLLHD	CIQVPRQLGE	VAAFSGSNIE	PSVRSCLEQA
3070	3080	3090	3100	3110	3120
GISQEAIDGN	QDISIELQHF	LGWLQHEPQS	LVWLPVLHRL	AAAEAAKHQA	KCNICKEYPI
3130	3140	3150	3160	3170	3180
VGFRYRCLKC	FNFDMCQKCF	FFGRNAKNHK	LTHPMHEYCT	TTTSTEDVRD	FTRALKNKFK
3190	3200	3210	3220	3230	3240
SRKYFKKHPR	VGYPVQSVL	EGDALESPAP	SPQHTTHQLQ	NDMHSRLEMY	ASRLAQVEYG

```

3250      3260      3270      3280      3290      3300
GTGSNSTPDS DDEHQLIAQY CQALPGTSNG SAPKSPVQVM AAMD AEQREE LEAIIRDLEE

3310      3320      3330      3340      3350      3360
ENANLQAEYQ QLCSKEQSGM PEDSNGMQHS SSSMTGLSGQ GEQGQDMMAE AKLLRQHKGR

3370      3380      3390      3400      3410      3420
LEARMQILED HNRQLEAQLQ RLRQLLDEPN GGGSSATSSG LPSAPGSALN SKPNTLQTRS

3430      3440      3450      3460      3470      3480
VTASQLNTDS PAKMNQQNGH YEHNSKNSSG LVTVITEQEL ESINDDLEDS SSSNTTNTTT

3490
TTTTTATTEK TCVELQK

```

Abb. 50: Proteinsequenz von Dystrophin-PA und die Epithope für die Antikörper

Die Sequenz wurde bei Swiss-Prot (<http://au.expasy.org/sprot/>) kopiert und enthält alle 3497 AS des Dystrophin Proteins. In Lila unterlegt sind die beiden Peptide, die benutzt wurden um Antikörper gegen Dystrophin herzustellen.

7.9 EG:80H7.5

7.9.1 Expressionsmuster von EG:80H7.5

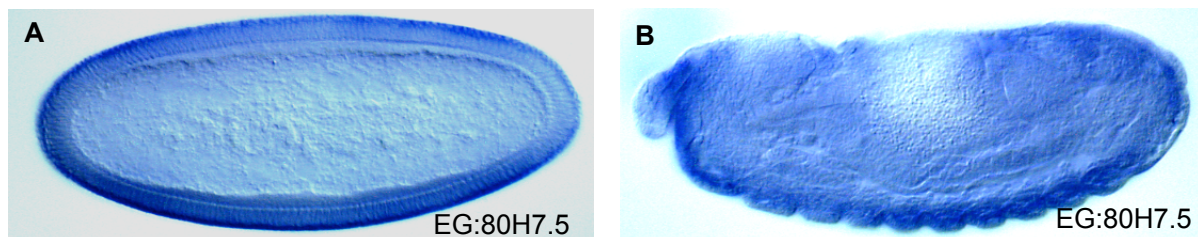


Abb. 51: Das Expressionsmuster des Gens EG90:H7.5

In situ Hybridisierung mit antisense RNA des Gens EG:80H7.5 (A+B). Die EG:70H7.5 RNA zeigt schon in frühen Embryonen eine starke Färbung (A, Stadium 5). In späteren Stadien (B, Stadium 14) ist eine erhöhte Expression in der Epidermis zu sehen.

7.9.2 Sequenz des isolierten Fragmentes von EG:80H7.5

```

GAATTCGCGGCCGCGTTCGACTGGATGATGTATATAACTATCTATTCGATG 50
ATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCA 100
TACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGC 150
CCCGGGGATCCGAATTCCAGCGGCCGCGTCGACCGCGGCCGCGTCGACCG 200
AATCGAAGTTAAGCCCAAACCAAAGCAAAGCCAAACCCAAGCCGAGCC 250
CAAGCGCCTATTATCGTCATGGTGGACCGTCTGGTCAACTCGGAGGCCAA 300
CACGCGCCGCATCGCCTCCGTGGAGAACTGCTTCGGGAGCTCGGGCGTGC 350

```

```

CGCTGGCGATGCAAGGTCGCGTTCTGGTGGGCGAGGGCGTGCTGACCAAG 400
ATGTGTGCGCAAGCGGCCCAAGTCGCGCCAGTTCTTCCTGTTCAACGACAT 450
CCTGGTGTACGGAAACATAGTGATTGGCAAGAAGAAGTACAACAAGCAGC 500
ATATCATGCCGCTGGAGGAGTCTCGCTGGAATCGATTGCCGACAACCAG 550
ACGTACAGAAACGGCTGGTACATCCGCACCACCACCAAGTCGTTTGTGGT 600
GTTTGC GGCCACCAGCACCGAGAAGCAGGAGTGGATGGCTCACATCAACA 650
AGTGCGTGGAGGACCTGCTGCGCAAGAGCGGCAAGAAGCCGGTGGAGAAC 700
CACGCCGCCGTTTTGGGTGCCCGACACCGACGCCAGCGTCTGCATGCACTG 750
CAAGAAGACGCAGTTTACTTTCATCCAGCGCCGGCATCACTGCCGCAACT 800
GCGGCGCTGTTGTCTGCGCCGGCTGCTCGGCCAAGAAGTTCCTGCTTCCG 850
CAGCAGAGCACCAAGGCGTTGCGCGTCTGTGACGCCTGCTACGAGCGCTT 900
GAAGCACGTGCCAAGTTCCTTGGCTCTGGCGAGGACTCGGCAGCGGCTA 960
CCGGCGCTGCCTCCGGCAACAAGCTCAACACAACAGCCGGCGACAGCTCC1000
AACGATGAGGACTCCGACGAGGAGACTGCCTCCCCTGGTGGCGAGTTCGCA1050
CGATGAGCCGCGCTTCTACGGGGACAACAGCGTGCTATCCGCCGTGGAAG1100
ACTCCTCGACGATAACCTCGCCCTCCTCCGCCACCCTGGCAGCTTGGAG1150
GCTCCCCAGGTGACACCGAGCGTCCAAGCTCCCCGGCTGCCGTTGCGAC1200
GACGGGCAGCCACTGTTGAACGGACCACATAGCGAATGATTATGATTATG1250
AAAGACGAACAACGGAAGCGATGCGAGCAGGAGGAGATTAAGGAGCTGCG1300
CAAGATGACGGCATTCAAGGCTCGTCCGAATCCATTTAAATAGTGCTCGA1350
CGGAACCAATCGACTACCAAACGTTTGATAGCCCTGTCCAAATTTAAATG1400
AAGTGAAGTCGATGCTACACATAATCGTGTTTACCGATGCATAGTTTTTAC1450
CAGATTAACACAATTTTTGTCTCTTAACATTAACATTACTTTTTACGCATA1500
TATCGTTCCCGTTTTTGGCGGATAAGAACCCTAAAATCGTATGTTTGGC1550
GAGAGGATAAACTATATGGATATGTATAACAACATAAGCAATTTGCAATTG1600
CGATCATTAACGTTTTTCTATTTGTACAAAGCCCCAAAAACAATAAATTA1650
ATACTGTAAATTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGAG 1687

```

Abb. 52: Sequenz des isolierten Fragmentes von EG:80H7.5

Das cDNA Fragment von EG:80H7.5 wurde durchsequenziert. Es ist ca. 1700 Bp lang und beinhaltet die ganze kodierende Region des Gens EG:80H7.5. In rot ist der Linker eingezeichnet und die blauen Buchstaben markieren die XhoI Schnittstelle.

7.9.3 Proteinsequenz von EG:80H7.5 und Epitope für die Antikörper

```

    10      20      30      40      50      60
MVDRLVNSEA NTRRIASVEN CFGSSGVPLA MQGRVLVGEV VLTkMCRKRK KSRQFFLFND
    70      80      90     100     110     120
ILVYGNIVIG KKKYNKQHIM PLEEVSLSEI ADNQTYRNGW YIRTTTKSFV VFAATSTEQ
   130     140     150     160     170     180
EWMAHINKCV EDLLRKSgKk PVENHAAVWV PDTDASVCMH CKKTQFTFIQ RRHhCRNCGA
   190     200     210     220     230     240
VVCAGCSAKK FLLPQQSTKA LRVCDACYER LKHVPSSLGS GEDSAAATGA ASGNKLNTTA

```

250 260 270 280 290 300
 GDSSNDESD EETAS PGGES HDEPRFYGDN SVLSAVEDSS TITSPSSATT GSLEAPQVTP

 310
 SVQSSPAAVA TTGSHC

Abb. 53: Proteinsequenz von CGEG:80H7.5-PA und die Epitope für die Antikörper

Die Sequenz wurde bei Swiss-Prot (<http://au.expasy.org/sprot/>) kopiert und enthält alle 316 AS des Proteins EG:80H7.5. In Lila unterlegt sind die beiden Peptide, die benutzt wurden um Antikörper gegen EG:80H7.5 herzustellen.

7.10 CG16721

7.10.1 Expressionsmuster von CG16721

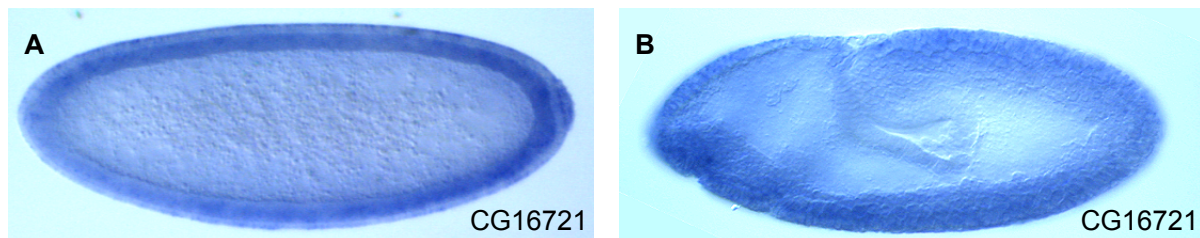


Abb. 54: Das Expressionsmuster des Gens CG16721

In situ Hybridisierung mit antisense RNA des Gens CG16721 (A+B). CG16721 ist in frühen (A, Stadium 5) wie auch in späteren Stadien (B, Stadium 10) in allen Zellen lokalisiert.

7.10.2 Sequenz des isolierten Fragmentes von CG16721

```

ATAACTATCTATTTCGATGATGAAGATACCCCACCAAACCCAAAAAAGAG 50
ATCTCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGG 100
TCATATGGCCATGGAGGCCCGGGGATCCGAATTCGCGGCCGCTCGACC 150
AGGACATCAAGAACCAGGACCAAGTGGCCTCTACCATTGAGAGCTGCTAC 200
GAGCAGATTCGCTCCTTTGTGAACAAGGCCCTGGAGCAGGAGAACATGCC 250
TGCGCTGAGTGATGCCGACCAGGCGGCGCTCAAGAACCAGGTGCTTAAGC 300
TGGCCAACAAGACGTCGCCGGTGCCAGTTTGATGGCCAACGATTGGAT 350
GGCTATGTGCGGTAACTGCGCTCCAATGGCAGCATTCCGCCGCCGCC 400
CTCGGGATTCGCGGACTACCAAGAGGAGCTGGTTGCATTTATCGCCTCGT 450
TCCGTCGTCTGGTGTCTACAACCACGCCGTGTTCCGGGAGCACTTCCAC 500
CAGATACTCAACAAAACGCTGCCCGGCGAGGAAACGGAGGCTACCACTTC 550
CACGGCCAGTGGCATAAATCCTGGCCAGGCTCAGACTGCCAAGCCTTAGG 600
TGGATTTGTCTACCGTCTTAGGCAACACAAGATACCAGTATAACAACACTC 650
AGACACACCTGTAGGCGAACAACAGATCTGGCGGAGATCTGCATGATGTT 700
AGGGCAACCGGAGTGGCGGATAGCACCTTCCGTGTGGAGGAGGAGGG 747
  
```

Abb. 55: Sequenz des isolierten Fragmentes von CG16721

Die cDNA Fragmente von CG16721 wurde nur ansequenziert. Es ist ca. 750 Bp lang und startet bei Bp 1506 des Gens CG16721. In rot ist der Linker eingezeichnet.

7.11 Dip2

7.11.1 Expressionsprofil von Dip2

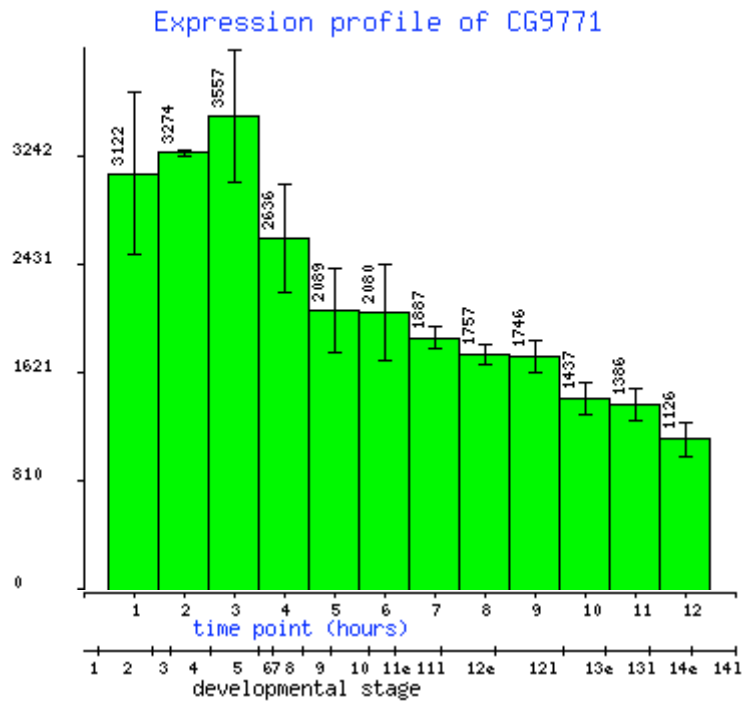


Abb. 56: Expressionsprofil des Gens Dip2

Dip2 ist vor allem Blastoderm Stadium exprimiert, mit einem Peak im Stadium 5.

7.11.2 Sequenz des isolierten Fragmentes von Dip2

```

CCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGC   50
TAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGCCCGGGGATCCGAATTCGCG   100
GCCGCGTCGACAAGATTCGTAATTATTTAAATTTATTTAAAATGGCGACA  150
AGGTCTTGTGCGTACAAGGACTGTGAATACTATTACGTAGGCCACGAAAA  200
CGCGCTGACCAAAGGAAGAACCCTGTTTGCCTTTCCCAAACAACCGCAA  250
GGGCGAGAATCTGGCACGAAAACGGCCAAGTGCATCCAAAGATTCCCCAT  300
AGCCAGCTTTTTATGTGCTCCCTTCACTTTGA                       332

```

Abb. 57: Sequenz des isolierten Fragmentes von Dip2

Die cDNA Fragmente von Dip2 wurde nur ansequenziert. Es ist ca. 330 Bp lang und startet bei Bp 1 des Gens Dip2. In rot ist der Linker eingezeichnet.

7.12 Lk6

Es wurde noch kein Expressionsmuster von Lk6 publiziert. Da jedoch schon eine Veröffentlichung über die Proteinverteilung von Lk6 während der Entwicklung des Embryos erschienen ist, wurde keine RNA *in situ* Hybridisierung von Lk6 durchgeführt.

7.12.1 Sequenz des isolierten Fragmentes von Lk6

```

AAGAGATCTCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTG 50
GGTGGTCATATGGCCATGGAGGCCCGGGGATCCGAATTCGCGGCCGCGT 100
CGACGCAATTGAAGATGATGATGTTAACTATTGGATAGTATTAGTGATT 150
TAAATGAAAAGCTACCTGAAATTTATGAGACTGCAAATATTGTTGTCAAC 200
TCAGCGGCAGTGCCAGCAGCATCGACACCAGCAGCATCAGCAACACGCC 250
ACCAACCGATAACCCAGAGGAAGATGATTCGAACGTGACCAAACCGACGA 300
CTACTGCTGAGGGGACAACAATGCAAACGACTTTTGGCATGTCAGCGGAA 350
GAGGAGAAGCCTGTAGCCCTATCCCACACCGCGGGTCACCACAGCAAGAC 400
CGGCCGCACTGTTAACTTTGCCCCCGATGCATATCAGAACGACGAGGATG 450
CCGATATCGACGAGGACGACGACTACGATGACGAGGAGAATCTGCATGAG 500
CACAGCAAGCAACAGCTGCCGTCCAATGCCTACACTCGTAAGCAGCGACA 550
GCAGCACC 558

```

Abb. 58: Sequenz des isolierten Fragmentes von Lk6

Die cDNA Fragmente von Lk6 wurde nur ansequenziert. Es ist ca. 560 Bp lang und startet bei Bp 2346 des Gens Lk6. In rot ist der Linker eingezeichnet.

7.13 Pp2A-29B

7.13.1 Expressionsmuster von Pp2A-29B

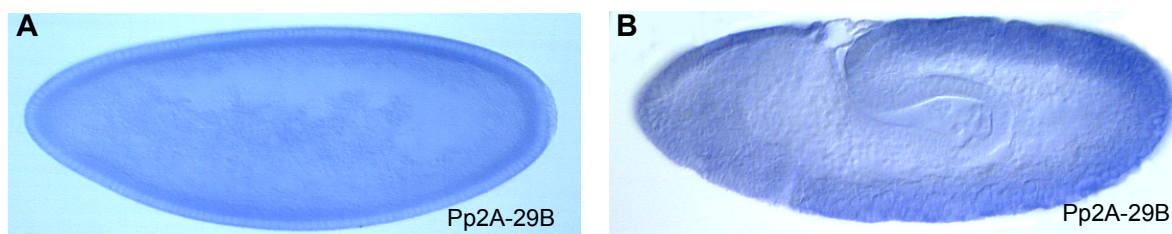


Abb. 59: Die Expressionsmuster des Gens Pp2A-29B

In situ Hybridisierung mit antisense RNA der Gene Pp2A-29B (A+B) und EG:807.5. Pp2A-29B RNA ist in den frühen Stadien der embryonalen Entwicklung (A, Stadium 5 und B, Stadium 9) in allen Zellen exprimiert.

7.13.2 Sequenz des isolierten Fragmentes von Pp2A-29B

```

GAATTCGCGGCCGCGTTCGACATCCAGCAACTGTCACAGTCGCTTCTGCCC 50
GCCATCGTCGAGCTGGCCGAGGACTCCAAGTGGCGTGTGCGTCTAGCCAT 100
CATCGAGTACATGCCTGCTCTGGCCGGTCAGTTGGGTCAGGAATTCCTTTG 150
ACCAAAAACCTGCGCGGTCTCTGCATGGGATGGCTCAACGATCACGTGTAC 200
GCCATTCGTGAGGCAGCCACCCTCAACATGAAGAAGCTCGTCGAGCAGTT 250
CGGAGCTCCCTGGGCCGAACAGGCCATAAATCCAATGATTCTGGTTATGT 300
CGCGCAACAAGAACTATTTGCACAGAATGACTTGCTTGTCTGCCTGAAT 350
GTTTTGGCAGAGGTCTGCGGCACAGATATCACCACCAAGTTGCTGCTGCC 400
CACAGTTCTCCTGCTTGCCGCTGATCCCGTTGCCAATGTTTCGTTTCAACG 450
TGGCAAAGACCCTGCAGAAGATCTCGCCCTTCCTGGAGGCCAGCGTCATT 500
GATGCCCAAGTAAAGCCCACACTCGACAAACTGAACACAGACACAGATGT 550
GGATGTCAAGCATTTTGGCTGCACAGGCCATTGCCGGCATAGCTGCAGCGT 600
AATCAACCTTCTTGCACTTTTTTTTATTCTATTTTTTAAAACGTATGTAT 650
TTAACGCCGGCAACAAAACATATTATGTAGCAACAACACTTAAGAACGGA 700
AAATTGTAGTGGATCCCGGAAGGTGTTAAACGCTGCAGCCGATGCTGGAT 750
GAGGGATGAATGGAGCCAGGAGTCAGAGGAAGGAGAGAATCGGAGAATCA 800
GCATGGGAGGAGACCCACTAAACGCGACACAACTAAACATTACTACTT 850
ACATACTTATATATATATAATAATTACCATAGGCATAACGATCATTATTAA 900
AAACATTTGTAGAGTTTGGAACATTTGATCGCATCTGAATGCAAAAATAA 950
AATTGTAGTGAACAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGAG 996

```

Abb. 60: Sequenz des isolierten Fragmentes von Pp2A-29B

Das cDNA Fragment von Pp2A-29B wurde durchsequenziert. Es ist ca. 1000 Bp lang und beinhaltet die Bp 1384 bis Bp 2330 des Gens Pp2A-29B-RB. In rot ist der Linker eingezeichnet und die blauen Buchstaben markieren die XhoI Schnittstelle.

7.13.3 Proteinsequenz der Pp2A-29B und Epitope für die Antikörper

```

    10      20      30      40      50      60
AASDKSVDDS LYPIA VLIDE LKNEDVQLRL NSIKKLSTIA LALGEERTRS ELIPFLTETI

    70      80      90      100     110     120
YDEDEVLLAL ADQLGNFTSL VGGPEFAMYL IPPLESLATV EETVVRDKAV ESLRTVAAEH

   130     140     150     160     170     180
SAQDLEIHVV PTLQRLVSGD WFTSRTSACG LFSVCYPRVT QPVKAELRAN FRKLCQDETP

   190     200     210     220     230     240
MVRRAAANKL GEFAKVVETE YLKSDLIPNF VQLAQDDQDS VRLLAVEACV TSAQLLPQDD

   250     260     270     280     290     300
VEHLVLPCLR QCASDSSWRV RYMVAEKFVD LQKAVGPEIT RVDLVPAFQY LLKDAAEAEVR

   310     320     330     340     350     360
AAVATKVKDF CANLDKVNQV QIILSSILPY VRDLVSDPNP HVKSALASVI MGLSPMLGAY

   370     380     390     400     410     420
QTVEQLLPLF LIQLKDECPE VRLNIISNLD CVNDVIGIQQ LSQSLLPAIV ELAEDSKWRV

```



```

      430      440      450      460      470      480
RLAII EYMPA LAGQLGQEFF DQKLRGLCMG WLNDHVVYAIR EAATLNMKKL VEQFGAPWAE

      490      500      510      520      530      540
QAIIPMILVM SRNKNYLHRM TCLFCLNVLA EVCGTDITTK LLLPTVLLLA ADPVANVRFN

      550      560      570      580      590
VAKTLQKISP FLEASVIDAQ VKPTLDKLNT DTDVDVKHFA AQAIAGIAAA

```

Abb. 61: Proteinsequenz von Pp2A-29B und die Epitope für die Antikörper

Die Sequenz wurde bei Swiss-Prot (<http://au.expasy.org/sprot/>) kopiert und enthält alle 590 AS des Pp2A-29B Proteins. In Lila unterlegt sind die beiden Peptide, die benutzt wurden um Antikörper gegen die Pp2A-29B herzustellen.

7.14 CaBP

7.14.1 Expressionsmuster von CaBP

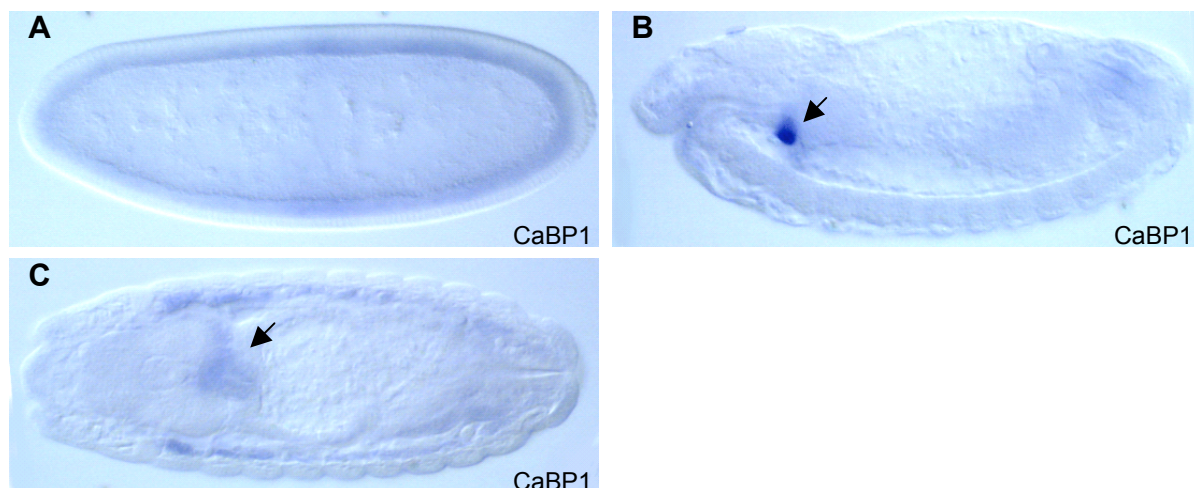


Abb. 62: Expressionsmuster des Gens CaBP1

In situ Hybridisierung mit antisense RNA des Gens CaBP1. In frühen Stadien zeigt CaBP1 ein ubiquitäres Expressionsmuster (A). Ab Stadium 14 sind nur noch die Garland Zellen (Pfeil, B und C) gefärbt.

7.14.2 Sequenz des isolierten Fragmentes von CaBP

```

CCCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATACGATGTT  50
CCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGCCCGGGGAT  100
CCGAATTCGCGGCCGCGTCGATCGCGGCCGCGTCGACCAGCACCCGAAC  150
CATCGAGATTATCAATGAATCGACTTTTGAACCTGCCTGCGAAGGAAAGC  200
CATTGTGCGTCGTGTCCGTTCTGCCACACATTCTCTACTGCGATGCCAAG  250
TGCCGCAACAAGTTCCTCGACACATTGCGCACCCCTGGGCGAGAAGTTCAA  300

```


GCAGAAGCAATGGGGCTGGGCCTGGGCAAAGGTGGCCAGCAGTTGGCC 349

Abb. 63: Sequenz des isolierten Fragmentes von CaBP

Die cDNA Fragmente von CaBP wurde nur ansequenziert. Es ist ca. 350 Bp lang und startet bei Bp 1017 des Gens CaBP. In rot ist der Linker eingezeichnet.

7.15 CG4759

7.15.1 Expressionsprofil von CG4759

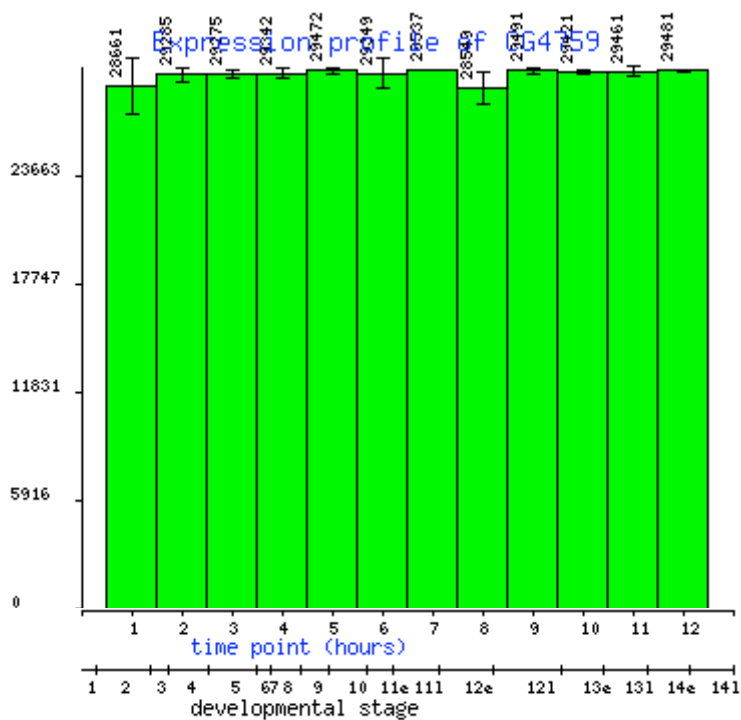


Abb. 64: Expressionsprofil des Gens CG4759

CG4759 ist während der ganzen Entwicklung sehr stark exprimiert.

7.15.2 Sequenz des isolierten Fragmentes von CG4759

```

CCCACCCAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATACGATGTTC 50
CAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGCCCGGGGATC 100
CGAATTTCGGGCCGGCTCGACTATCGATAAAAAGACGACGTTTTGCCATC 150
TCTAAAATCTCCCCTTCTTTTCTTTTCGCCGTTTCCGAGCAAACCGCCA 200
AGATGAGGAAAATCATGAAGCAGGGCAAGATCGTAATCGTCCTTAGCGGA 250
CGTTACGCCGGTCGCAAGGCCATCATCGTCAAGACCCACGACGATGGAAC 300
CCCGGAGAAGCCCTTCGGACACGCCCTCGTCGCCGGTATCGATCGCTACC 350
CGCGCAAGGTGACCAAGAAGATGGGCAAGAACAAGCTGAAGAAGAAGTCC 400
AAGGTCAAGCCCTTCTGAAGAGCCTGAACTACAATCATCTGATGCCAC 450
CCGCTACACGGCGCACGACATCAGCTTTGAGAAGCTGTGCCCAAGGACC 500
TGAAGGATCCCGTAAAGCGCAAGACGCACCGCTTCCAGACCCGCGTCAAG 550

```

```

TTCGAGTCCGTCTACAAGGAGGGCAAGAACAAGTGGTTCTTCCAGAAGCT 600
GCGTTTCTAAGCTGCCCATTCGCTACTTGTGGTTACTGGATTTGTCGCTC 650
TTTTTTAAGGTTTAATAAACAAGAAGTAATTCTGATAAAACTGACCGAA 700
GTGGATCCTGTGCCTTCTTATTAAGTGTGCAAGTGGGACAAACGTGCCTA 750
TGGTGATGAAAGTATATAGAATACTTTGAGTAGGAAGTGTACAAGAGGTA 800
TTTGGACCCAAGTCATCAACAAATTTCAAATATAAGGCAAAATATCAAA 850
TTCGCTTCTGGATCATTTTAAATATAGTGCAAATTCATAGCCTTAACC 900
GCCCCAATCCAAAACATAATA 921

```

Abb. 65: Sequenz des isolierten Fragmentes von CG4759

Die cDNA Fragmente von CG4759 wurde nur ansequenziert. Es ist ca. 920 Bp lang und beinhaltet die gesamte kodierende Region von CG4759. In rot ist der Linker eingezeichnet.

7.16 dib

7.16.1 Expressionsprofil von dib

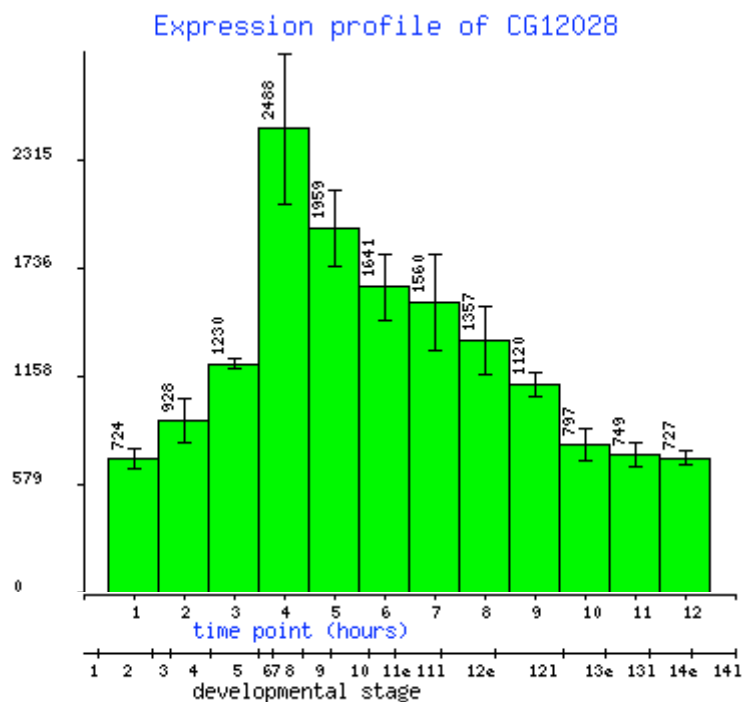


Abb. 66: Expressionsprofil des Gens dib

Das Expressionsprofil von dib zeigt ein Peak im Stadium 8 und danach eine mäßige Reduktion der Expression bis zum Stadium 10.

7.16.2 Sequenz des isolierten Fragmentes von dib

```

CCAAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGA 50
TTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGCCCGGGGATCCGAA 100

```

```

TTCGCGGCCGCGTCGACCACCAATAGCTGCATCCTGCCACAGATCAGGG 150
CCTCCAGCTGTGGCAGATTTCTGGAGACACCTAGCTTTCGCAAATAAGC 200
CAGGCCCAATCATATATGGAGGGTGTGGCCATGGAGTTAGTGGAGGAGAA 250
TGTTAGGAATGGTTCAGTGGGATCTTCACTGATCTCGGCTTATGTAATA 300
ATCCCGAGCTTGATCGCAGTGACGTGGTGGGCACCGCTGCAGATTTACTC 350
TTGGCTGGCATCGATAACCACTTCGTATGCCTCGGCATTTCTGCTCTATCA 400
CATAGCTCGAAATCCGGAGGTGCAGCAAAAACCTGCACGAGGAGGCCAAGA 450
GAGTGCTTCCGAGTGCCAAGGACGAGCTATCCATGGATGCCCTACGAACT 500
GATATCACCTATACGAGGGCTGTCCTCAAGGAATCACTACGCTTGAATCC 550
CATTGCCGTGGGCGTGGGCAGGATTCTTAATCAGGATG 588

```

Abb. 67: Sequenz des isolierten Fragmentes von dib

Die cDNA Fragmente von dib wurde nur ansequenziert. Es ist ca. 590 Bp lang und startet bei Bp 687 von dib. In rot ist der Linker eingezeichnet.

7.17 Ef1 α 48D

7.17.1 Expressionsprofil von Ef1 α 48D

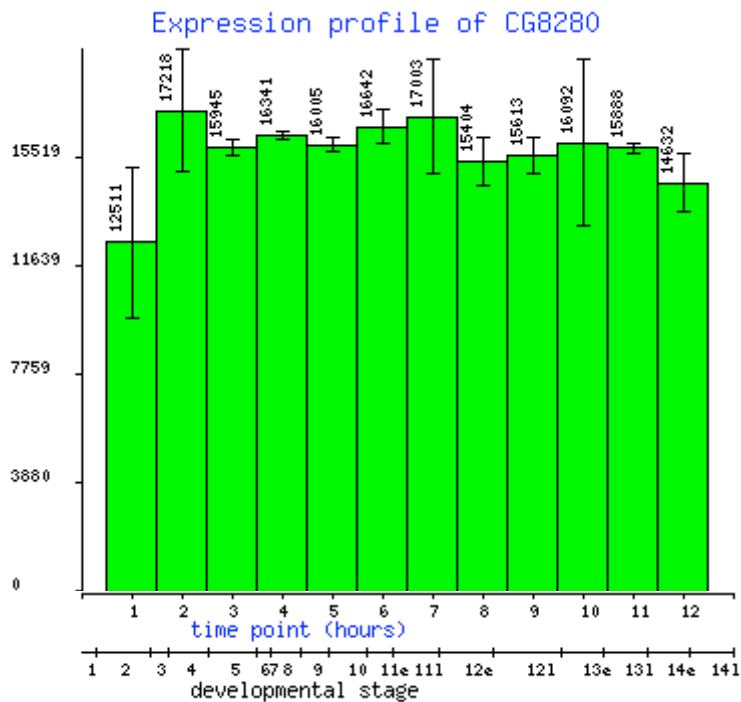


Abb. 68: Expressionsprofil des Gens Ef1 α 48D

Ef1 α 48D zeigt eine gleichmäßige, starke Expression während der ganzen Entwicklung des Embryos.

7.17.2 Sequenzen der isolierten Fragmente von Ef α 48D

Ef1 α 48D wurde zwei Mal isoliert. Ein Fragment, von ca.780 Bp (Fragment 1) und eine Fragment von ca. 630 Bp (Fragment 2).

Fragment 1:

```

CAAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGAT 50
TACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGCCCGGGGATCCGAAT 100
TCGGGGCCGCGTCGACCGCCGCTTAGACTTCGTGATTTCTCATCCAGCTT 150
ATTTCGAGACCATAGTGTAATCATCCAACATGGGCAAGGAAAAGATTACACA 200
TTAACATTGTCGTGATCGGACACGTCGATTCCGGTAAGTTCGACCACCACC 250
GGACACTTGATCTACAAGTGCAGTGGTATCGACAAGCGTACCATCGAGAA 300
GTTTCGAGAAGGAGGCCAGGAGATGGGAAAGGGATCCTTCAAGTACGCC 350
GGGTTTTGGATAAGTTGAAGGCTGAGCGCGAGCGTGGTATCACCATCGAT 400
ATCGCCCTGTGGAAGTTCGAAACTGCCAAGTACTACGTGACCATCATTGA 450
TGCCCCCGGACACAGGGATTTTCATCAAGAACATGATCACTGGTACCTCGC 500
AGGCCGATTGCGCCGTGCTGATTGTCGCCGCCGGAACCGGAGAATTTCGAG 550
GCCGGTATCTCGAAGAACGGCCAGACCCGCGAGCACGCCCTGCTCGCCTT 600
CACCCCTGGGTGTGAAGCAGCTGATCGTTGGTGTGAACAAGATGGACTCCT 650
CCGAGCCACCATACAGCGAGGCCCGTTATGAGGAAATCAAGAAGGAAGTG 700
TCCTCTTACATCAAGAAGATCGGCTACAACCCAGCCGCCGTTGCCTTCGT 750
GCCCATTTCCGGATGGCACGGCGACAACATGTTG 784

```

Fragment 2:

```

ANATATAACTATCTATTCGATGATGAAGNTACCCACCAAACCCAAAAAA 50
AGAGATCTCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGG 100
GTGGTCATATGGCCATGGAGGCCCGGGGATCCGAATTCGGGGCCGCGTC 150
GACGATAAGTTGAAGGCTGAGCGCGAGCGTGGTATCACCATCGATATCGC 200
CCTGTGGAAGTTCGAAACTGCCAAGTACTACGTGACCATCATTGATGCC 250
CCGGACACAGGGATTTTCATCAAGAACATGATCACTGGTACCTCGCAGGCC 300
GATTGCGCCGTGCTGATTGTCGCCGCCGGAACCGGAGAATTTCGAGGCCGG 350
TATCTCGAAGAACGGCCAGACCCGCGAGCACGCCCTGCTCGCCTTCACCC 400
TGGGTGTGAAGCAGCTGATCGTTGGTGTGAACAAGATGGACTCCTCCGAG 450
CCACCATACAGCGAGGCCCGTTATGAGGAAATCAAGAAGGAAGTGTCTC 500
TTACATCAAGAAGATCGGCTACAACCCAGCCGCCGTTGCCTTCGTGCCCA 550
TTTNCGGATGGCACGGCGACAACATGTTGGAACCCCTCTACCAACATGCC 600
TGTTCAAGGGATGGAAGGTGGAGCGCAG 629

```

Abb. 69: Sequenzen der isolierten Fragmente von Ef1 α 48D

Die cDNA Fragmente von Ef1 α 48D wurden nur ansequenziert. Fragment 1 ist ca. 780 Bp lang und startet bei Bp 52 von Ef1 α 48D. Fragment 2 ist ca. 630 Bp lang und startet bei Bp 287 von Ef1 α 48D. In rot ist der Linker eingezeichnet.

7.18 Domino-B

7.18.1 Expressionsmuster von Domino-B

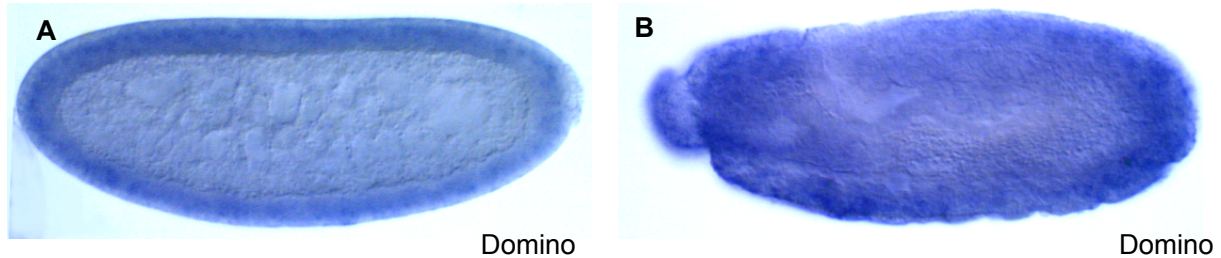


Abb. 70: Das Expressionsmuster des Gens domino

In situ Hybridisierung mit antisense RNA des Gens domino (A+B). Das Gene domino ist während der ganzen embryonalen Entwicklung in allen Zellen exprimiert (Stadium 5 (A) und Stadium 12 (B)).

7.18.2 Sequenz des isolierten Fragmentes von Domino-B

```

CTATTCGATGATGAAGAACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTCTATG 50
GCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGC 100
CATGGAGGCCCCGGGGATCCGAATTCGCGGCCGCGTCGACGCAAAAAGTAA 150
CAGCACGAAGTCAACGGGGAAGGGAACAGACGCCGCACCGCAAGTTCGGC 200
GGCAGACCCGTCTCCACTCTCTGGGCGCAGTCAATATGGCCAGCGCCCGA 250
ACACCGCCCCTAGAAAAGACAACACGTACAGCTCTGGCTGCATCTGCAGC 300
TGCATCTACTTTAGAGGATGCCTCTTTGATCGTCGAGGAGCGTCCCAAAA 350
GACAGTCGGCCAACATAGCTATGAGCAAGATGATGAAGACGCCCTTCAA 400
CAGAATGTTCCATCCAACATCAGTATAAAGACAACCTCCTCCTAAAAGGG 450
GCCAAGAGACAGTGTGTCAGCTGCCGCCACACGCAGTAAACTGCTGGAAA 500
GAAGAGCTACAATTGCTGCTCCTTTAAAACATATGGATGATGACAGTGAC 550
CAGGATGAAGAGGATCAGGAAGAGCAGGAGTCTGAAGAAGATACCGAGGG 600
CGAGGAAGCAAATGCCACTGTAGACGACGACGAGGAGGGGGAGGAGGAGT 650
TGGCGTCACTTGACGAAGAGACCATACAAACCGGATCGCAAACAAATGAT 700
GAAGAAGACGATGACGAGGAAGAAGTTGGTGAAGAGGAA 739

```

Abb. 71: Sequenz des isolierten Fragmentes von domino-B

Die cDNA Fragmente von domino-B wurde nur ansequenziert. Es ist ca. 740 Bp lang und startet bei Bp 6453 von domino-B. In rot ist der Linker eingezeichnet.

7.19 CG9253

7.19.1 Expressionsmuster von CG9253

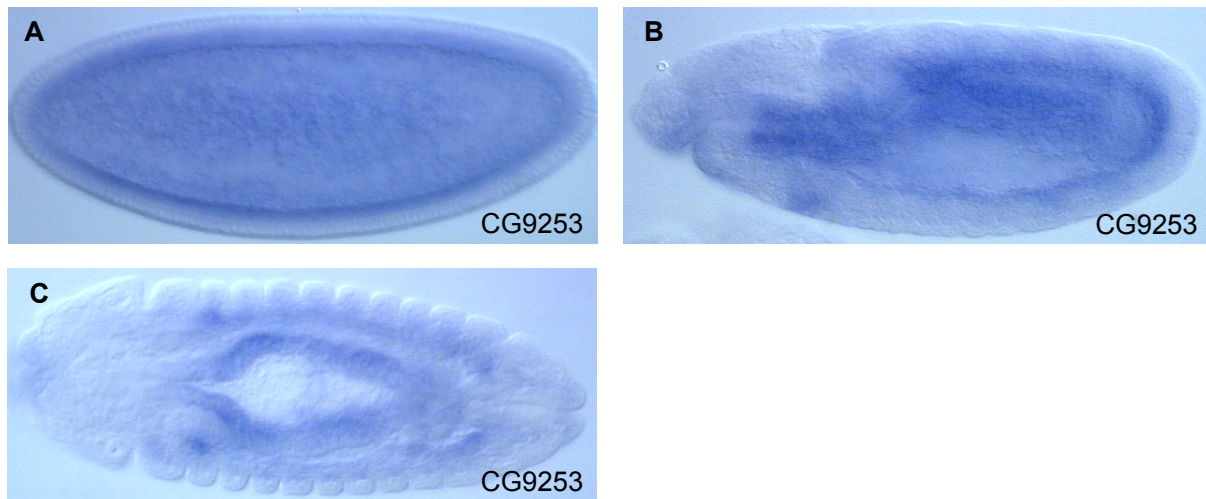


Abb. 72: Das Expressionsmuster des Gens CG9253

In situ Hybridisierung mit antisense RNA des Gens CG9253 (A-C). CG9253 in im Blastodermstadium (A) basal in allen Zellen exprimiert, später beschränkt sich die Expression auf das Mesoderm (B, Stadium 11) und Muskelzellen (C, Stadium 14).

7.19.2 Sequenz des isolierten Fragmentes von CG9253

```

ACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATACGATGT 50
TCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGCCCGGGGA 100
TCCGAATTCGCGGCCGCGTTCGACTTGAGGACGAACAGACGCAGCTACAAA 150
CGAGTGACGAAGAGGAGGATCTAGGTAGCGAGGAGGAGCAGGAAGATGAA 200
GATAACAATCATAAGGAAGGGGACAGCGAGGCGGCACTAAGTGGTGAAGA 250
TGATAAAGGCTCCGAGGACGACGCAGCCGAGGAACAGAAGCTAACCTGGA 300
AAGATCTCGGTCTCAATGAGGCTTTGTGTCAAGCATGTGACGAATTGAAG 350
TGGAAGGCGCCTTCGAAGATCCAACGTGAGGCCATTCCGGTCGCCTTACA 400
GGGCAAGGATGTAATTGGCCTGGCGGAGACCGGTTCCGGCAAGACGGGCG 450
CCTTCGCTCTGCCAATTTTACACGCCCTTCTCGAGAATCCGCAGCGGTAT 500
TTTGCCCTCGTGCTAACCCACGAGGGAAGTGGCATTTCAAATTGGCGA 550
GCAGTTTGAAGCCCTTGGTAGCGGGATTGGCATAAAGT 588

```

Abb. 73: Sequenz des isolierten Fragmentes von CG9253

Die cDNA Fragmente von CG9253 wurde nur ansequenziert. Es ist ca. 590 Bp lang und startet bei Bp 90 von CG9253. In rot ist der Linker eingezeichnet.

7.20 CG6755

7.20.1 Expressionsmuster von CG6755

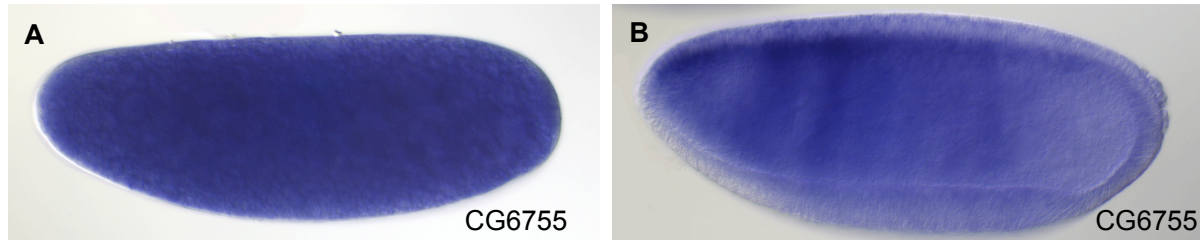


Abb.74: Das Expressionsmuster des Gens CG6755

RNA *in situ* Hybridisierung des Gens CG6755 (A+B). CG6755 ist schon maternal stark exprimiert (A) und bleibt auch im Blastoderm Stadium vorhanden, wobei nur ein Teil der Zellen gefärbt sind (B). Später kann nur noch eine schwache Expression beobachtet werden.

Dieses Experiment wurde von Berkeley Drosophila Genom Projekt (BDGP) durchgeführt.

7.20.2 Sequenz des isolierten Fragmentes von CG6755

```

CCAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGAT 50
TACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGCCCGGGGATCCGAAT 100
TCGCGGCCGCGTTCGACTATCGATAAAAAGACGACGTTTTTGCCATCAGAAG 150
GAAGCTAAGGAGCACAAAGAAAAGAAGTCAAATGGCGAGCACAAAGTCAA 200
GGATTCCAGCAAATCCAGCAGCAGTCACAAGAGCAGCAAATCCGAGAGCC 250
ACAAGAGCGAACACACCAAAAAGCAAGCACGAAAAGGACAAAACCTTCTCAC 300
AGTGAATTAAGGAAGTCAAAGACAAGTCGAGCAAACACAAATCATCGTC 350
CTCCAAGTCATCAAAGCGCTCCCATAGTCCCCACGCCACGAGGAGGAGT 400
CCCAAAAAGCAAAGATACCAAAAAGTTAAATCGAAATCTGAGGAAGATTCC 450
GCTGATGGTTTTGACTCCAGCATGGGCGCAAATTTTGACGATGTTCTTGG 500
TCTGCTAAACATAACCATAAGTAGCAAGAAGAGCAGCAGCAACAGCAAGA 550
GCAAGTTTGTGCGCAAGCCAAGTGCAGCCCCTTCCTCGTCAGCTCTATCA 600
GCACCTACGACTGCTGGGTCATCTAAAGAGGCA 633

```

Abb. 75: Sequenz des isolierten Fragmentes von CG6755

Die cDNA Fragmente von CG6755 wurde nur ansequenziert. Es ist ca. 630 Bp lang und startet bei Bp 759 von CG6755. In rot ist der Linker eingezeichnet.

7.21 Nnp-1

7.21.1 Expressionsmuster von Nnp-1

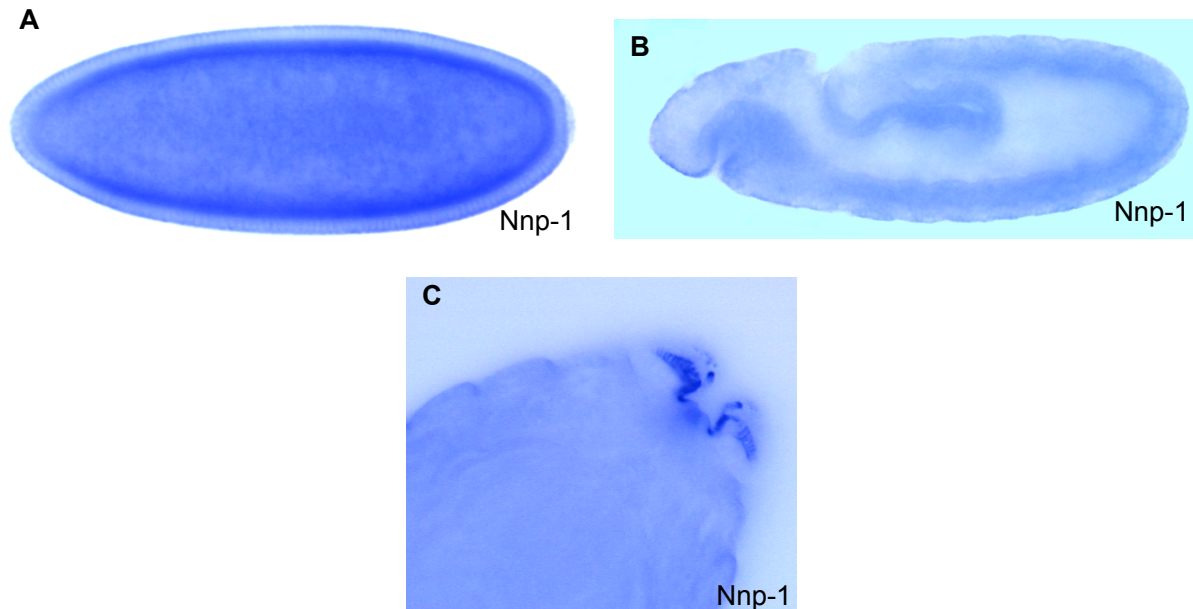


Abb. 76: Das Expressionsmuster des Gens Nnp-1

In situ Hybridisierung mit antisense RNA des Gens Nnp-1 (A-C). Nnp-1 ist in den Stadien 5-10 (A+B) in allen Zellen und in späteren Stadien verstärkt in den Sinnesorganen des Kopfes (C, Stadium 17, dorsale Ansicht) exprimiert.

7.21.2 Sequenz des isolierten Fragmentes von Nnp-1

```

CGATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTT 50
ACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATG 100
GAGGCCCGGGGATCCGAATTCGCGGCCGCTCGACGAGGATCAACCGAC 150
CTTGAAGGCAGAGAAGGAAGAGCCTGCGAAGCGCAAGAAATTGGACCACT 200
CCAAGACCAAGGAGGAGCAGTCCAAGCCGAAGACAGACGAGCAGCCCAAG 250
CCCACACCTAAGGTGGAGGGACAGTCCAAGGCCAAGCCGACTCCCAAAC 300
GAAGGCTGCCGGTGTGATGATGATGCTCCGACCAACGGATGGGATGCC 350
CTTTAGAGGACGGTGAGCAGGACATCTTTGTTCCCTCTCGAAAAGTCAA 400
GTGAAGCAGGCCAACAGTAAGCTGCCGAGTCCACACCCAAACAGCCTGC 450
GCGCGCAGAGTTTGCGACTCCACAAACGGGCAGTGGCAAGCATGTGCGGA 500
TCGTGACTAAGAGCAACTGCATCTACCCCAAGAGCGATTACTACCGCCAG 550
CTGAAGCTGTCTCCGCAGGTGCCCTACGACGCGAATCGGTTGCCCGGTAA 600
GAGTGCCCTTAAGCCACACTGGATACCGGGACCGATTTCATCCGAGCTACA 650
AGGCCAAGCGCTTGTTCACGACACTCTGTGACAAAGCGTCTAGTGCCAG 700
CGACTGGGATTGAGACAGGATGAGGAAGATTAATTTGGACTTAGTGCTCT 750
GAGGGACGATGAAGAAGGGGAGCGCTTCGCATCATACTACTTTCCTTATA 800

```


AGGCAGTATAAGATAACACATCCACAATAGGCATGTCTTATGCTGGTTTT 850
 ATAATACGTCTATAACACACGAAAGTTTCCATGCTAT 886

Abb. 77: Sequenz des isolierten Fragmentes von Nnp-1

Die cDNA Fragmente von Nnp-1 wurde nur ansequenziert. Es ist ca. 890 Bp lang und startet bei Bp 1631 von Nnp-1. In rot ist der Linker eingezeichnet.

7.22 zf30C

7.22.1 Expressionsmuster von zf30C

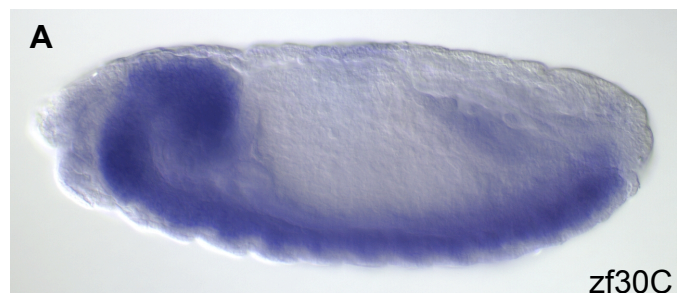


Abb. 78: Das Expressionsmuster des Gens zf30C

RNA *in situ* Hybridisierung des Gens zf30C (A). zf30C wird maternal exprimiert. Die zygotische Expression beschränkt sich auf das zentrale Nervensystem (A, Stadium 14).

Dieses Experiment wurde von Berkeley Drosophila Genom Projekt (BDGP) durchgeführt.

7.22.2 Sequenz des isolierten Fragmentes von zf30C

TGATGAAGATACCCACCCCAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACC 50
 CATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAG 100
 GCCCCGGGGATCCGAATTCGCGGCCGCGTTCGACGGCAAGCTGACTTTCAA 150
 GTGCCCATGCTACTGCAACCTCTTCTTCGCCACCAAGGAACAGGCCACTG 200
 AGCATGCTAGGGCCAGCACAAGGAAGTCTACTGCGAAAAATGCGAC 250
 AAGTACATGACCGGACACGACAGCCTCAAGAACCACGAACGCAATTTCCA 300
 CTCGAAGAAGGAGCCGCGCAGCCAGCAGCGCAACCTCATCTGCGACAAGT 350
 GCGGCAAGAAGTTCACCGGACGCACATCGCTCTCTGACCACGTTTCGTTCT 400
 GACTGCGGCCGTCTACCGCTCTACGGCTGCAGCGTTTGCGGCAAACATTT 450
 GTCCACCGCTGGTATTCTCAAGACGCACATGCTCCTTCACAAGGCAGACA 500
 CTCCGTACCAGTGCATAAGTGCAGCAAACATTCAAGGTGAAGGCGCAA 550
 TACAAGTCGCACTTGAAGACGCGCCACACGGACTACAAGCCGTACAAGTG 600
 CCACCTGTGTCCAAGGAGTATCCGTACAGGGAGAGTCTGCTCACCCACA 650
 TGACCGTGCACACGGGCATTAAGCGTTTTCCTGTGCAATAACTGCGGCAAG 700
 CGCTTCACTTGCATCTCCAACCTGCAGGCACATCGCAAGGTGCATGCCGA 750

TACCTGCGGCCAGTTGCCTTTGAATGCCAGGCCACCCAGTACATGGGCGT 800
G 801

Abb. 79: Sequenz des isolierten Fragmentes von zf30C

Die cDNA Fragmente von zf30C wurde nur ansequenziert. Es ist ca. 800 Bp lang und startet bei Bp 1841 von zf30C. In rot ist der Linker eingezeichnet.

7.23 ash1

Es ist kein Expressionsmuster von ash1 publiziert worden.

7.23.1 Sequenz des isolierten Fragmentes von ash1

GATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTA 50
CCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGG 100
AGGCCCCGGGGATCCGAATTCGCGGCCGCGTTCGACAAGACGGCAAGGTTTC 150
TTCTCAAAGGCCAAGGCCAACCATCCAGCCTGCACCAAGAGCTATGCCTT 200
CAGAAAATTTCCCGAGAAGATTAAGATCTCCAAGAGCTATGCGCCCCATG 250
ATGTGGATCCGTCGTTGCTGAAGACAAGGAAGCAAAGACTGAATTAGAC 300
GTAGGAGCCGGGCCAACACGATGCACAAGGTGTCTGGCAGGCAGGAACA 350
GC 356

Abb. 80: Sequenz des isolierten Fragmentes von ash1

Die cDNA Fragmente von ash1 wurde nur ansequenziert. Es ist ca. 350 Bp lang und startet bei Bp 6559 von ash1. In rot ist der Linker eingezeichnet.

7.24 CG11844

7.24.1 Expressionsmuster von CG11844

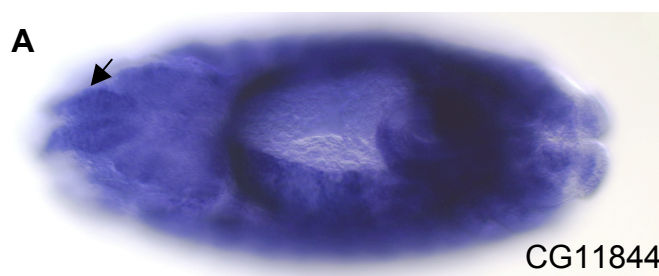


Abb. 81: Das Expressionsmuster des Gens CG11844

RNA *in situ* Hybridisierung des Gens CG11844 (A). CG11844 ist schon maternal stark exprimiert. AB Stadium 13 kann eine starke Färbung beobachtet werden, die nicht zugeordnet werden kann (A), mit Ausnahme einer Färbung des Sinnesorganssystems im Kopf (A, Pfeil).

Dieses Experiment wurde von Berkeley Drosophila Genom Projekt (BDGP) durchgeführt.

7.24.2 Sequenz des isolierten Fragmentes von CG11844

```

AAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGC 50
TTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGCCCGGGGATCCGAATTCGCGGCCG 100
CGTCGACCGCGTCCGTACCGGCGAGAAGTTCGGAAAGCGCGAGTTCGATC 150
GCCAGTCGGGATCCGATAGAACTGGCGTCAAGTCAATTGACAAGCGCGAA 200
GGCGGTGGTGCCACAACCTGGGGCTCCCCGAAGCAGGACATTGAGGACTT 250
AAAGACGACCGGGGAGACCTCACCGCAGGCGGAAAAGGAGGACTCGGCCA 300
ACGAACAGTCGGCTGATCCCGCGGTCGCCGCCGAAGAGGATGAGTCCAAG 350
CAGATGACCCTTGACGAGTGGAAGGCTTTGAGAGACCAGCGTGCCAAGCC 400
CAACTACAATTTGCGCAAAGCGGGCGAGGGAGCCGCCGACAATGCCGAGT 450
GGAAGAAGATGATCGTGCTGAGCAAGAAGAAGGAGAGCAACAGCGAAGAC 500
GAGTTGGAGTATGATCCATCGCTGTATCCTCAGCGCGTGGGCCGCCTTCA 550
GCGCATCGTGGACATCCAGTTCAACTTCAATGATGGACGCAAGGTCGGAT 600
TCCGCAAGGGACCTCGCCCCGGAGCCGGTCCTCGCGAGGGTGGCTTCCGC 650
AATGACGGACCTCGCGGAGAAGGTGGCTATCGCAATGACGGACCTCGCGG 700
AGAAGGTGGTTATCGCAACGACGGACCTCGCGGAGAGGGTCCACGCAATG 750
AGGGACGC 758

```

Abb. 82: Sequenz des isolierten Fragmentes von CG11844

Die cDNA Fragmente von CG11844 wurde nur ansequenziert. Es ist ca. 760 Bp lang und startet bei Bp 437 von CG11844. In rot ist der Linker eingezeichnet.

7.25 Lilliputian (lilli)

Es sind keine Expressionsdaten von der lilliputian RNA veröffentlicht worden.

7.25.1 Sequenz des isolierten Fragmentes von lilli

```

AAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATT 50
ACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGCCCGGGGATCCGAATT 100
CGCGGCCGCGTCCGACAGCCATCAGCTCCACAGGCGCCACCTGCAGCACC 150
TGCCGCCATAATGGCCAAGCCCCGGATGACACCCACTCAGCAACAGCAGC 200
TGGGAGCCGGACTGGCCTCGCCAGCGAGGACAACAACGCCACATCTAACC 250
TCCTTGATATGCAAGATCGATCTAAGCAAGCTTTCGCGAGAGCGCATTAT 300
GCGACTGAAGAACTAACACCCGCCAGCAGAATGGCCATCTGACGCCCA 350
AGGATCAGGCGACGAATGCGGTTTCATGTGCCCAATGGCTATGCCGGCGAC 400
ACAAATCCCGCGGCGAAGGTCAAGCACGAGCATCCGGTGAAACCGGAGCC 450
CGAGCTGGACGCCGGCTACGAGGCCAAATTCAGCCCGGCAATGTCAAGC 500
AGGAGTTCAGCTAAAGCAGGAACGAGATCGTGACAGGGAGCGAGAACGA 550
GAGCGGGAACGAGAACGTGAGCGGGATCGTGAGCGTGAGCAACCTCCTGG 600

```

```

GCGACGGCGGAAACGCAGCTCCAGTTCAGCTCCAGTCCGTACAAGGAGA 650
AGAAGCGGAAAAAGGAGAAGGCCGACCAGCTACAGATGGGCAAGGAACTG 700
TTGCCAGTGCCCGTGCTTCTGCCCTCTAACAACCACGAGCGAATGC      746

```

Abb. 83: Sequenz des isolierten Fragmentes von lilli

Die cDNA Fragmente von lilli wurde nur ansequenziert. Es ist ca. 750 Bp lang und startet bei Bp 4733 von lilli. In rot ist der Linker eingezeichnet.

7.26 hunchback (hb)

7.26.1 Expressionsmuster von hb

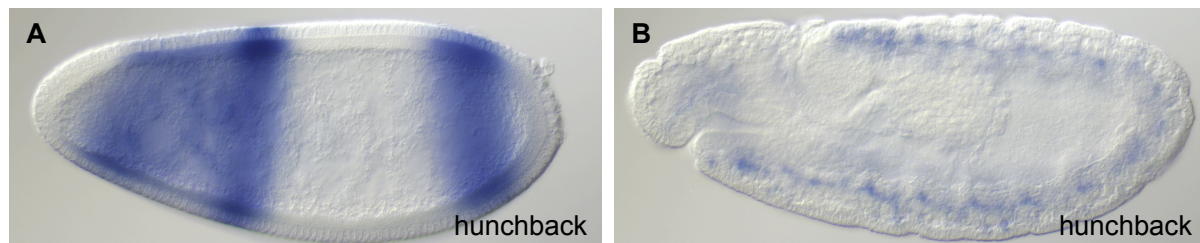


Abb.84: Das Expressionsmuster von hunchback (hb)

RNA *in situ* Hybridisierung von hunchback (A+B). hb wird maternal exprimiert und ist im Blastodermstadium in Streifen zu sehen (A). Ab Stadium 10 kann eine schwache Expression im den NB beobachtet werden (B).

Dieses Experiment wurde vom Berkeley Drosophila Genom Projekt (BDGP) durchgeführt.

7.26.2 Sequenz des isolierten Fragmentes von hb

```

GATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTA 50
CCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGG 100
AGGCCCGGGGATCCGAATTCGGGGCCGCGTCCGACCGCCAGTGAAGGAGG 150
ATGAGCAGCAGCAACAACCGCAGCAGCCGCTGGCCATGAATCTCAAGGTG 200
GAGGAGGAGGCCACGCCTCTGATGAGCAGCTCGAATGCCTCGAGACGCAA 250
GGGACGCGTCTCAAGCTGGACACCCTGTTACAACCTGCGATCGGAGGCCA 300
TGACATCTCCCGAGCAACTGAAAGTACCCAGCACACCCATGCCAACTGCA 350
TCCTCGCCCATTTGCCGGACGCAAACCCATGCCCGAGGAGCACTGCTCGGG 400
CACCAGTTCCGGCAGATGAGTCGATGGAGACGGCCCATGTGCCGCAGGCCA 450
ATACCAGTGCCAGTTCGACGGCGTCCAGCTCGGGGAACAGCTCCAATGCC 500
AGCAGCAATAGCAACGGCAACAGCAGCAGCAATTCCAGCAGCAATGGAAC 550
CACCTCAGCGGTTGCAGCTCCTCCATCCGGAACCTCCGGCGGCGGGGTG 600
CCATCTACGAGTGCAAGTACTGTGATATCTTCTTCAAGGACGCCGTGCTC 650
TACACCATTACATGGGCTACCACAGCTGCGACGATGTGTTCAAGTGCAC 700
ATGTGCGGCGAGAAGTGCGACGGACCCGTCGGCCTCTTCGTTACATGGC 750

```

```
CAGGAATGCTCACTCCTAAGTTCCCCATCACCATCACCTTGGTATTATTA 800
TTTATCACTATTATCATATAATCGTTGTCCAGAATTGTATATATTCGTAG 850
CATAAGTTT 859
```

Abb. 85: Sequenz des isolierten Fragmentes von hb

Die cDNA Fragmente von hb wurde nur ansequenziert. Es ist ca. 860 Bp lang und startet bei Bp 2154 von hb. In rot ist der Linker eingezeichnet.

7.27 Bx42

7.27.1 Expressionsprofil von Bx42

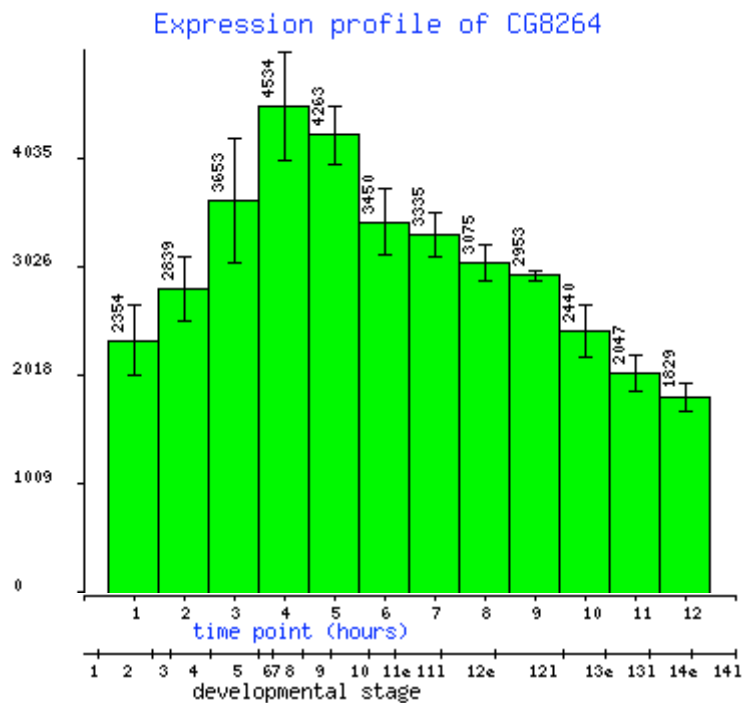


Abb. 86: Expressionsprofil des Gens Bx42

Bx42 ist während der gesamten Entwicklung exprimiert, wobei die Expression im Stadium 7-8 am stärksten ist.

7.27.2 Sequenzen der isolierten Fragmente von Bx42

Bx42 wurde zwei Mal isoliert. Ein Fragment, von ca. 410 Bp (Fragment 1) und ein Fragment von ca. 490 Bp (Fragment 2).

Fragment 1:

```
GATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATACGA 50
TGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGCCCGG 100
```

```

GGATCCGAATTCGCGGCCGCGTCGACGCGATCTGGGATCGGGAGGACGAG 150
CGTTCGCCTGGTTCGCCC GCGGAGCACCAAAGATCGGAGCCCTGGTCTCCGC 200
CAAAATCGCTGCTCCGCCGTACGGACAGCGCAAGGATTGGGTACCACATA 250
CGGATGCGGACTTTGGCGATGGCGGCGCCTTCCC GGAGATCCATGTGGCG 300
CAATATCCACTAGGTCTGGGAGCACCAAGAAATGTTGGCAAGAAGTCGGA 350
TGCTCTGGCCGTTTCGCCTGCCACGACAAGGGAAAGGTTAAATACGATGCC 400
ATAGCACGCCAA 412

```

Fragment 2:

```

TGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACC 50
CATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAG 100
GCCCCGGGGATCCGAATTCGCGGCCGCGTCGACAAGCAGCGTGTTCATCCG 150
GATGGTGGAGGCGCAGCTCGATCCGATGGAGCCGCCCAAGTTCCGCATTA 200
ACAAAAAGATTCCACGAGGTCCACCATCGCCGCCGGCACCTGTCTCCAC 250
TCACCATCGCGCAAGGTGACGGTCAAGGAGCAAAAGGAGTGAAGATCCC 300
GCCCTGCATATCGAACTGGAAGAACGCCAAAGGTTACACCATTCCACTGG 350
ACAAGCGTCTGGCAGCCGATGGACGCGGTCTGCAGCAGGTGCACATCAAC 400
GAGAAGTTCGCCAAGATGGCCGAGGCGCTGTACATAGCCGATCGCAAGGC 450
GCGCGAGGCGGTGGAGGCACGCTCCCAGCTGGAAAAG 487

```

Abb. 87: Sequenzen der isolierten Fragmente von Bx42

Die cDNA Fragmente von Bx42 wurden nur ansequenziert. Fragment 1 ist ca. 410 Bp lang und startet bei Bp 192 von Bx42. Fragment 2 ist ca. 490 Bp lang und startet bei Bp 741 von Bx42. In rot ist der Linker eingezeichnet.

7.27.3 Proteinsequenz von Bx42 und Epitope für die Antikörper

```

10      20      30      40      50      60
MSLSLLPTP TNAIWDREDE RRLVARGAPK IGALVSAKIA APPYGQRKDW VPHTDADF GD

70      80      90      100     110     120
GGAFPEIHVA QYPLGLGAPG NVGKKS DALA VRLDDKGVK YDAIARQGHG KDKIVYSSIS

130     140     150     160     170     180
QLLPAEVLAE DADELQRPDE ETVMETTEET RLALEKLTNQ KITSALPVRH A QKAGPAQYI

190     200     210     220     230     240
RYTPSQQGD T FNSGAKQRVI RMVEAQLDPM EPPKFRINKK IPRGPPSPPA PVLHSPSRKV

250     260     270     280     290     300
TVKEQKEWKI PPCISNWKNA KGYTIPLDKR LAADGRGLQQ VHINEKFAKM AEALYIADRK

310     320     330     340     350     360
AREAVEARSQ LEKKLAQKEK EK KEDMLRMM AQRAREERAG LRNPEAAEPS GSGATGSEVR

370     380     390     400     410     420
ERNDLRAERQ RERQRDRNLQ RAAPEKRSKL QKERERDISE QIALGLPAKS AGNGETLFDQ

```

```

      430      440      450      460      470      480
RLFNTTTKGMD SGYGDDEAYN VYDKPWRDSN TLGAHIYRPS KQADSDNYGG DLDAIVNTKR

      490      500      510      520      530      540
FVPDKQFSGA SKEAAAGQRS GPVEFEKEED PFGLDQFLNM AKKAPKRAEE KNNERSSHSD

```

RKRSKRD

Abb. 88: Proteinsequenz von Bx42-PA und die Epitope für die Antikörper

Die Sequenz wurde bei Swiss-Prot (<http://au.expasy.org/sprot/>) kopiert und enthält alle 547 AS des Proteins Bx42. In Lila unterlegt sind die beiden Peptide, die benutzt wurden um Antikörper gegen Bx42 herzustellen.

7.28 CG1962

7.28.1 Expressionsmuster von CG1962

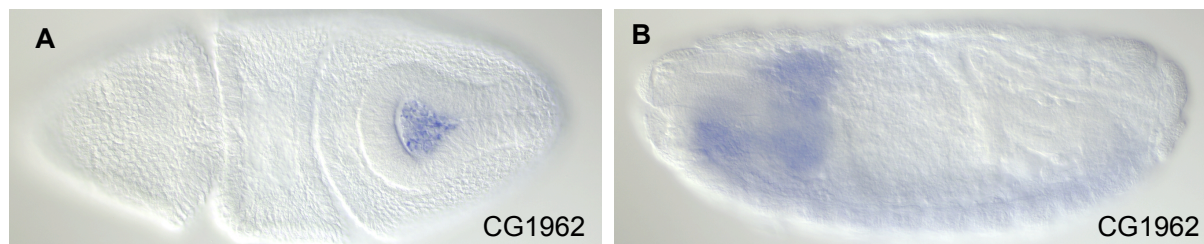


Abb. 89: Das Expressionsmuster des Gens CG1962

RNA *in situ* Hybridisierung des Gens CG1962 (A+B). Die Expression von CG1962 beschränkt sich in den Stadien 7-8 auf die Polzellen (A, dorsale Ansicht). In den Stadien 13-16 ist CG1962 im zentralen Nervensystem exprimiert (B).

Dieses Experiment wurde vom Berkeley Drosophila Genom Projekt (BDGP) durchgeführt.

7.28.2 Sequenzen der isolierten Fragmente von CG1962

CG1962 wurde zwei Mal isoliert. Ein Fragment, von ca.900 Bp (Fragment 1) und eine Fragment von ca. 870 Bp (Fragment 2).

Fragment 1:

```

GATGATGAAGATAACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTA 50
CCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGG 100
AGGCCCCGGGGATCCGAATTCGCGGCCGCGTCGACCTCAAGAAGGCAGCT 150
GATAATAACGAAGAAGACAAGCTTCCGTCCCTGCATGACGACGCACAGAT 200
AACAGAAAAATTACCCCTTGGTGGCGGCCAAAGTACCCCGGTAACACCCG 250
AAAGGGAGGAATCTCCAGATGACTTCATTGACGACACACAGAGCGTCGTA 300
TCCTCAGTTATATCCAACCAGTCCATTGCAATGTCCGAGTGCGTTACCAA 350
ACTGGAGCGGAAGACAGCCAAAAAACACATCTTTGATGTCCGAAACCAAC 400

```

```

AAAACCAATCGTCCCTAACGCAATCCACTTTGTTAAACAGCTCCTCGAAG 450
GAAACGACTGTCGGCGAACCGAATTATAAACCCATAAGGGAGAATGGCCA 500
GATACTTACTCCACTCAAGCGCGAACCCTCGAATATCTAACCGTAGGTG 550
TCGGAATTAAGAAGAAGAACCGACGAAAGCACCGAAACCAAAGCTCATCT 600
GGAGATCGCATCGAATTGTTTAACTCCCGGGAATTTACTCCCAGGAACAG 650
TCCTCTGGCCATGAACAACCGTGGTGGTGGACAAGGGAGCTCAAAGATGT 700
GTACGGATACATTGAATGCTGAATTCGGACGCAGTAACCGCAGACGGACA 750
CTCCATCCTCAAGCAACTGGAATGGCTCTCCCATGGTGTATCTATAACAAG 800
AATATGAATACTCCCCAACTTCTCGGGCCCGAGTATAGAGCTCAATGGC 850
GTCGAGTTTATCATAACACGGTATCGCAAGACTACATAACTTAAA      895

```

Fragment 2:

```

GATGAAGATACCCACCCAAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCC 50
ATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGG 100
CCCCGGGGATCCGAATTCGCGGCCGCGTTCGACGAAAAATTACCCTTGGTG 150
GCGGCCAAAGTACCCCGGTAACACCCGAAAGGGAGGAATCTCCAGATGA 200
CTTCATTGACGACACACAGAGCGTCGTATCCTCAGTTATATCCAACCAGT 250
CCATTGCAATGTCCGAGTGC GTTACCAAACCTGGAGCGGAAGACAGCCAAA 300
AAACACATCTTTGATGTCCGAAACCAACAAAACCAATCGTCCCTAACGCA 350
ATCCACTTTGTTAAACAGCTCCTCGAAGGAAACGACTGTCGGCGAACCGA 400
ATTATAAACCCATAAGGGAGAATGGCCAGATACTTACTCCACTCAAGCGC 450
GAACCACTCGAATATCTAACCCTAGGTGTGCGAATTAAGAAGAAGAACCG 500
ACGAAAGCACCGAAACCAAAGCTCATCTGGAGATCGCATCGAATTGTTTA 550
ACTCCCGGGAATTTACTCCCAGGAACAGTCCTCTGGCCATGAACAACCGT 600
GGTGGTGGACAAGGGAGCTCAAAGATGTGTACGGATACATTGAATGCTGA 650
ATTCGGACGCAGTAACCGCAGACGGACAACCTCCATCCTCAAGCAACTGGA 700
ATGGCTCTCCCATGGTGTATCTATAACAAGAATATGAATACTCCCCAACT 750
TCTCGGGGCCGAGTAATAGAGCTCAATGGCGTCGAGTTTATCATAACAC 800
GGTATCGCAAGACTTACATAAACTTAAAAAGTTAGACTTATCCTACGCCG 850
AATTTTGCGCCGGGCCGATGCCG      873

```

Abb. 90: Sequenzen der isolierten Fragmente von CG1962

Die cDNA Fragmente von CG1962 wurden nur ansequenziert. Fragment 1 ist ca. 900 Bp lang und startet bei Bp 1735 von CG1962. Fragment 2 ist ca. 870 Bp lang und startet bei Bp 1804 von CG1962. In rot ist der Linker eingezeichnet.

7.28.3 Proteinsequenz von CG1962 und Epitope für die Antikörper

```

      10           20           30           40           50           60
MEESNHGSAG CENVSQFMLD DLQLAAELGK TLLERNKELE TFIKEYKIKG DEQELEILHL

      70           80           90           100          110          120
RKHINAMTEV NDSRLKVYEQ LEVGIQDLER ANQRLNLEKN RDKKQIKTLT TNTEVLEARC

      130          140          150          160          170          180
EELSQLLSDA RQSLSTERRK VDQYQQERYR MQHSTEGSVS SHSIQSLCKE QSVEFSKLDV

      190          200          210          220          230          240
MAIANSTGLE DISFSNATMC ERTAVKGEDN EELVKLLSEM EVLKRDFLAE QQRCTELEEQ

      250          260          270          280          290          300
LVTIIQDNQG LQTRLLENSA NEGTMMSHEE FSLDDVVRQG QMCSRCLRDI NESNTNMDDQ

      310          320          330          340          350          360
SSIAPTEEIY EDDDRSILSE STSKCDNSGA DYKERFRIFE DLNPNSSDKP NPYRDLVEKY

      370          380          390          400          410          420
EALVEVKRTS NAVKSNFTSN PDGKTMTESS QGKKSETIVN SSKESDLMLD STRKRTPTEF

      430          440          450          460          470          480
SESETTSSGF SDETSNKSTQ TDERPSYFLC SISNGNDCKF SIYDDVSPIE SHFRNRPEYR

      490          500          510          520          530          540
ELFKEIFGVL KKAADNNEED KLPSLHDDAQ ITEKLPLVAA KVPPVTPERE ESPDDFIDDT

      550          560          570          580          590          600
QSVVSSVISN QSIAMSECVT KLERKTAKKH IFDVRNQQNQ SSLTQSTLLN SSSKETTIGE

      610          620          630          640          650          660
PNYKPIRENG QILTPLKREP LEYLTVGVGI KKKNRKHRN QSSSGDRIEL FNSREFTPRN

      670          680          690          700          710          720
SPLAMNRRGG GQGSSKMCCTD TLNAEFGRSN RRRTPSSSN WNGSPMVIYN KMNTPQTSR

      730          740          750          760          770          780
GRVIELNGVE FYHNTVSQDL HKLKKLDLSY AEVLRRADAG EHGPTRSHSQ RQOHNGANIR

      790
KSHHHQFRQK

```

Abb. 91: Proteinsequenz von CG1642-PA und die Epitope für die Antikörper

Die Sequenz wurde bei Swiss-Prot (<http://au.expasy.org/sprot/>) kopiert und enthält alle 790 AS des Proteins CG1942. In Lila unterlegt sind die beiden Peptide, die benutzt wurden um Antikörper gegen CG1942 herzustellen.

7.29 CG4294

7.29.1 Expressionsmuster von CG4294

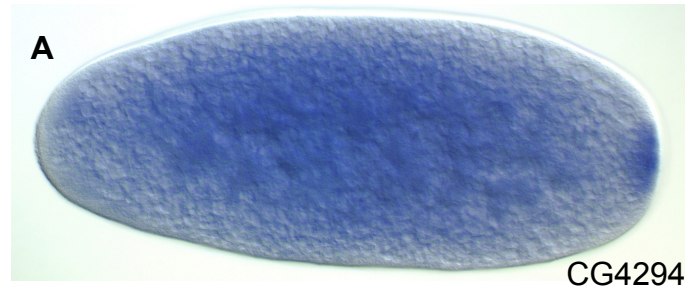


Abb.92: Das Expressionsmuster des Gens CG4294

RNA *in situ* Hybridisierung des Gens CG4294 (A). CG4294 wird laut Expressionsprofil während der ganzen Entwicklung exprimiert. BDGP zeigt aber nur, dass die Expression maternal ist (A).

Dieses Experiment wurde vom Berkeley Drosophila Genom Projekt (BDGP) durchgeführt.

7.29.2 Sequenz des isolierten Fragmentes von CG4294

```

GATCTCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTG 50
GTCATATGGCCATGGAGGCCCGGGGATCCGAATTCGCGGCCGCGTTCGAC 100
GTTAAGCACGGCGAATATTGTAAACAACCCAGCCAAGAAAGACCTAGGCA 150
GTACAACAAGTTCCCCTATGACCAACGATAAGGCTACCTCAGCAGTTCAG 200
AAACCACAAGTCAAAACTGCGAATTTAAAATCGGCAAAAACAAAACCTAA 250
GCAAAATCACCAGATGTCCAAGGAGACTCGGCTGAAGGCATTTGAGAATT 300
CTTTTGTAAAGATTGGGGGGAGCATGCTAATCAATCTAGACAAATCGCTG 350
GAATTGGTGAAGAAGCCAAGAAGTCAAAGGCAATACGCTTGCGATGCTC 400
ACAGCGTCTCAAGGAACTCTATGACGAAATGCAGACATTAAGGCAGGCGG 450
TTAAACAGGAGGAACTTAAGCTGTCGAAGATTCAGCCCGAGATTCAGGCC 500
AGCCATGAGATCATCATATCACTTAAGCAGAAACGACATAAACTCCATAC 550
GGCGGCTATGGACTTGGGCCGTGGATTAAGGGGCGATGACTACAGGTTAA 600
TCGACGAGGGAAAGGCAGCCATCACCGCCAAATCAACGCAGCTTACCAAG 650
GAGATACGCCTGTACAATTCTATAGTAAACTACGCAGACCTTACGAAACT 700
GACTGATGCGGAGATTAGTCAACAAAACACTGTA 734

```

Abb. 93: Sequenz des isolierten Fragmentes von CG4294

Die cDNA Fragmente von CG4294 wurde nur ansequenziert. Es ist ca. 730 Bp lang und startet bei Bp 2652 von CG4294. In rot ist der Linker eingezeichnet.

7.30 CG14989

7.30.1 Expressionsprofil von CG14989

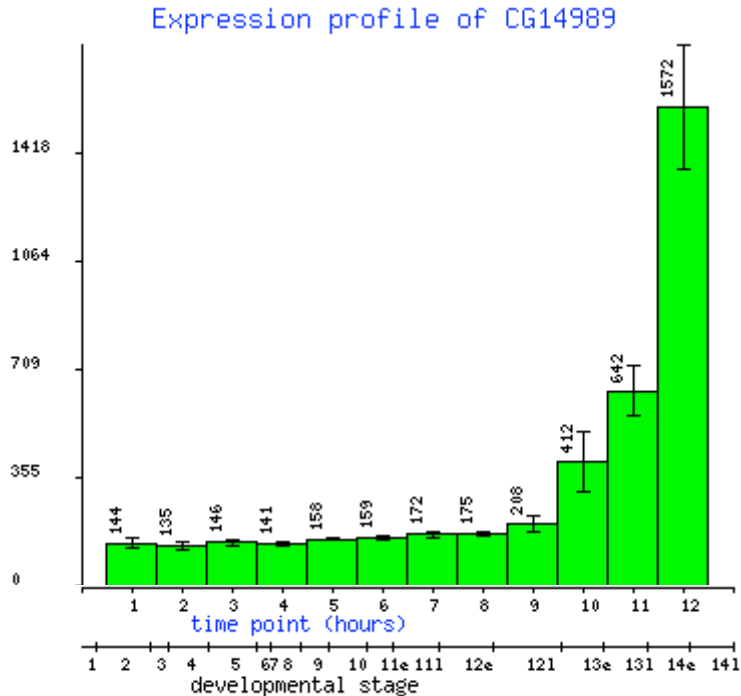


Abb. 94: Expressionsprofil des Gens CG14989

CG14989 wird erst ab dem frühen Stadium 13 exprimiert und steigt danach stark an.

7.30.2 Sequenz des isolierten Fragmentes von CG14989

```

GATGATGAAGATACCCACCCAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTA 50
CCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGG 100
AGGCCCGGGGATCCGAATTCGCGGCCGCGTCGACGCGGCCGCGTCGACG 150
AGGAGAAGGCCAGTGGAGTGCTGGGCGATCCAACACACGGTTCCAGAGCC 200
GCGGAGAATGCCGAACGGAGAGGGTCGATCGAGGAAGCAACAGTGTCCGC 250
AGCTACCGTGGCAGCCGCCTCGGATACGGACACAACCACTCCGGCTCCGG 300
ACTGGGACGAAGTGTGCAAGGTGCTCTGCAAGACTGGCGATGGCGGGTCT 350
TTGTGCAACTGTGATTTATCGCCGTTCTTCAGCTGAGCGATCCCCACCTT 400
CCTGAGGGGATCGCTCCCGATGGAGGCGCTAAATCACAAAACCATATATA 450
TGGATCGAGAATTATCTGATTATCTGATGTTTTGTTGTTCTTCGTTTTTG 500
AACTTCAGTTAGTGCTATTGTTGTCATGAAAAAGTATCTCCCATATATAA 550
TCTATATCGGAAAACGTGTTACGAAAGTTTAGTTAAATACTGTAAAGATA 600
TAAAAAACAAAACTATAGAAAAATCAAAAATCAAAAAAAAAAAAAAAAAA 650
AACTCGAGAGATCTATGAATCGTAGATACTGAAAAACCCCGCAAGTTCAC 700
TTCAACTGTGCATCGTGCACCATCTCAATTTCTTTCATTTATACATCGTT 750
TTGCCTTCTTTTATGTAACATACTCCTCTAAGTTTCAATCTTGGCCATG 800
TAACCTCTGATCTATAGAATTTTTAATGACTAGAAATTAATGCCCATCTTT 850

```

TTTTTGGACTAAATCTTCATGAAATATATTACGAGGCTTATTC

893

Abb. 95: Sequenz des isolierten Fragmentes von CG14989

Die cDNA Fragmente von CG14989 wurde nur ansequenziert. Es ist ca. 890 Bp lang und startet bei Bp 469 von CG14989. In rot ist der Linker eingezeichnet.

7.31 CG11164

7.31.1 Expressionsmuster von CG11164

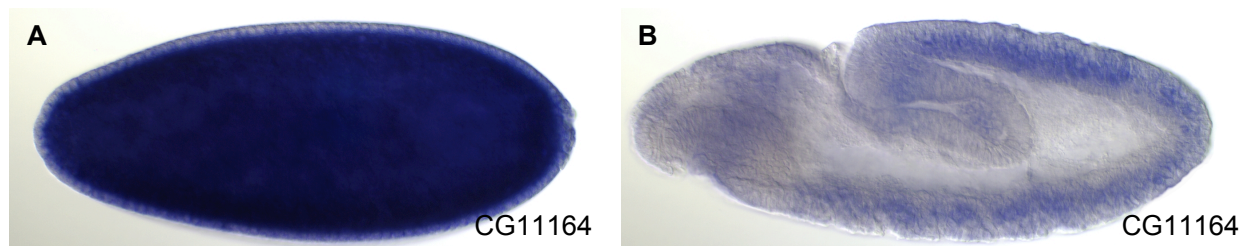


Abb. 96: Das Expressionsmuster des Gens CG11164

RNA *in situ* Hybridisierung des Gens CG11164 (A+B). CG11164 wird stark maternal exprimiert (A). Ab Stadium 11 kann eine Expression in den NB und den GMZ beobachtet werden (B).

Dieses Experiment wurde vom Berkeley Drosophila Genom Projekt (BDGP) durchgeführt.

7.31.2 Sequenz des isolierten Fragmentes von CG11164

```
GATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTA 50
CCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGG 100
AGGCCCGGGGATCCGAATTCGCGGCCGCGTCGACCCACAGTTATTGACT 150
TTTGCTTCACGCTTGGCAAGTTATTCGAGAAAATGGGCAAAAGGAAACG 200
CGAGCGAGAAAACCAAAGCTGATCCGGATGCGGAGGGATCTGCCAAGAT 250
GTGCAAGGCCTCGGCACTGAAGAAGGTGTTCTTCATGTTCGGAGGAACTGC 300
TGCCCAAAGATGCGGACGACGGACACCTTCGGCTGGAGATGTTTTTCCAT 350
CCCGGACATGGCAAGGAGGCACTGTTCATAACCCATCCCGATGGCAGAAT 400
GATGGAGCTGGTGGCGTTCACGGAACCCCGACGCAGTTGGTTCGTGGACA 450
GCGAGGTCTGCTCCAACGGCAGAATCTACATGACCGCGCCCGTGGATCCC 500
ACGTTCTCCTGGCTCTTCATCACCTCCGAAAACATTGTGCGCAAAGAGCAAT 550
ATCGCTGGACAACATTGCCGTGGAGGAGGCCAGCACCAGTCGTCTGCTTA 600
ACGAGATCCTCGACCCAGGGAACCTTAAATGCGTGGCAGATGTGAAGAGC 650
TCTGGCGAACAGAAGTTCTACAAGTACAACCAAGAGCGCACATTGGCTTG 700
GTTGGCTCTGAAGACGCGCCAGGTGGCGAAGATCCTGAAGGAGAAGCAAG 750
TCCACTGCGGCCACAGTGCGCAGTCGCAGAATTTTCGTGCGA 791
```

Abb. 97: Sequenz des isolierten Fragmentes von CG11164

Die cDNA Fragmente von CG11164 wurde nur ansequenziert. Es ist ca. 790 Bp lang und startet bei Bp 18 von CG11164. In rot ist der Linker eingezeichnet.

7.31.3 Proteinsequenz von CG11164 und Epitope für die Antikörper

```

      10      20      30      40      50      60
MGKKETRARK PKADPD AEGS AKMCKASALK KVFFMSEELL PKDADDGHLR LEMFFHHPGHG

      70      80      90     100     110     120
KEALFITHPD GRMMELVAFT EPRRSWFVDS EVCSNGRIYM TAPVDPTFLA LHHLRKHCAQ

     130     140     150     160     170     180
RAISLDNIAV EEASTSRLLN EILDPGNLKC VADVKS SGEQ KFYKYNQERT LAWLALKTRQ

     190     200     210     220     230     240
VAKILKEKQV HCGHSAQSQN FVRSEKLVAE NVSNEMDYTR MACDYVGRYL DADLHGLLTS

     250     260     270     280     290     300
YLHIPSEIQÄ IVEEKAASQK RKSVAGKNEG SDSKKIKLNE SDAAAKLKSS GLVDSGDGPN

     310     320     330     340
ATITSPTAAP LKERSLTAKE KALAKGAKGT KSIASFFKAK

```

Abb. 98: Proteinsequenz von CG11164-PA und die Epitope für die Antikörper

Die Sequenz wurde bei Swiss-Prot (<http://au.expasy.org/sprot/>) kopiert und enthält alle 340 AS des Proteins CG11164. In Lila unterlegt sind die beiden Peptide, die benutzt wurden um Antikörper gegen CG11164 herzustellen.

7.32 CG8230

7.32.1 Expressionsprofil von CG8230

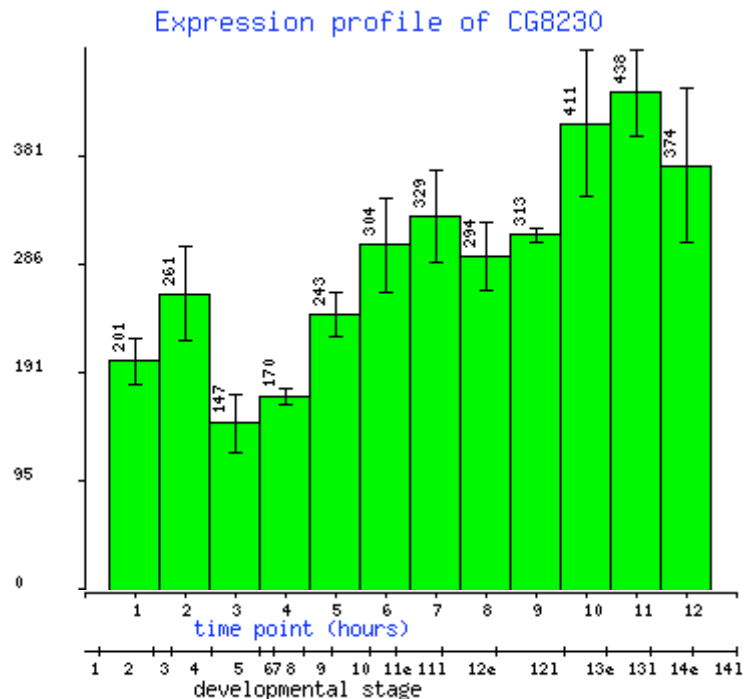


Abb. 99: Expressionsprofil des Gens CG8230

CG8230 ist während der gesamten Entwicklung exprimiert, wobei die Expression im Stadium 5 am schwächsten und in den Stadien 13-14 am höchsten ist.

7.32.2 Sequenz des isolierten Fragmentes von CG8230

```

TGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACC 50
CATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAG 100
GCCCCGGGGATCCGAATTCGCGGCCGCGTTCGACGGCCAACATGTCCGGCC 150
ACTTCCGCGCTCTACACCCTTACGTGGCACAGCGACTGGTCTCGCTGTTT 200
GAAACGCTCGCTCGGAAGCATAACGCGCCTGGATGCGCAGCTCAAGGAGCC 250
GGCCGATAGCGCAGTGTGGTGTGAACGTCTCGACGACCCCGGAAGACATGC 300
TACAAGATCTGAGCGTGCTGGAGGAGGTGTTGCGCATGGTGCTGGAAATC 350
CTAAACTCCTGCCTCACAAACCAGTTGGTCTACTGTCCCAACTTGGTGTA 400
TACTCTTTTGTACAAGCGCAGCGTCTTCGAGGGCTTCCGCAGTACCACG 450
CCTTCCAGGATGTCATCCAAAACATAGACATGGTTGTCGGTTTCTTCTCC 500
TCGCGTCTGCAGCGTGTCCAGGAGCAGAGAGGCGAGCTTGGGGTCAATGA 550
AGTGCTCGAGGTTATATCTAAAGGTGCCAGTCAGTGGTCCAGCGATCGAC 600
TGAGAAAGTTCCCGGATCTTAAGTTTAAGTACGTGAGGAGGACGCTCCC 650
GAGGAGTTCTTCATTCATATGTGTGGACGTTGGTCTGCAAGTACGGCTG 700
CGTGCACCTTCAGCTCGGAGAGCATCAAGAGCGTGACCACGGACATAGCCT 750
GCTAATATTTACTGCTCTATCCCTTCTCTCACGCACACACCCGGTCCGC 800

```

TTTGGTTCACATGTTTCGATGCTTCTCCGTTTGTCTTCTGTGCGGGATTA 850
 CCCGATCTTAAGCCATATACCACGCCCT 878

Abb. 100: Sequenz des isolierten Fragmentes von CG8230

Die cDNA Fragmente von CG8230 wurde nur ansequenziert. Es ist ca. 880 Bp lang und startet bei Bp 1569 von CG8230. In rot ist der Linker eingezeichnet.

7.33 CG10660

7.33.1 Expressionsmuster von CG10660

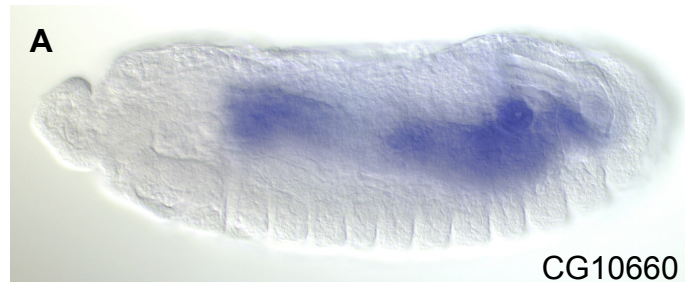


Abb.101: Das Expressionsmuster des Gens CG10660

RNA *in situ* Hybridisierung des Gens CG10660 (A). CG10660 wird in den Stadien 13-16 im Mitteldarm und in den malpighischen Gefäßen exprimiert.

Dieses Experiment wurde vom Berkeley Drosophila Genom Projekt (BDGP) durchgeführt.

7.33.2 Sequenz des isolierten Fragmentes von CG10660

TGATGAAGATAACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACC 50
 CATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAG 100
 GCCCCGGGGATCCGAATTCGCGGCCGCGTTCGACATTTGGTTAACTCCACC 150
 AAGGGTGTGGTTCGAACCTGGCTCTCGAGGTGCGAGATCTCCTGGAATGTGA 200
 GACACCTGTGGATATTTCACTGCCCCCTGCCACGCCACGAACACGCCCA 250
 CTACACCAGATCCTCCATCTCCACTTGCCACCCATGCGACCAACAATTGG 300
 CAACGGATGACCGCCGAAGTGAAGCGGAAAATGGGCATTAGCAATGCCGG 350
 CAACAGCGACTCCGGCAGATACCTGCTCCGGGTGACCACCACACGGATGC 400
 GTTGCTCCAATAAGGTCAAGGATGAGCTGGAGGCCACGGCGAGCTCCGGT 450
 GTGTATGTGAAGACCACGGCCTTCGAGCACGGCATCTACATAGACGCCTG 500
 GAAGTCCCCCATTTTCTTTCCCTCGCTGTCCACCAAGTGGGACGATGGAT 550
 CCGGTGAGGGTACGATAGATATACCGCTCCAGAGACTCGATCAGTTGGAG 600
 GACATCGTGCTGCGCATCACATTGGCCACCAAGAAGATGGGCAAGAACT 650
 GGTGCTCGGCACCGTCATAGTCGGCGGAGATCAGGCGGGGGATACGGGCT 700
 CCGAGCAGATGCGACTCATCCGGGAATCCCCGCCAGGTCAGCGGGTGGCC 750
 GCCTGGCACTGTTACCACTAAGCCGTAATCAAATCAACACGCCAAACTGA 800
 ATGTACATAGCAAAAATCCTAAGCTTAATGATATAGAATTCCTTGTGCATA 850
 TATATGTATTCTGCTGTATGCATTACTTTG 880

Abb. 102: Sequenz des isolierten Fragmentes von CG10660

Die cDNA Fragmente von CG10660 wurde nur ansequenziert. Es ist 880 Bp lang und startet bei Bp 941 von CG10660. In rot ist der Linker eingezeichnet.

7.34 CG1943

7.34.1 Expressionsprofil von CG1943

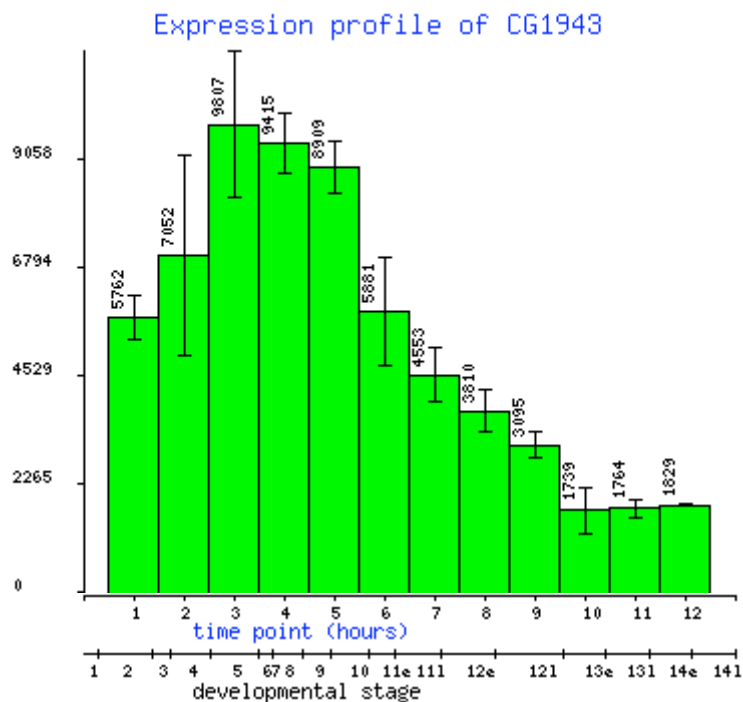


Abb. 103: Expressionsprofil des Gens CG1943

CG1943 ist während der gesamten Entwicklung exprimiert, wobei die Expression in den Stadien 5-9 am stärksten ist.

7.34.2 Sequenz des isolierten Fragmentes von CG1943

```

GATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTA 50
CCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGG 100
AGGCCCGGGGATCCGAATTCGCGGCCGCGTCGACCCAACCAGCCGCTGC 150
AACCACAACCAGCAGCGACAAAATGACATCCACCGAGCTGAAAATCGGCC 200
TGACCACCAGTGCCCGTCCCTCCAGCCGAGTGCTGAAGCCCCCAGGCGGC 250
GGACACACCAATATCTTCTCGGAGCCCAGCGTGGCCGTTCCCGCCCCGCG 300
TGCCAAGTACAACCAACAGAACTCCTCAAACCTCAATGCCTGCATGGGCT 350
CCACGGATCCCAACAAGGTGGTGGAGAAAATTCGCGAAGAGGTCTCCATC 400
CAGAAGGAGGAGGCCAAGTCCGCCCCACCCAGCCAGCCCAAGGAGCCGGC 450
GAACAAACCAGCGGCCACAAATGGAGAGGCACGCGGCCGAGTTCACCCG 500
GCGGATTCCTCGTCGGGCGGATTCTGGTAGAGGGAGGAAGGAGGAAGGAA 550
GTGTGCCCGGGAGCAGAAGCAGCTGCCAAGCATTTAATGACTCACCATCA 600
CATCCTCAGACCGACATAAGAATCATAAACTATAAATATACATAACTCG 650
CTTATAACATACGTATACACCTATATTTAGAGGCGCATTACCTATATTAA 700

```



```
CCTGCTGATCAGCCGAAGAAGAAGGGAAACTGATTATATTTTGCCAAGCA 750
GCACTCCAAGTCGTTCTTCCTTTTCGCCCTTTCATTTTCATGTCCCACATT 800
TGTTCTATTGTCTAAGTAACAGGTTTAAATGTCTAACGAAATTGTTGAAT 850
TAAGTACTCGTGATTCCGCCCAACAATACGGATGATATGGATTGACTTTGC 900
TAAATCTAC 909
```

Abb. 104: Sequenz des isolierten Fragmentes von CG1942

Die cDNA Fragmente von CG1943 wurde nur ansequenziert. Es ist 910 Bp lang und startet bei Bp 87 von CG1943. In rot ist der Linker eingezeichnet.

7.35 Kontrollen

In der Abbildung 96 sind die Kontrollen aufgezeigt, die bei jeder *in situ* Hybridisierung mitgemacht wurden. Eine positive Kontrolle (links), die mit der RNA eines schon bekannten Genes gemacht wird, damit die Hybridisierungsreaktion kontrolliert werden kann. In diesem Fall ist das die *wingless* (*wg*) RNA. *Wg* ist ein Segmentpolaritäts- Gene, das in den Parasegmenten posterior exprimiert ist.

Und eine negative Kontrolle (rechts) war stets die RNA des Kandidaten, die mit der T7 Polymerase hergestellt wurde, da sie die sense RNA darstellt und somit nicht mit der endogenen RNA hybridisieren sollte. Die Färbung der Speicheldrüsen ist unspezifisch.

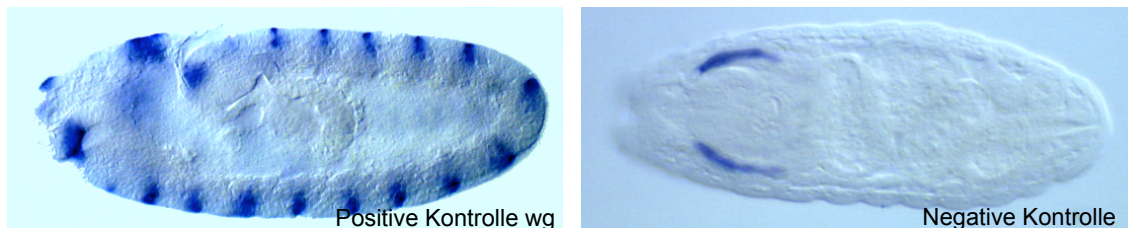


Abb. 105: RNA/RNA *in situ* Hybridisierung, die Kontrollen

Die positive Kontrolle (links) ist das *wg* Gen, das in 14 Streifen zu sehen ist. Die negative Kontrolle (rechts) ist der sense Strang der Kandidaten-RNA, unspezifisch gefärbt sind die Speicheldrüsen.

8. Abkürzungen

A:	Ankyrin Wiederholungen:
Abb.:	Abbildung
AD:	Aktivierungsdomäne
Ank:	Ankyrin Wiederholungen
APC:	anaphase promoting complex
aPKC:	atypische Proteinkinase C
AS:	Aminosäuren
ash1:	absent, small, or homeotic discs 1
ASIP:	atypical PKC isotype-specific interacting protein
ATG:	Startcodon
AT-Hook:	DNA Bindungsregion
Baz:	Bazooka
BD:	DNA-Bindungsdomäne
BDGP:	Berkeley <i>Drosophila</i> Genom Projekt
BDGP:	Berkeley <i>Drosophila</i> Genome Projektes
BNT:	Bazooka N-Terminus
bp:	Basenpaare
<i>C. elegans</i> :	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CaBP1:	Calcium Bindungsprotein 1
CC:	coiled coil
cDNA:	complementary DNA
CH:	Calponin Homologie Domäne
CoIP:	Co-Immunopräzipitation
CRIB:	Cdc42, Rac-interactive binding
C-Terminus:	Carboxy-Terminus
DAB:	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
D-BOX:	destruction Box
DEAD/DEAH:	Asp-Glu-Ala-Asp/Asp-Glu-Ala-His
DEAD:	Asp-Glu-Ala-Asp
Df:	Defizienz
DIG-dUTP:	Digoxigenin-markiertem dUTP
Dip2:	Dorsal interacting protein 2
DM3:	Zink Finger Domäne
DNA:	Deoxyribonucleic Acid
dNTP:	Nucleotide
drk:	downstream of receptor Kinase
Dys:	Dystrophin
Dys:	Dystrophin
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
ER:	Endoplasmatisches Reticulum
FA:	Formaldehyd
FN3:	Fibronectin Typ 3 Domäne
FYVE:	Vorhanden in den Proteinen Fab1, YOTB, Vac1 und EEA1

8. Abkürzungen

GAL4:	Genaktivierungsprotein
GKAP:	guanylate Kinase associated protein
GMZ:	Ganglionmutterzelle
GST:	Glutathione S-transferase
GYF:	Glyzerin-Tyrosin-Phenylalanin
h:	Stunde(n)
HABP4-PAI- <i>hb</i> :	<i>hunchback</i>
HEAT:	<u>H</u> untingtin, <u>E</u> longationsfaktor 3 (EF3), Protein Phosphatase <u>2A</u> (PP2A) und PI3-kinase <u>T</u> OR1
HeLa Zellen:	Henrietta Lacks Zellen
HF:	Hitze Fixierung
<i>HIS3</i> :	Ein Gen in der Histidin Synthese
hp:	Homepage
HURP:	hepatoma up-regulated protein
IL-10:	Interleukin-10
Insc:	Inscuteable
JAM:	junctional adhesion molecules
KBK:	Keimbahnklone
kD:	kilo Dalton
KD:	Kinase Domäne
KEN-BOX:	Lys-Glu-Asn-Box
KLS	Kernlokalisationssignal
KLS:	Kernlokalisationssignal
KOW:	<u>K</u> yprides, <u>O</u> uzounis und <u>W</u> oese
KR:	konservierte Regionen
<i>lacZ</i> :	Gen der β -Galaktosidase
Lsg.:	Lösung
MAGUK:	membrane-associated guanylate Kinase
MDCK:	Madin-Darby canine kidney
Mib:	mind bomb
min:	Minute(n)
MR:	Rekombination in Männchen
mRNA:	messenger RNA
NB:	Neuroblasten
NHS:	normal horse serum
Nr.:	Nummer
N-term:	N-Terminus
N-Terminus:	Amino-Terminus
PAR- :	partitioning defective
PCR:	Polymerase Chain Reaction
PDZ:	Psd95, Discs Large, ZO-1
PH:	Pleckstrin Homologie Domäne
pHSI:	Plasmid Hefe Screen Interaktionsprotein
Pins:	Partner of Insc
PIP ₂ :	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PIP ₃ :	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
PM:	Plasmamembran
POD=HRP:	Meerrettich-Peroxidase
Pp2A-29B:	Protein Phosphatase 2A an der zytologischen Position 29B

PSD-95:	postsynaptic density-95
RBP1:	Hyaluronan und mRNA Bindungsdomäne
RD:	regulatorische Domäne
Ring:	E3 Ubiquitin Ligase Domäne
RNA:	Ribonucleic Acid
RNAi:	RNA interference
RT:	Raumtemperatur
RT-PCR:	Reverse Transkriptions-PCR
S2:	Schneiderzellen
SAR:	subapikale Region
SDS:	Dodecylsulfat Natrium-Salz
Sdt:	Stardust
sec:	Sekunde(n)
Ser/Thr:	Serin/Threonin
SET+postSET:	putative Methyltransferase
SH3:	Src Homology-3
SJ:	septate junctions
SKIP-SNW:	Domäne, die in Chromatin Proteinen vorkommt
SMART:	Simple Modular Architecture Research Tool
SNARE:	SNAP Rezeptor
Spec:	Spectrin Wiederholungen
SS:	Signalsequenz
St:	Stadium
T3 und T7:	Polymerasen
Tcp11:	T-complex 11
TFS2N:	N-terminale Domäne des S-II Elongationsfaktors
TIP:	T-cell immunomodulatory protein
TMD:	Transmembrandomäne
TNF- α :	tumor necrosis factor
tRNA:	transfer RNA
ü. N.:	über Nacht
UAS:	upstream activating signal
UAS:	upstream activation signal
UTP:	Uridin-Tris-Phosphat
uvö:	unveröffentlicht
VNR:	ventrale neurogenische Region
Wdh.:	Wiederholung
<i>wg</i> :	<i>wingless</i>
wt:	wildtyp
WW:	Trptophan-Trptophan
z.B.:	zum Beispiel
ZA:	Zonula Adherens
Zf30C:	Zink Fingerprotein 30C
ZnF ZZ:	Zink Finger Domäne
ZNS:	zentrales Nervensystem
ZO-1:	Zonula Occludens Protein 1

Meinen herzlichen Dank ...

... an Prof. Elisabeth Knust für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in ihrem Institut anzufertigen.

... an Prof. Andreas Wodarz für seine Betreuung, die vielen guten Ratschläge und dem unverzichtbaren Meinungs austausch.

... an Dr. André Bachmann dafür, dass er immer alles stehen und liegen lässt, um einem zuzuhören und Fragen zu beantworten. Und dafür, dass er alles weiß!

... an Nannette Fischer, Mirjana Gagic und Thomas Kessler für die herausragende Laboratmosphäre, die guten praktischen Tipps und die aufheiternden und freundlichen Gespräche.

... an Sandra Berger und Eva Theilenberg für ihre Freundschaft.

... an alle Mitarbeiter des Instituts für Genetik dafür, dass, obwohl ich so weit weg von zu Hause bin, ich doch nie richtig Heimweh hatte.

... an meine Eltern und meinen Bruder dafür, dass ich immer das Gefühl habe, dass jemand hinter mir steht, auf mich stolz ist und mich, falls nötig, auffangen würde.

... und an meinen Ehemann Oliver für seine moralische Unterstützung, sein grenzenloses Verständnis und seine Liebe!

DANKE

Erklärung

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

Düsseldorf, im Februar 2005

Diane Egger-Adam