

**Isolierung und Charakterisierung
von Bindungspartnern
des PDZ-Domänen-Proteins BAZOOKA
aus *Drosophila melanogaster***

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

vorgelegt von

Andreas Ramrath

aus Krefeld

Krefeld 2002

Berichterstatter: Frau Prof. Dr. E. Knust
Herr Prof. Dr. J. H. Hegemann

Tag der mündlichen Prüfung: 05.07.02

Meiner Familie

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

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.

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.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	14
1.1 Asymmetrische Zellteilungen	14
1.1.1 Die asymmetrische Zellteilung bei <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
1.1.2 Die asymmetrische Zellteilung bei <i>Caenorhabditis elegans</i>	16
1.1.3 Die asymmetrische Zellteilung bei <i>Drosophila melanogaster</i> am Beispiel der Neuroblastenteilung in der VNR.....	19
1.2 Zell-Zellkontaktstrukturen und polar verteilte Membrankomponenten	23
1.3 PDZ-Domänen	25
1.4 Aufgabenstellung	26
II. Material und Methoden	27
2.1 Chemikalien und sonstige Materialien	27

2.1.1 Bakterienstämme.....	28
2.1.2 Plasmid- Vektoren.....	28
2.1.3 cDNA-Bank.....	29
2.1.4 Oligonukleotide.....	29
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	32
2.2.1 Herstellung elektrokompetenter Bakterien.....	32
2.2.2 Transformation elektrokompetenter Bakterien.....	33
.....2.2.3 Transformation von Hefen.....	34
.....2.2.4 X-Gal Filtertest.....	35
.....2.2.5 Isolierung von DNA.....	36
2.2.5.1Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	36
.....2.2.5.2 Präparation von DNA aus Hefe.....	37
2.2.5.3 Präparation von genomischer DNA aus Drosophila.....	37
2.2.5.4 Präparation von Plasmid-DNA der Matchmaker cDNA-Bibliothek.....	38
2.2.6 Northern-Transfer.....	38
2.2.7 Erzeugung spezifischer Nukleinsäure-Sonden.....	39
2.2.7.1 Radioaktivmarkierung von DNA-Sonden.....	39
2.2.7.2 DIG-Markierung von DNA- und RNA-Sonden.....	39
2.2.8 Hybridisierung und Autoradiographie.....	40
2.2.9 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)	41
2.2.9.1 Standard-PCR.....	41
2.2.9.2 3'/5' -RACE.....	42
2.2.9.2.1 cDNA-Synthese.....	43
..... 2.2.9.2.2 Amplifikationsreaktion mit 'anchor'- und spezifischem Primer.....	43
.....2.2.10 Plasmid-Rescue.....	44
.....2.2.10.1 Restriktionsspaltung genomischer DNA.....	44
.....2.2.10.2 Ligation und Transformation in kompetente Bakterien.....	45
2.2.11 Die Herstellung der 2-Hybrid-Konstrukte.....	45
2.2.11.1 GAL4BD-Köderkonstrukte.....	46
2.2.11.1.1 GAL4BD-BAZ und -PDZ-Konstrukte.....	46
2.2.11.1.2 Weitere GAL4BD Konstrukte.....	47
2.2.11.2 GAL4AD-Köderkonstrukte.....	47

.....2.2.11.3 Klonierungen zur Verschiebung von Leserastern.....	48
.....2.2.11.3.1 Rasterverschiebung in BIC5.....	48
2.2.11.3.2 Rasterverschiebung in BIC8.....	48
2.3 Genetische Methoden.....	49
2.3.1 Fliegenzucht.....	49
....2.3.2 Chromosomen und Fliegenstämme.....	49
.....2.3.2.1 Balancer-Chromosomen.....	50
.....2.3.2.2 Fliegenstämme.....	50
....2.3.3 Erzeugung von Keimbahnklonen.....	51
2.4 Histologische Methoden.....	51
....2.4.1 Verwendete Antikörper.....	51
2.4.2 Antikörperfärbung an Embryonen.....	53
2.4.2.1 Fixierung in Formaldehyd.....	53
2.4.2.2 Hitzefixierung.....	54
2.4.2.3 Antikörperfärbung.....	54
2.4.3 X-Gal-Färbung an Embryonen.....	55
2.4.4 <i>in situ</i> Hybridisierung an Embryonen.....	56
2.4.4.1 RNA <i>in situ</i> Hybridisierung mit DNA-Sonde.....	56
2.4.4.2 RNA <i>in situ</i> Hybridisierung mit RNA-Sonde.....	58
2.4.5 Präparation embryonaler Kutikula.....	58
2.5 Proteinbiochemische Methoden.....	58
2.5.1 Erzeugung spezifischer Antikörper gegen GST-Fusionsproteine.....	58
2.5.1.1 Herstellung eines GST-Fusionsproteins.....	59
2.5.1.2 BAZ GST-Fusionsproteine.....	60
2.5.1.3 PTEN und TOLL-7 GST-Fusionsproteine.....	62
2.5.2 Herstellung von Embryonenextrakten.....	62
2.5.3 SDS-PAGE-Gelelektrophorese und Western-Blotting.....	63
III. Ergebnisse.....	64
3.1 Erzeugung von Gal4BD-BAZ Köderkonstrukten.....	64
3.1.1 Erzeugung von BAZ spezifische Antikörpern.....	65
3.1.2 GAL4BD-BAZ Expression in der Hefe.....	66

3.2 “Two-Hybrid-Screen”	67
3.3 Positive Interaktionsklone aus dem “2-Hybrid-Screen”	67
3.3.1 Der BAZ Interaktionspartner TOLL-7.....	68
3.3.1.1 Verteilung der <i>toll-7</i> RNA.....	70
3.3.1.2 Untersuchung der TOLL-7 Expression in Embryonalstadien.....	72
3.3.1.3 Mutationen innerhalb des <i>toll-7</i> Locus.....	78
3.3.1.3.1 P-Elementlokalisierung durch inverse PCR.....	80
3.3.1.3.2 P-Elementlokalisierung durch “Plasmid-Rescue”.....	81
3.3.1.4 Deletionen in der Umgebung des <i>toll-7</i> Gens.....	82
3.3.2 Die Interaktionsklone BIC4 und BIC7 enthalten eine <i>pten</i> cDNA.....	84
3.3.2.1 Verteilung der <i>pten</i> mRNA.....	86
3.3.2.2 Erzeugung eines DmPTEN spezifischen Antikörpers.....	87
3.3.2.3 Spezifität des PTEN Antiserums.....	87
3.3.2.4 Untersuchung der PTEN Expression in Embryonalstadien.....	89
3.3.2.5 Überexpression von <i>pten</i> mit dem UAS-GAL4 System.....	89
3.3.2.6 Der <i>pten</i> Phänotyp in <i>pten</i> ^{DJ189} Keimbahnklonen.....	91
3.3.3 BIC5 enthält ein VSM1-Homolog	93
3.3.4 BIC8 codiert für das vorhergesagte Gen CG18253.....	94
3.3.4.1 Genstruktur von CG18253.....	95
3.3.4.2 Das Expressionsmuster von CG18253 ähnelt dem von <i>crb</i> , <i>sdt</i> und <i>baz</i>	97
3.4 Test von Kandidaten für Interaktionspartner von BAZ im “2-Hybrid“-System....	97
3.4.1 Die atypische PKC von <i>Drosophila melanogaster</i>	99
3.4.2 3’-RACE zur Amplifikation des fehlenden aPKC-Endes.....	100
3.4.3 Klonierung des gesamten codierenden Bereichs der aPKC in pACT2.....	102
3.4.4 Interaktion von DaPKC mit Proteinen des Bazooka-Komplexes.....	102
3.4.2 Interaktion von DmPAR-6 mit BAZ.....	103
3.4.3 Test der Interaktion des PDZ-Domänen Proteins DLT mit BAZ.....	104
3.5 Interaktion von INSCUTEABLE mit Proteinen des BAZ-Komplexes.....	104
3.6 Verbesserung des 2-Hybridsystems	105
3.5.1 Der offene Leseraster YCR105w von <i>S.cerevisiae</i>	107
3.5.2 Disruption von YCR105w durch Gal4BD/PDZ1-3/TRP.....	107
3.5.3 Funktionalität des transgenen YCR105w::Gal4BD/PDZ1-3 Stammes.....	108

IV. Diskussion	109
4.1 Bazooka, Toll-7 und das Nervensystem von <i>D. melanogaster</i>	109
4.2 Zusammenhang zwischen <i>baz</i> und <i>pten</i>	112
4.3 Die atypische PKC und DmPAR-6	118
4.4 Die Komponenten der apikalen Proteinkomplexe im NB und polarisierten Epithel	122
4.5 Schlussbemerkungen	126
V. Literatur	128
VI. Abkürzungen und Anhang	145
VII. Zusammenfassung	153
VIII. Danksagung	155

I. Einleitung

Vielzellige Organismen sind in Kompartimente aufgeteilt, die gegeneinander und zusammen gegen die Aussenwelt abgeschirmt werden. Weiterhin sind sie aus einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen zusammengesetzt, die eine der jeweiligen Spezialisierung entsprechende Morphologie aufweisen und spezifische Gene exprimieren. Die Kompartimentierung erfolgt u.a. durch den Aufbau von Epithelien wie dem Nieren- und Darmepithel. Die Differenzierung in unterschiedliche Zellen wird durch Zell-Zellinteraktionen und asymmetrische Zellteilungen erreicht.

Wie ein Epithel entsteht, welche Faktoren bei dem Aufbau und dem Erhalt eines Epithels eine Rolle spielen, lässt sich sehr gut am Beispiel der Epithelentwicklung in *Drosophila melanogaster* untersuchen.

Verschiedene Faktoren spielen nicht nur bei der Epithelentwicklung eine Rolle, sondern beeinflussen auch die asymmetrischen Teilungen von Zellen, die von Epithelzellen abstammen. Die ersten Erkenntnisse über den Prozess der asymmetrischen Zellteilung wurden an dem Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* gewonnen. Verschiedene Komponenten

für die asymmetrische Zellteilung wurden identifiziert und auch bei anderen Organismen, wie bspw. bei *Drosophila melanogaster* und Vertebraten gefunden, wo sie eine ähnliche Rolle spielen.

1.1 Asymmetrische Zellteilungen

Schon bei recht einfachen Organismen wie den Nematoden sind die nach den ersten Zellteilungen vorhandenen Zellen auf eine bestimmte Entwicklungsrichtung hin determiniert. Solche Determinationsprozesse werden u.a. durch Zell-Zell Interaktionen, in sehr frühen Embryogenesestadien jedoch vor allem durch asymmetrische Zellteilungen bewirkt. Der Mechanismus, welcher der asymmetrischen Zellteilung zugrundeliegt, wird an verschiedenen Organismen und unterschiedlichen Zelltypen untersucht. Die Zygotenteilung bei *C.elegans*, die vegetative Teilung der Hefezelle bei *Saccharomyces cerevisiae* und die Neuroblastenteilung bei *Drosophila melanogaster* sind die bevorzugten Untersuchungsobjekte bei der Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen.

1.1.1 Die asymmetrische Zellteilung in *Saccharomyces cerevisiae*

Bereits bei dem einfachsten eukaryontischen Organismus, dem einzelligen Hefepilz *Saccharomyces cerevisiae*, kann eine Asymmetrie in der Hefezelle selber und beim Ablauf der Hefe-teilung beobachtet werden.

Die Teilung der haploiden Hefe erfolgt axial, die der diploiden sowohl axial als auch bipolar. Bei der axialen Teilung erfolgt die Bildung der neuen Knospe unmittelbar neben oder sogar überlappend mit der Knospungsnarbe der vorherigen Teilung. Bei der bipolaren Teilung entsteht die neue Knospe distal oder proximal zu dieser Knospungsnarbe. Es gibt also determinierende Komponenten in einer Hefezelle, die eine bestimmte Stelle markieren, an der die neue Knospungsnarbe entstehen soll (Übersichtsartikel: Chant und Pringle, 1991; Chant und Pringle, 1995).

In der Hefe sind verschiedene Determinanten für ein polarisiertes Wachstum und für die Festlegung einer bipolaren Knospungsstelle gefunden worden. Deletionsmutanten dieser Determinanten führen zu einer Auswahl der Knospungsstelle, die nicht mehr strikt dem

normalen bipolaren distalen oder proximalen Muster folgt. Das Muster der axialen Teilung ist jedoch nicht betroffen (Pringle et al., 1995; Zahner et al., 1996).

Das Knospenwachstum ist das Ergebnis einer polarisierten Sekretion entlang polarisierter Aktinkabel (Pruyne und Bretscher, 2000), die während eines Zellzyklus umorganisiert werden (Adams und Pringle, 1984).

Bei Signalübertragungen, die zu einer Umorganisation des Aktinzytoskelettes führen, sind oft kleine Rho-GTPasen beteiligt. Bei *Saccharomyces cerevisiae* wurde *CDC42*, das Homolog zu dem *C.elegans* Gen, als eine solche GTPase identifiziert, welche für die Etablierung von Zellpolarität benötigt wird (Adams et al., 1990). Der aktivierende GDP/GTP Austausch und die inaktivierende GTPase Funktion verlaufen wie bei den meisten Rho-GTPasen eher langsam, das Protein unterliegt somit der Kontrolle durch GTPase aktivierende Faktoren und mindestens einem GDP/GTP Austausch-Faktor. Dieser Austausch-Faktor für Cdc42p ist bei *S.cerevisiae* das Cdc24-Protein, welches durch Phosphorylierung unter dem Einfluss der Zellzyklusmaschinerie (Bose et al., 2001) reguliert wird. Beide Proteine binden an das Gerüstprotein Bem1. Während der G1 Wachstumsphase werden alle drei Faktoren an die Stelle rekrutiert, an der die neue Knospe entsteht (Nern und Arkowitz, 1999; Pringle et al., 1995; Ziman et al., 1993). Bem1 besitzt neben zwei SH3-Domänen noch eine PX-Domäne für die Bindung an Phosphatidyl-Inositolverbindungen (Ago et al., 2001). SH-3 Domänen können an Proteindomänen mit vielen Prolinresten binden. Der Einfluss von Cdc42p auf die Zellpolarität ist nicht auf *S.cerevisiae* beschränkt, wie im folgenden dargestellt wird.

1.1.2 Die asymmetrische Zellteilung bei *Caenorhabditis elegans*

Bereits in der Zygote des Nematoden *C.elegans* besteht eine anterior-posteriore (A/P) Polarität. Diese führt zu einer asymmetrischen Zellteilung, bei der sich die entstehenden Tochterzellen sowohl morphologisch als auch in Hinsicht auf die Verteilung von Molekülen unterscheiden, die als Zellschicksalsdeterminanten dienen oder den Ablauf der asymmetrischen Zellteilung steuern.

Bei der Befruchtung der zunächst unpolarisierten Eizelle wird der posteriore Pol durch den Eintrittsort des Spermiums festgelegt (Goldstein und Hird, 1996). Das zentrale Zytoplasma der Eizelle fließt zu dem männlichen Vorkern hin und mit ihm die im Zytoplasma gleichmässig verteilten P-Granula. Hierbei handelt es sich um Ribonukleoproteinkomplexe, welche auf diese Weise zum posterioren Pol hin lokalisiert werden (Hird und White, 1993). Der weibliche Vorkern trifft im posterioren Teil des Eis auf den männlichen Vorkern und

wandert zusammen mit diesem zum Zentrum. Hier findet die Kernverschmelzung und anschliessend die Ausbildung der 1. Mitosespindel statt. Auf diese Teilungsspindel wirkt eine von den Zellpolen ausgehende Kraft, wobei die posteriore Kraft grösser ist und die mitotische Spindel in die Richtung des posterioren Zellpols verschiebt (Grill et al., 2001).

Die anschliessende Zytokinese führt zu einer grösseren anterior gelegenen AB-Zelle und zu einer kleineren P₁-Zelle. Aus ersterer entsteht nur somatisches Gewebe, während aus der P₁-Zelle sowohl Soma- als auch Keimbahnzellen gebildet werden (Sulston, 1983).

Die sich an die Zygotenteilung anschliessenden Teilungen sind zeitlich sehr genau koordiniert. Die AB-Zelle teilt sich immer vor der P₁-Zelle, wobei die Teilungsspindel senkrecht zur A/P-Achse steht (transversal); die sich anschliessende Teilung der P₁-Zelle verläuft dagegen longitudinal, d.h. parallel zur A/P-Achse (Deppe et al., 1978). Die Teilungsspindel in der P₁-Zelle wird zunächst ebenfalls transversal ausgebildet, rotiert dann aber in der Metaphase um ca. 90° (Hyman und White, 1987).

Aus der P₁-Teilung entsteht die anterior gelegene EMS-Zelle und die posteriore P₂-Zelle. Wie bei der Zygotenteilung werden auch bei dieser und der sich anschliessenden P₂-Zellteilung verschiedene Moleküle und die P-Granula asymmetrisch verteilt. Die P₄-Zelle (Abb.1) teilt sich schliesslich symmetrisch in die beiden Keimbahnvorläuferzellen Z₂ und Z₃ (Übersichtsartikel: Sulston et al., 1983).

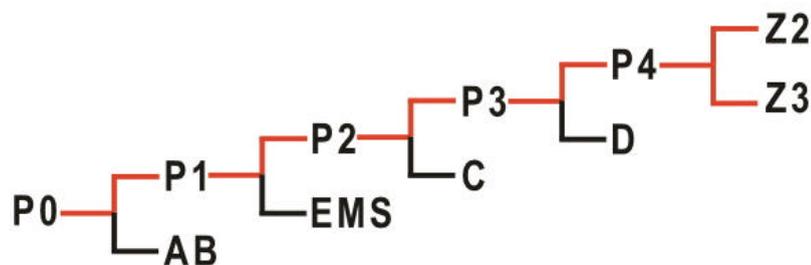


Abb.1: Überblick über die frühen Teilungen des *C.elegans* Embryos.

Darstellung der ersten 5 Teilungen des *C.elegans* Embryos. AB, EMS, C und D sind rein somatische Zellen, der jeweils zur Keimbahn führende Weg ist in Rot dargestellt

Der beschriebene Prozess der frühen asymmetrischen Teilungen des *C.elegans* Embryos wird durch maternal exprimierte Gene gesteuert (Kemphues et al., 1988). Durch die Charakterisierung von maternalen Mutanten, bei denen die erste Zellteilung symmetrisch verläuft und die zeitliche Koordination sowie die Spindelrotation gestört ist, konnten zum ersten Mal Gene identifiziert werden, die für den Ablauf der frühen asymmetrischen Zygotenteilung verantwortlich sind (Kemphues et al., 1988). Diese Gene wurden als PAR-Gene („partitioning-defective“) bezeichnet.

In PAR-Mutanten sind verschiedene Aspekte der frühen A/P-Polarität betroffen. Obwohl die Defekte der einzelnen Mutanten z.T. genspezifisch sind, gilt generell, dass die Blastomeren des 2-Zellstadiums ähnlich gross sind, sich fast gleich entwickeln und keine asymmetrische Verteilung der oben beschriebenen Faktoren aufweisen (Übersichtsartikel: Rose und Kemphues, 1998).

An dem Eintrittsort des Spermiums wird die A/P-Achse anfangs durch das Zentrosom des Spermiums spezifiziert und im weiteren durch die PAR-Proteine etabliert (Goldstein und Hird, 1996; O'Connell et al., 2000; Sadler und Shakes, 2000; Wallenfang und Seydoux, 2000; Übersichtsartikel: Wodarz, 2002). Erst mit dem Auftreten von astralen Mikrotubuli, welche Kontakt zum posterioren Zytocortex aufnehmen, wird PAR-2 an den posterioren Zellpol lokalisiert. Eine weitere hierhin rekrutierte Komponente ist die putative Serin(Ser)/Threonin(Thr) Kinase PAR-1 (Guo und Kemphues, 1995; Levitan et al., 1994). Am anterioren Pol befinden sich PAR-3 (ein Multi-PDZ-Domänen Protein) und PAR-6 (ein Protein mit einer CRIB- und einer PDZ-Domäne) (Etemad-Moghadam et al., 1995a; Hung und Kemphues, 1999a; Watts et al., 1996a). Die Bezeichnung PDZ setzt sich aus den Anfangsbuchstaben der drei ersten Proteine mit einer solchen Domäne zusammen, es handelt sich hierbei um die Proteine PSD95 („Postsynaptic-Density-Protein 95“), DLG(„Discs Large“) und ZO1 („Zonula-occcludens-1“) (Cho et al., 1992; Sabry et al., 1995; Woods und Bryant, 1993; Woods et al., 1996). CRIB steht für CDC42 und RAC1 Bindungsdomäne (Burbelo et al., 1995).

Die beiden anderen bekannten PAR-Proteine PAR-4 (eine putative Ser/Thr Kinase) und PAR-5 sind eher ubiquitär im Zytoplasma verteilt (Morton et al., 1992; Morton et al., 2002; Watts et al., 2000).

Es besteht eine gegenseitige Abhängigkeit, was die Lokalisation der PAR-Proteine betrifft. So ist beispielsweise die normale Lokalisation von PAR-3 abhängig von *par-2*, *par-5* und *par-6* (Etemad-Moghadam et al., 1995b; Guo und Kemphues, 1996a; Watts et al., 1996b); in *par-2* Mutanten sind PAR-3 bis PAR-6 um den gesamten Zytocortex der Zygote herum verteilt (Cheng et al., 1995; Hung und Kemphues, 1999b).

Neben den PAR-Proteinen gibt es eine Reihe anderer Proteine, die eine direkte Interaktion mit PAR-Proteinen aufweisen und deren mutante Formen einen PAR-Phänotyp bewirken.

Hierzu gehört CDC42, eine kleine Rho-GTPase, deren Hefe-Homolog ebenfalls einen Einfluss auf die Zellpolarität besitzt. CDC42 kann im „2-Hybrid“-System über die CRIB-

Domäne von PAR-6 an dieses binden (Chen et al., 1993; Gotta et al., 2001). In *cdc42* (RNAi)-Embryonen (durch die Injektion von doppelsträngiger RNA wird die Expression der entsprechenden RNA verhindert, eine Methode, die mit RNA-Interferenz bezeichnet wird) verläuft die 1. Teilung weniger symmetrisch als in PAR-Mutanten, die Orientierung der Teilungsspindel in AB- und P1-Zelle ist jedoch stärker als in diesen betroffen (Kay und Hunter, 2001).

An PAR1 bindet ein Protein mit der Bezeichnung NMY-2 („Non-muscle-myosin-2“), welches mit Aktin assoziieren kann (Guo und Kemphues, 1996b). In *nmy-2* (RNAi)-Embryonen verläuft die 1. Teilung symmetrisch und die Spindelrotation bei der folgenden Teilung ist gestört. Für PAR-3 wurde ebenfalls ein direkter Interaktionspartner identifiziert, hierbei handelt es sich um eine atypische Proteinkinase (PKC-3), die im mutierten Zustand einen PAR Phänotyp aufweist (Tabuse et al., 1998; Wu et al., 1998).

Der verglichen mit anderen Organismen bei *C.elegans* bereits gut charakterisierte Mechanismus der asymmetrischen Zellteilung, liefert wegen des anscheinend sehr konservierten Prozesses wertvolle Hinweise über Komponenten und Ablauf einer solchen Teilung in anderen Modellorganismen.

1.1.3 Die asymmetrische Zellteilung bei *Drosophila melanogaster* am Beispiel der Neuroblastenteilung in der ventralen neurogenen Region

Das sich embryonal entwickelnde zentrale Nervensystem von *D.melanogaster* entsteht aus Vorläuferzellen; dies sind im wesentlichen die Zellen der Mittellinie und die Neuroblasten (NB) (Übersichtsartikel: Bellaïche und Schweisguth, 2001). NB sind relativ grosse, runde Zellen, die innerhalb von zwei spezialisierten Regionen des Embryos aus Epithelzellen entstehen und sich in einem stammzellartigen Muster teilen. Bei dieser Teilung entsteht ein neuer, etwas kleinerer NB und eine Gangliennutterzelle (GMC). Es wird zwischen procephalen NB aus der Kopfregion, und solchen aus der ventralen neurogenen Region (VNR) unterschieden (Übersicht: Campos-Ortega und Hartenstein, 1997). Ab ca. Stadium 9 der Embryogenese wird an verschiedenen Stellen jeweils einer der Zellen des Epithelverbandes durch laterale Inhibition eine neurale Identität verliehen, und diese löst dann die Zell-Zellkontakte zu den benachbarten Epithelzellen auf, ein Prozess, der als Delamination bezeichnet wird (Übersichtsartikel: Fuerstenberg et al., 1998b; Jan und Jan, 2000; Matsuzaki, 2000)). Bei den NB aus der VNR legt während dieser Delamination noch

ein Teil des sich aus dem Epithel abschnürenden NB wie ein Stiel zwischen anderen Epithelzellen. Schliesslich löst sich auch dieser Stiel vom Epithel und der neu entstandene NB ist unterhalb des Epithels lokalisiert (Abb.2). Wie bei der Teilung der P₁-Zelle von *C.elegans* erfolgt in dem NB eine Rotation der Teilungsspindel. Diese wird zunächst parallel zur Orientierung der Teilungsspindel in dem darüberliegenden Epithel ausgebildet, in der Metaphase rotiert sie um 90° und steht senkrecht zur Teilungsebene des Epithels (Kaltschmidt et al., 2000).

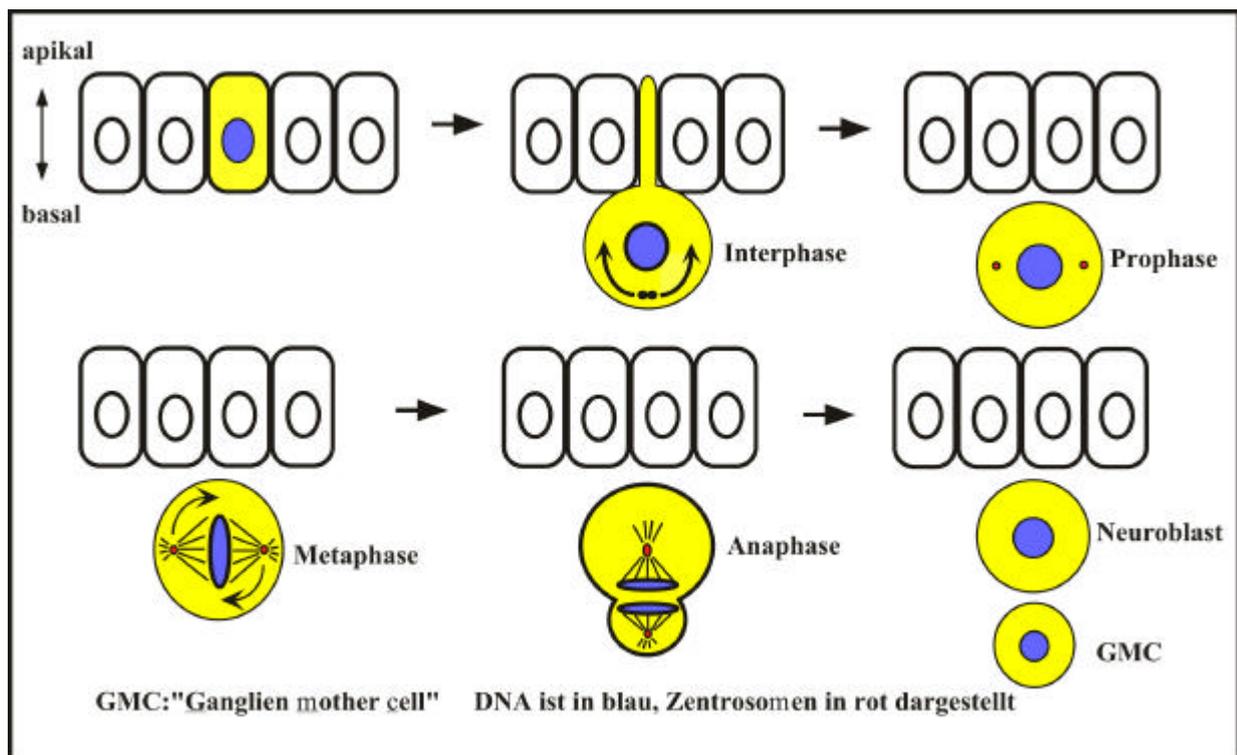


Abb.2: Neuroblastendelamination und asymmetrische Teilung des NB

Nach der Delamination aus dem Epithelzellverband liegt der sich in der Prophase der Mitose befindliche NB unterhalb des Epithels. Die sich von den Zentrosomen her ausbildende Teilungsspindel besitzt zunächst eine Orientierung, die parallel zur Teilungsebene der darüberliegenden Epithelzellen verläuft. In der Metaphase findet eine Rotation der Teilungsspindel (Pfeile) statt, diese steht nun senkrecht zur Teilungsebene der Epithelzellen.

Die Ausrichtung der Teilungsspindel entlang der apiko-basalen Achse sowie die korrekte asymmetrische Verteilung von Zellschicksalsdeterminanten ist in *bazooka* (*baz*) Mutanten gestört. Bei *baz* handelt es sich um das *Drosophila*-Homolog des *C.elegans* Gens *par-3*. Das Gen wurde ursprünglich bei der Suche nach Mutanten, die Defekte in der Epithelstruktur des *D.melanogaster* Embryos aufweisen, identifiziert. In Mutanten treten charakteristische Löcher in der embryonalen Kutikula auf. Da diese durch die Epithelzellen sezerniert wird, stellen

Schädigungen der Kutikula Hinweise auf epitheliale Defekte dar. *bazooka* besitzt eine starke maternale Komponente. In Keimbahnklonen, bei denen auch diese Komponente fehlt, wird das Epithel mehrschichtig, die Zellen runden sich ab und in NB kommt es zu einer Fehlstellung der Teilungsspindel mit einer gestörten Verteilung von normalerweise asymmetrisch lokalisierenden Zellschicksalsdeterminanten (Kuchinke et al., 1998; Wodarz et al., 1999).

Das Baz Protein befindet sich am apikalen Cortex des Epithels (Kuchinke et al., 1998), und hier vor allem in einer Region, die als subapikaler Komplex (SAC) oder marginale Zone bezeichnet wird (Müller, 2000; Tepass, 1997). In dieser Zone wurden weitere Proteine nachgewiesen, deren Homologe bei *C.elegans* an PAR-3 binden und zusammen mit ihm einen Komplex bilden. Es handelt sich hierbei um DmPar-6 (Petronczki und Knoblich, 2001) und DaPKC (Wodarz et al., 2000). Die Zugehörigkeit von aktiviertem CDC42 zu diesem Komplex ist für *Drosophila melanogaster* noch nicht gezeigt.

In dem durch Delamination aus dem Epithel stammenden NB behält Baz seine apikale Lokalisation durch Bildung einer halbmondförmigen Struktur im apikalen NB-Cortex bei (Kuchinke et al., 1998; Schober et al., 1999; Wodarz et al., 1999). Auch hier ist es kolokalisierend und direkt verbunden mit DmPAR-6 und DaPKC (Petronczki und Knoblich, 2001; diese Arbeit). In dem Stiel, der während der Delamination des NB noch zwischen den Epithelzellen auftritt, findet sich zum ersten Mal Inscuteable (Insc), ein Ankyrin-Domänen enthaltendes Protein (Kraut und Campos-Ortega, 1996).

Wie bei *Dapkc* und *baz* führen auch Mutationen in *insc* zu Defekten bei der Ausrichtung der Teilungsspindel und zur Fehlverteilung normalerweise asymmetrisch verteilter Proteine (Kraut et al., 1996). Während die aPKC und Baz jedoch bereits bei der Entstehung des NB eine Lokalisation am apikalen Cortex aufweisen, wird das Insc-Protein erst in dieser Entwicklungsphase in den NB synthetisiert. In *baz* Keimbahnklonen und *baz*(RNAi)-Embryonen geht die apikale Halbmondstruktur von Insc verloren, das Protein wird hier gleichmässig im Zytoplasma verteilt. In *insc* Nullmutanten ist die epitheliale Lokalisation von Baz nicht gestört, die Baz Expression in NB aber stark reduziert (Schober et al., 1999; Wodarz et al., 1999). In Zellkulturexperimenten mit einer *Drosophila melanogaster* Zelllinie (S2-Zellen) (Schneider, 1972), wird Insc durch Baz zum Zellcortex hin rekrutiert, jedoch nicht umgekehrt (Wodarz et al., 1999).

Als ein direkter Bindungspartner für Insc wurde u.a. Pins ("Partner of Inscuteable") beschrieben, ein über Pins indirekt an Insc bindendes Protein ist die β -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins (Schaefer et al., 2000; Yu et al., 2000). In Bezug auf die

Lokalisation der einzelnen Komponenten besteht eine Hierarchie, wobei Baz/DaPKC an erster Stelle steht und für die Lokalisation von Insc verantwortlich ist. Dieses bindet Pins, welches im Epithel zwar exprimiert, aber nicht membranlokalisiert ist (Yu et al., 2000). Im Verlaufe der NB-Teilung werden Baz, DaPKC, Insc und Pins abgebaut und sind in der Anaphase nicht mehr nachweisbar (Schaefer et al., 2000; Wodarz et al., 2000; Wodarz et al., 1999; Yu et al., 2000).

Einige Proteine, die während der frühen Prophase der NB-Teilung noch Teil des apikalen Komplexes sind, werden während der Prophase zur basalen Peripherie hin umorientiert, wo sie zusammen mit anderen, ausschliesslich hier befindlichen Proteinen, in die GMC gelangen. Zu den so relokalierten Proteinen gehören Staufen (STAU), Miranda (MIR) und Prospero (PROS) (Übersichtsartikel: Fuerstenberg et al., 1998a). Es handelt sich hierbei um Proteine, die als Zellschicksalsdeterminanten wirken oder andere Proteine bzw. mRNA zur basalen NB-Domäne hin rekrutieren.

Dabei ist wahrscheinlich Insc für die anfängliche apikale Lokalisation verantwortlich, da MIR und STAU direkt an Insc binden können. Diese Bindung kann jedoch nur temporär sein, da die Translokation von STAU/MIR/PROS zum basalen Pol hin bereits zu einem Zeitpunkt erfolgt, an dem sich der BAZ/INSC/DaPKC-Komplex noch am apikalen Pol befindet (s.o.).

Die Interaktion zwischen INSC und STAU/MIR/PROS wird jedoch für ihre spätere basale Lokalisation benötigt, in *insc* Mutanten sind sie fehlverteilt (Shen et al., 1997b). Umgekehrt ist die Lokalisation von INSC in *mir* und *stau* Mutanten, denen diese basalen Komponenten fehlen, nicht gestört (Kraut und Campos-Ortega, 1996; Li et al., 1997; Shen et al., 1997b; Kraut et al., 1996).

Auf der basalen Seite bindet, zusammen mit STAU und PROS, auch das Protein NUMB, ein weiteres asymmetrisch verteiltes Protein, an das Multidomänen Protein MIR (Matsuzaki et al., 1998; Shen et al., 1997a; Shen et al., 1998). Während in *mir* Mutanten die PROS und STAU Lokalisation gestört ist, wird die asymmetrische Verteilung von NUMB hier nicht beeinflusst. Ein anderes, an NUMB bindendes und dementsprechend mit "partner of Numb" (PON) bezeichnetes Protein, ist für die Lokalisation von NUMB verantwortlich (Lu et al., 1998). In NB hängt die basale Lokalisation von NUMB von INSC ab. Eine solche Abhängigkeit besteht jedoch nicht generell, bei der asymmetrischen Teilung der Vorläuferzellen der Haarsensillen, den "sensory organ precursor cells" (SOP), besteht diese Abhängigkeit nicht. Zudem zeigt die ektopische Expression von PON in epithelialen Zellen, dass PON in diesen Zellen, in denen kein INSC Protein vorhanden ist, zur basalen Membrandomäne rekrutiert wird. PON reagiert also auf basale Polarisierungssignale

unabhängig von INSC und ist der primäre Faktor für die basale Lokalisation von NUMB (Lu et al., 1998)..

Der Transport der asymmetrisch verteilten Proteine benötigt ein intaktes Aktinzytoskelett, so wird die Lokalisation und der Transport von NUMB und PROS in der Gegenwart von Aktin depolymerisierenden Agenzien wie Latrunculin A und B verhindert (Broadus und Doe, 1997), während die Behandlung mit einer Mikrotubuli depolymerisierenden Substanz wie Colcemid keinen Einfluss besitzt (Knoblich et al., 1995).

Der Transkriptionsfaktor Pros gelangt in der GMC in den Zellkern und sorgt sowohl für die Expression neuraler- als auch für die Supprimierung neuroblastenspezifischer Gene (Hirata et al., 1995; Knoblich et al., 1995; Spana und Doe, 1995). Auch die *prospero* RNA wird durch die Bindung an STAU asymmetrisch in die entstehende GMC verteilt (Li et al., 1997). Der Mechanismus der asymmetrischen Zellteilung bewirkt so durch die Translokation von Proteinen und mRNA die Entstehung zweier verschiedener neuer Zellen, wovon eine sich weiterhin asymmetrisch teilt, während die andere zwei sich ausdifferenzierende Zellen bildet.

1.2 Zell-Zellkontaktstrukturen und polar verteilte Membrankomponenten

Einige der dem NB eine apikale Polarität verleihende Komponenten gehören bereits in dem Epithel, aus dem die NB entstehen, zu einem apikalen Proteinkomplex.

Dieser Proteinkomplex weist eine konservierte Zusammensetzung in Hinsicht auf die einzelnen Komponenten und ihre direkten Bindungspartner hin auf. Ein Teil dieser Komponenten spielt zusammen mit weiteren auch bei der Etablierung und Aufrechterhaltung der Epithelpolarität eine Rolle. Zu diesen Komponenten gehört auch Baz, welches u.a. zusammen mit DaPKC und DmPar-6 einen Teil des SAC in der Epidermis bildet (Kuchinke et al., 1998; Petronczki und Knoblich, 2001; Wodarz et al., 2000). Andere hier lokalisierende Proteine sind Crumbs, Stardust und Discs Lost (Bachmann et al., 2001; Bhat et al., 1999; Klebes und Knust, 2000; Tepass, 1996; Tepass et al., 1990). Eine schematische Übersicht über den Aufbau des epidermalen Epithels von *D.melanogaster* wird in Abb.3 gegeben.

Direkt unterhalb des SAC liegt ein als Zonula adherens (ZA) bezeichneten Bereich, in dem die Zellen durch die homophile und Ca^{2+} -abhängige Interaktion von membrandurchspannenden E-Cadherin Molekülen miteinander verbunden sind. Im Zytoplasma ist E-Cadherin über ?? und ?? Catenin mit dem Aktinzytoskelett verbunden (Yap et al., 1997), welches die Zelle im Bereich der ZA wie ein Gürtel umgibt.

Einige Proteine aus dem SAC besitzen Homologie zu Komponenten der Tight Junctions von Vertebraten. Asip („atypical PKC specific interacting protein“), das Säuger Homolog von PAR-3/Baz, bildet in Analogie zu *D.melanogaster* zusammen mit den jeweiligen Homologen von DmPar-6 und DaPKC einen an den Tight Junctions lokalisierenden Komplex (Izumi et al., 1998; Joberty et al., 2000; Suzuki et al., 2001). Die Tight Junctions verhindern die parazelluläre Diffusion von Ionen und Molekülen und halten die Membranpolarität aufrecht, indem die Diffusion von Proteinen und Lipiden innerhalb der Membran verhindert wird (Übersichtsartikel: Cereijida et al., 1998; Mitic und Anderson, 1998).

Den PAR-Proteinen und DaPKC entsprechende Vertebraten-Homologe sind in MDCK (Madiné Darby Canine Kidney)-Zellen, die in kalziumarmen Kulturbedingungen gehalten wurden, ubiquitär im Zytoplasma verteilt und die Zellen verlieren ihre Polarität (Izumi et al., 1998; Suzuki et al., 2001). Nach der Zugabe von Kalzium zum Kulturmedium werden die Proteine zu den Zell-Zellkontakten hin rekrutiert und erfahren dort eine apikale Orientierung zu den Tight Junctions hin (Yamanaka et al., 2001). Die Bindung des Asip-aPKC Komplexes an die Membran erfolgt möglicherweise über das Membranprotein JAM1 (junctional adhesion molecule 1), welches an Tight Junctions von Epithel- und Endothelzellen lokalisiert ist. Jam1 bindet direkt an die erste PDZ-Domäne von Asip (Ebnet et al., 2001; Itoh et al., 2001).

Experimente mit einer dominant negativen aPKC- und einer Jam1-Form ohne extrazelluläre Domäne zeigten, dass der Asip-aPKC Komplex bei Vertebraten für die Etablierung der Epithelpolarität, jedoch nicht für deren Erhalt notwendig ist (Ebnet et al., 2001; Suzuki et al., 2001; Yamanaka et al., 2001). Bei der Funktion von Komponenten, die zur Epithelpolarität beitragen, ist jeweils zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden.

Möglicherweise erfolgt die Rekrutierung der PAR-aPKC Kasette durch den E-Cadherin vermittelten Zell-Zellkontakt und die dadurch ausgelöste Aktivierung von CDC42 (Kim et al., 2000). Aktiviertes CDC42 bindet an die CRIB Domäne von PAR-6, welches hiernach die aPKC? aktiviert (Yamanaka et al., 2001).

Die Bindung von aktiviertem CDC42 an die *Drosophila melanogaster* Form von PAR-6 ist noch nicht nachgewiesen. Ein Vergleich der *jam1*-Sequenz mit durch das BDGP (Berkeley Drosophila Genome Project) zeigt, dass bei *D.melanogaster* kein entsprechendes Sequenz-homolog existiert.

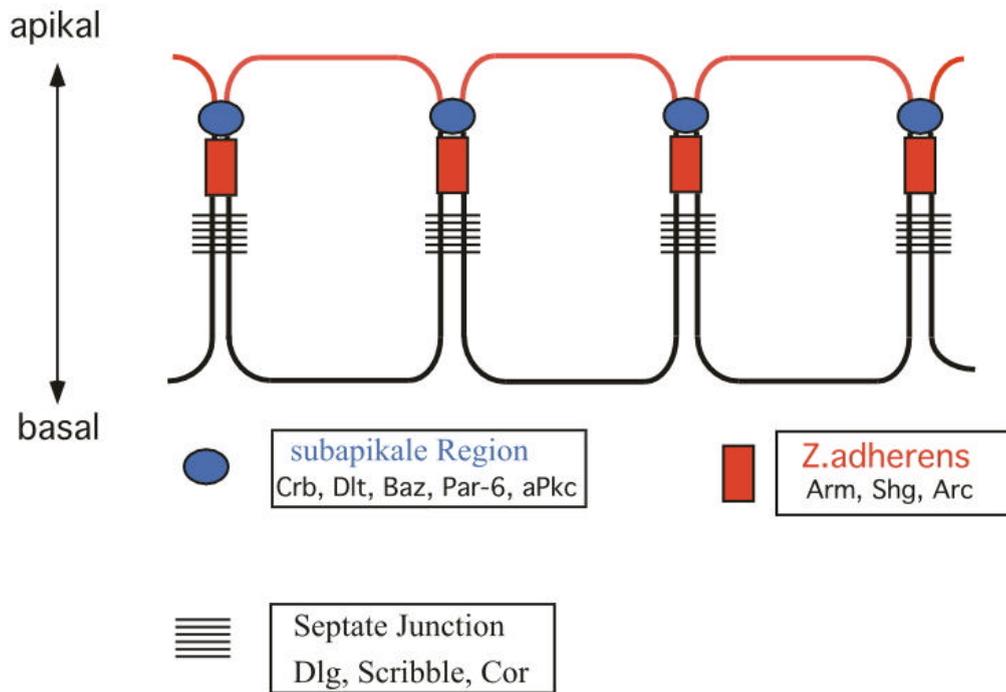


Abb.3: Strukturkomponenten und apiko-basale Polarität der Epithelmembran

1.3 PDZ-Domänen

Mehrere der am Prozess der Epithelpolarisation und asymmetrischen Zellteilung beteiligten Proteine weisen als Interaktionsdomäne eine oder mehrere PDZ-Domänen auf. Viele Proteine, die mit solchen PDZ-Domänen interagieren oder selber solche Domänen enthalten, lokalisieren an der Plasmamembran. Im allgemeinen scheinen Proteine mit PDZ-Domänen als Gerüstproteine zur Assemblierung von Proteinkomplexen wie z.B. Ionenkanälen und verschiedenen Transmembranrezeptoren zu dienen, wie sie sich oft an spezialisierten Membrandomänen wie Tight Junctions, neuromuskulären Kontaktstellen und postsynaptischen Regionen finden (Ponting et al., 1997). Gut charakterisierte Beispiele sind der durch LIN-2/LIN-7/LIN-10 und LET-23 geformte, die Vulvaentwicklung bei *C.elegans* steuernde Signalkomplex (Kaech et al., 1998; Simske et al., 1996) und der die Photorezeption kontrollierende INAD-Komplex in den Photorezeptorzellen von Ommatidien des *Drosophila melanogaster* Komplexauges (Tsunoda et al., 1997). PAR-3 könnte mit seinen 3 PDZ-Domänen eine analoge Funktion bei der Assemblierung eines Signalkomplexes in der anterioren Peripherie des *C.elegans* Embryos besitzen.

Die PDZ-Domänen sind das vorherrschende Merkmal einer stetig und schnell wachsenden Familie von Proteinen. Die Domäne selbst ist in der Regel ca. 80-100 AS lang und bindet drei verschiedene Ligandentypen, wobei zwei dieser Interaktionen zu einer Bindung eines Proteins

mit dessen unmittelbarem C-Terminus führen (Cowburn, 1997; Harrison, 1996). Typ I und II PDZ-Domänen binden an C-terminale Peptide mit der Konsensussequenz Thr/Ser-X-Phe/Val/Ala-COOH oder Phe/Tyr-X-Phe/Val/Ala-COOH, wobei X jede beliebige AS darstellen kann. Diese Konsensussequenz enthält also einen hydrophoben Rest, am häufigsten Val, am unmittelbaren C-Terminus. Der dritte PDZ-Domänentyp erkennt interne Peptidsequenzen. Die Röntgenstrukturanalyse verschiedener PDZ-Domänen zeigte, dass bei Typ I und II Domänen ein Peptid mit 4 AS in eine „Carboxylat bindende Schleife“ inseriert wird (Daniels et al., 1998; Doyle et al., 1996; Morais Cabral et al., 1996). Bei Typ III Domänen bildet eine der beteiligten Domänen eine erweiterte Schleife aus, während die andere einen ?-Finger ausbildet, der in diese Schleife passt (Hillier et al., 1999; Tochio et al., 1999).

1.4 Aufgabenstellung

Das Multi PDZ-Domänen Protein Bazooka spielt sowohl bei der Etablierung und Aufrechterhaltung von Epithelstrukturen, als auch bei der Koordination der asymmetrischen Zellteilung in den Neuroblasten der ventralen neurogenen Region eine Rolle.

Bei Beginn dieser Arbeit waren viele der apikalen und basalen Komponenten von Epithel und Neuroblasten noch unbekannt. BAZ schien aufgrund der Homologie zu PAR-3, der Lokalisation sowohl am apikalen Cortex der Epithelien, als auch der NB, sowie dem Vorhandensein zahlreicher Protein-Proteininteraktionsdomänen ein idealer Kandidat für den Einsatz in einem „2-Hybrid-Screen“ zu sein, um weitere Proteine zu identifizieren, die bei den o.g. Prozessen eine Rolle spielen. Mit der Identifizierung von Interaktionspartnern von BAZ wird ein besserer Einblick in den Aufbau und die Funktion des SAC im Epithel erhalten. Damit wird auch die Bedeutung der SAC für die Etablierung und Aufrechterhaltung der ZA transparenter, so dass der Mechanismus, der zur Etablierung der Zellpolarität führt, aufgeklärt werden kann. So können auch weitere Erkenntnisse über die Funktion von BAZ bei der NB-Teilung gewonnen werden

Ziel dieser Arbeit war es, den „2-Hybrid-Screen“ mit den 3 PDZ-Domänen von BAZ durchzuführen, und die erhaltenen Interaktionspartner zu charakterisieren. Für letzteres sollten Antikörper gegen die entsprechenden Proteine erzeugt und durch konfokale Laser-Mikroskopie die Lokalisation und Verteilung der Proteine im WT-Embryo und Mutanten untersucht werden.

II. Material und Methoden

2.1 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 deionisiertem Wasser angesetzt und autoklaviert oder, falls dies nicht möglich war, sterilfiltriert.

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

Kitsysteme:

- Jetstar Plasmid Midi Kit, *Genomed*, Bad Oeynhausen
- Jetquick Gel Extraction Spin Kit, *Genomed*, Bad Oeynhausen
- Nucleobond AX, *Macherey-Nagel*, Düren
- 3'/5'-RACE Kit, *Roche Diagnostics*, Mannheim
- DIG-High Prime, *Roche Diagnostics*, Mannheim
- DIG RNA Labeling Mix, *Roche Diagnostics*, Mannheim
- TOPO TA Cloning Kit, *Invitrogen*, Groningen, Niederlande
- Y-DERTM Yeast DNA Extraction Reagent Kit, *Pierce*, Rockford, Illinois
- BM Chemiluminescence Blotting Substrate, *Roche Diagnostics*, Mannheim
- rediprime II random prime labelling system, *Amersham Pharmacia Biotech*, Buckingham-shire, England

Radiochemikalien:

P³²-dCTP für DNA/RNA-Hybridisierungen von *Hartmann*, Braunschweig

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
Bildverarbeitung:	Adobe Photoshop, <i>Adobe Systems</i> , San Jose, USA Canvas 6, <i>Deneba Systems</i> , Miami, USA

2.1.1 Bakterienstämme

Bezeichnung	Verwendungszweck	sonstiges
DH5?	Standardwirt für diverse Plasmide	
XL1-blue MRF'	Standardwirt für diverse Plasmide, Wirt für ?ZAPII	Tetrazyklin-Resistenz

Tab. 1: eingesetzte Bakterienstämme

2.1.2 Plasmid-Vektoren

pBluescript KS (+)	Vektor für Subklonierung, Sequenzierung, <i>in vitro</i> -Transkription (<i>Stratagene</i> , Heidelberg)
pGEX-4T-1(-2 u. -3)	Vektor zur Erzeugung von GST-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i> (Smith und 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)

pAS2-1	Hefe-Expressionsvektor zur Herstellung von Fusionsproteinen mit der DNA-Bindungsdomäne von GAL4 (<i>Clontech</i> , Heidelberg)
pACT2	Hefe-Expressionsvektor zur Herstellung von Fusionsproteinen mit der Aktivierungsdomäne von GAL4 (<i>Clontech</i> , Heidelberg)

2.1.3 cDNA-Bank

Für die Zweittransformation des bereits mit dem Köderplasmid transformierten Hefestammes wurde die Matchmaker cDNA-Bibliothek der Firma *Clontech*, Heidelberg verwendet. Die cDNA von 0-24h alten Embryonen von *Drosophila melanogaster* ist hier zwischen die *EcoRI*- und die *XhoI*-Restriktionsschnittstellen des pACT2-Vektors kloniert worden, wobei zwischen der *EcoRI*-Schnittstelle und der cDNA eine Linker-Sequenz von 14 Basen mit der Sequenz GCGGCCGCGTCGAC eingefügt wurde. Innerhalb dieses Bereiches befinden sich die Schnittstellen *NotI* und *SalI*, die die Umklonierung der cDNA in andere Vektoren ermöglichen. Die durchschnittliche Grösse der cDNAs dieser Genbank wird vom Hersteller mit 1,4kb angegeben. Die Genbank wird in Form einer Bakterienkultur von *E.coli* BNN132 geliefert, die Zahl unabhängiger Klone mit $3,0 \times 10^6$ angegeben.

2.1.4 Oligonukleotide

Die folgenden synthetischen Oligonukleotide (*BioTeZ*, Berlin-Buch) wurden im Rahmen dieser Arbeit für PCR, RT-PCR und 3'-RACE eingesetzt:

Bezeichnung	Länge	Sequenz (5'->3')	Verwendung
Baz1140	33	TT <u>CCCCGGG</u> GAATGAAGGTCACCG TCTGCTTC GGC	vollständiger baz-ORF
Baz5657	31	TC <u>CCCCGGG</u> GCAATGTGTTTCAGC ACTCGGTGG	vollständiger baz-ORF
BazNtermrev	27	CT <u>GGATCC</u> CCTCGTTGATGATCA GCAGC	Klonierung der N-Terminalen 317 AS von Baz in pGEX

BazCtermfor	28	G <u>ACCCGGG</u> AAGTTCCAGTGAC ATTCTGG	Klonierung der C-Terminalen 724 AS von Baz in pGBT9
BazCtermrev	27	T <u>CCCCGGGG</u> CAATGTGTTCAG CACTCG	Klonierung der C-Terminalen 724 AS von Baz in pGBT9
PDZ2010	29	T <u>GGAATTC</u> GAGAGCAAGCGAA AGGAGCCC	Klonierungen für Baz-Bereiche ab AS 291
PDZ3350	30	G <u>CGGATCC</u> CAA GAT CTT GCG GCC TAC CAG C	Klonierungen für Baz-Bereiche bis AS 737
PDZ2784	30	G <u>GGGATCCC</u> GCCACACCAGCA CTTTTCTCC	Klonierungen für Baz-Bereiche bis AS 548
PDZ2341	31	T <u>GGAATTC</u> CAACAGCGTGACT CTAAGGTGGC	Klonierungen für Baz-Bereiche ab AS 401
PDZ2361	30	C <u>AGGATCCC</u> CACCTTAGAGTC ACGCTGTTG	Klonierungen für Baz-Bereiche bis AS 407
PDZ2946	29	A <u>GGAATTC</u> GCTTCAAATGACA GCCTGCCG	Klonierungen für Baz-Bereiche ab AS 603
AKNTERM	32	T <u>TGAATTC</u> ATGAAGGTCACCG TCTGCTTCGGC	Klonierung der N-Terminalen 317 AS von Baz in pGEX
AK2029	29	G <u>TCTCGAG</u> GGCTCCTTTTCGCTT GCTCTCC	Klonierungen für Baz-Bereiche bis AS 297
5' Par- 6Hom275	36	T <u>CCCCGGG</u> GATGTCGAAGAAC AAGATAAACACAACG	Klonierung des DmPar-6 in pGBT9 und pAS2-1
3' Par- 6Hom1530	34	A <u>TGAGCTC</u> GATCAGTGTACAT GTGAATAAG TTGG	Klonierung des DmPar-6 in pGBT9 und pAS2-1
DmaPKC 397	29	G <u>TAGATCT</u> TCGCAAATTCTGA ACGACGGC	Klonierung der DaPKC in pACT2
DmaPKC2130	29	C <u>TGAATTC</u> TGACATGGCGAGT GGTGCTCG	Klonierung der C-Terminalen 539 AS von DaPKC in pACT2
APKC-rev	23	GTTGATATTGCTGCTGCTGCTG C	Nested PCR für RACE-Klonie- rung des aPKC C-Terminus
APKC-for1916	22	CTGACCGTTTGGGCTGCCATCG	Nested PCR für RACE-Klonie- rung des aPKC C-Terminus

DLTGBT9for	27	AG <u>GAATTC</u> CAGCATCCGTCCA TGTTGC	Klonierung von <i>dlt</i> in pGBT9
DLTGBT9rev	26	TGG <u>TCGACT</u> TCGTTATCGTAAC ACCC	Klonierung von <i>dlt</i> in pGBT9
DLTACT2for	26	GCGAATTCAGCATCCGTCCAT GTTGC	Klonierung von <i>dlt</i> in pACT2
DLTACT2rev	26	TG <u>CTCGAG</u> TTCGTTATCGTAAC ACCC	Klonierung von <i>dlt</i> in pACT2
PTENfor	28	TTGGATCCAAATGGCCAACAC TATTTTCG	Klonierung von <i>pten</i> in pGBT9
PTENrev	23	AGCTGCAGGTATGTTGATTCA CC	Klonierung von <i>pten</i> in pGBT9
DmTollfor	28	TGGGATCCACATGAGTCGACT AAAGGCC	Klonierung von <i>toll</i> in pACT2
DmTollrev	27	TCCTCGAGCTATACGTCGCTCT GTTTG	Klonierung von <i>toll</i> in pACT2
18Whom492	17	CTTTATCGCCAAGCTCC	Sequenzierungsprimer
Insc232	27	AACCCGGGAATGTCCTTTCAG CGCAGC	Klonierung von <i>insc</i> in pACT2
Insc2810	28	GTAGATCTTAGACGAAACTCT CCTGACG	Klonierung von <i>insc</i> in pACT2
Mut2810	22	GTAGATCTTAGGCGAAAGCCT CCTGACGTGTAAATT	Klonierung von <i>insc</i> mit veränderten C-Terminus in pACT2
EcoRI3350	30	GCGAATTC AAGATCTTGCGG CCTACCAGC	wie PDZ3350, jedoch veränderter angefügter Schnittstelle
PTEN03T	33	AAGCTCGAGTTATGATTCACC GGATTCCCAATC	Pten C-Terminus ohne die letzten 3 AS in pACT2
PTEN3Z4	33	AAGCTCGAGTTATTCGGATTC CCAATCTTCCTC	Pten C-Terminus von Pten3 in pACT2
KACTfor	19	CCCCGGGATCCGAATTCG	Amplifikation eines pACT2 Inserts

Tab. 2: eingesetzte Oligonukleotide

Anmerkung: **Fett** gedruckte und unterstrichene Basen dokumentieren Abweichungen von der 'template'-DNA-Sequenz. Um die Subklonierung der PCR-Produkte zu erleichtern, wurden künstliche Restriktionsschnittstellen eingeführt.

2.2 Molekularbiologische Methoden

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

Bei der Elution von DNA aus Agarosegelen und der Aufreinigung von PCR-Produkten wurde der Jetquick Gel Extraction Spin Kit bzw. der PCR-Aufreinigungs-Kit der Firma *Genomed*, Bad Oeynhausen, unter Berücksichtigung der Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.1 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 12.5?g/ml Tetrazyklin hinzufügen) und üN bei 37°C, 225upm inkubieren
- 500ml vorgewärmtes SOB -Mg²⁺ ohne Tetrazyklin mit 7.5ml der üN-Kultur animpfen und
bei 37°C, 150upm bis zu einer OD von 0.6-0.8 wachsen lassen
- überführen in vorgekühlte Zentrifugenbecher und 15min auf Eis inkubieren

Zwischen den nun folgenden Zentrifugationsschritten sollten die Becher bzw. Röhrchen immer auf Eis stehen

- 15min bei 4°C, 4000upm zentrifugieren und den Überstand vorsichtig abgiessen
- Pellet zunächst in 100ml kaltem 10%Glyzerin resuspendieren, dann weitere 400 ml kaltes 10% Glyzerin hinzufügen
- nochmals 15min bei 4°C, 4000upm zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Pellet wie vorher in 500ml kaltem 10% Glyzerin

- resuspendieren, wie vorher zentrifugieren
- Überstand bis auf ca. 20-30ml verwerfen und resuspendiertes Pellet in 30ml Zentrifugenröhrchen (JA20) überführen
 - Zellen 5min bei 4°C, 5000upm pelletieren
 - Überstand vollständig entfernen und Pellet in 1.5ml kaltem 10% Glycerin resuspendieren
 - Aliquots à 50?l in Eppendorf-Gefässe überführen und in flüssigem Stickstoff schockgefrieren. Lagerung unbedingt bei -70°C

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

Lösungen:

SOB -Mg²⁺: 2% Bactotrypton; 0.5% Bactoyeast; 10mM NaCl; 2,5mM KCl

2.2.2 Transformation elektrokompetenter Bakterien

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

- Ligation 1:10, Mini/Midi 1:50 bis 1:100 in H₂O verdünnen
- auf Eis 1?l der DNA-Lösung zu 50?l kompetenten Zellen geben, mischen und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettieren
- Elektroporation durchführen, die Bakteriensuspension mit 600?l SOC auffüllen und in ein Eppendorf-Gefäss überführen
- 1h bei 37°C inkubieren
- bis zu 300µl auf eine LB-Amp-Agarplatte (100?g/ml Ampicillin) ausstreichen und üN bei 37°C inkubieren

Lösungen:

SOC: 2% Bactotrypton; 0.5% Bactoyeast; 10mM NaCl; 2,5mM KCl;
10mM MgCl₂; 10mM MgSO₄; 20mM Glucose

LB: 1% Bactotrypton; 0.5% Yeast-Extract; 1% NaCl
LB-Agar: 6,25g Agar/500ml LB
Ampicillin: 100mg/ml Stammlösung in H₂O

2.2.3 Transformation von Hefen

(modifiziert nach Gietz et al., 1994)

- Animpfen einer 10ml üN-Kultur mit einer Einzelkolonie. Die Platte mit den
- Kolonien sollte nicht älter als 1 Monat sein
- Die üN-Kultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2 verdünnen und bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 inkubieren
- 20ml der Kultur in sterilen JA20 Röhrchen 5min mit 5000upm bei RT abzentrifugieren
- Zellpellet mit 10ml sterilem Wasser waschen
- mit 10ml sterilem 0,1M Li-Acetat waschen
- Zellpellet in insgesamt 300µl 0,1M Li-Acetat resuspendieren und in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführen
- kompetente Zellen 15min bei 30°C inkubieren
- nacheinander 2,5µl denaturierte Heringssperma-DNA[20mg/ml], 1-3µl DNA (~1 µg) und 50µl kompetente Zellen zu 300µl PTL-Lösung geben
- 30min bei 30°C und 20min bei 42°C im Wasserbad inkubieren
- Transformationsansatz kurz bis 7000upm anzentrifugieren, Zellpellet in 1ml YPD-Medium resuspendieren und 1h bei 30°C schütteln
- Zellen mit 1ml sterilem Wasser waschen und auf selektivem Medium ausplattieren
- Platten bei 30°C inkubieren, Transformanden nach 3-4 Tagen sichtbar

Lösungen:

PTL-Lösung: 4ml 50%PEG3350 in 1xTE; 0,5ml Wasser; 0,5ml 1M Li-Acetat

YPD-Medium: 2%Glukose; 1%Hefeextrakt; 1%Pepton

Selektivmedium: 0,67% „Yeast nitrogen base w/o amino acids“; 50ml 40% Glukose; 100ml

10 x DO-Mix ad 1Liter.

Die 40%ige Glukose Stammlösung wird separat autoklaviert, ebenso die 10fach konzentrierte Lösung aller nichtselektiven Aminosäuren (10 x DO-Mix)

10 x DO-Mix: 300mg Ile; 1500mg Val; 300mg Ade; 200mg Arg; 300mg Lys; 200mg Met; 500mg Phe; 2g Thr; 300mg Tyr und 200mg Ura; mit H₂O auf 1l auffüllen

Für die Herstellung von festen Nährböden wurde dem Medium vor dem Autoklavieren jeweils 2% Agar zugesetzt. Für eine Selektion auf Histidin wurde das Medium auf ca. 60°C abgekühlt und 50ml sterilfiltriertes 1M 3-Aminotriazol zugesetzt.

2.2.4 X-Gal Filtertest

Bei einer Selektion auf Leu⁻/Trp⁻ wurden die nach 4 Tagen herangewachsenen Transformanten einem X-Gal Filterassay unterworfen, positive Kolonien sind durch eine Blaufärbung charakterisiert, da bei einer Interaktion der Fusionsproteine in der Hefezelle das unter UAS-Kontrolle stehende lacZ Reportergen exprimiert werden kann. Der Nachteil bei dieser Art der Selektion ist, dass die positiven Kolonien oft in unmittelbarer Nähe zu anderen Kolonien sind und ein weiterer Isolationsschritt erforderlich ist. Die positive und die unmittelbar benachbarten bzw. überlappenden Kolonien werden mit einer Impfoese von der Petrischale abgenommen und in 150µl YPDA-Medium resuspendiert. Dieses wird in verschiedenen Verdünnungsstufen auf neue selektive Platten ausplattiert.

- eine Whatman-Filterpapierscheibe luftblasenfrei in 2ml Z-Puffer/X-Gal-Solution legen,
überstehende Flüssigkeit abziehen
- eine sterile, verstärkte NC-Membranscheibe auf die Hefekolonien legen, diese bleiben an
der Membran haften
- NC-Membran für ca. 15sec in flüssigen Stickstoff halten
- nach dem Auftauen die Membran mit den Kolonien nach oben auf das mit ZPuffer/X-Gal

getränkte Whatmanpapier legen und bei 30°C einige Stunden bis üN inkubieren

Lösungen:

Z-Puffer/X-Gal-Solution: 100ml Z-Puffer; 0,27ml β-Mercaptoethanol; 1,67ml X-Gal-Lösung

Z-Puffer: 62mM Na₂HPO₄ x 7H₂O; 40mM NaH₂PO₄ x H₂O; 10mM KCl; 1mM MgSO₄ x 7H₂O; pH 7.0, autoklavieren

X-Gal-Lösung: 20mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galactopyranosid in N,N-dimethylformamid (DMF)

2.2.5 Isolierung von DNA

2.2.5.1 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

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 üN-Kultur für 1min bei 13000upm abzentrifugieren
- Pellet in 300µl E1 resuspendieren
- 300µl E2 zusetzen, invertieren
- 5min bei RT inkubieren (nicht länger)
- 300µl E3 zusetzen, invertieren
- 10min bei RT mit 13000upm zentrifugieren, Überstand in frisches Eppendorf-Gefäß überführen und mit 630µl Isopropanol fällen
- 30min bei 13000upm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet mit kaltem 70% Ethanol waschen und 5min bei 13000upm zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Pellet lufttrocknen und in 40-50µl TE aufnehmen

Lösungen:

E1: 50mM Tris-HCl pH 8.0; 10mM EDTA; 100µg/ml RNaseA, gelagert bei 4°C

E2: 200mM NaOH; 1% SDS

E3: 3.0M Kaliumacetat pH 5.5

TE: 10mM Tris-HCl; 1mM EDTA, pH 8.0

Für Klonierungen, Sequenzierungen, *in vitro*-Transkriptionen und die Transformation von Fliegen wird DNA in grösseren Mengen und von höherer Reinheit benötigt (Midi-Präp). Zu diesem Zweck wurden gemäss den Angaben der Hersteller die Plasmid Midi Kits der Firmen *Genomed*, Bad Oeynhausen (Jetstar Plasmid Midi Kit), und *Macherey-Nagel*, Düren (Nucleobond AX), eingesetzt.

2.2.5.2 Präparation von DNA aus Hefe

Für die Isolierung der DNA aus Hefe wurde der Y-DERTM Yeast DNA Extraction Reagent Kit von *Pierce*, Rockford, entsprechend der Anleitung des Herstellers benutzt.

2.2.5.3 Präparation von genomischer DNA aus *Drosophila*

(modifiziert nach Hamilton und Zinn, 1994)

- ca. 50 betäubte Fliegen in einem Eppendorf-Gefäss sammeln und in flüssigem Stickstoff schockgefrieren
- Fliegen mit einem Homogenisator (Bio-Vortexer, *Biospec Products*, Bartlesville, (USA)) weitestgehend pulverisieren
- 200?l Extraktionspuffer zugeben, homogenisieren und portionsweise weitere 200?l Extraktionspuffer zugeben
- 30min bei 65°C inkubieren
- 800?l 6M Lithiumchlorid/ 5M Kaliumacetat (2,5:1) hinzufügen, vorsichtig mischen und 10min auf Eis inkubieren
- 15min bei 13000upm zentrifugieren, 1ml des Überstandes vorsichtig in ein frisches Eppendorf-Gefäss überführen
- 600?l Isopropanol zugeben, mischen, 15min bei 13000upm zentrifugieren
- Pellet mit 70% Ethanol waschen, 5min bei 13000upm zentrifugieren, Pellet trocknen und in 100?l TE aufnehmen

Lösungen:

Extraktionspuffer: 100mM Tris-HCl pH 8.0; 100mM EDTA pH 8.0; 1% SDS

2.2.5.4 Präparation von Plasmid-DNA der Matchmaker cDNA-Bibliothek

- Bestimmung des Bakterientiters (cfu) der Bank auf Lb^{amp} Platten mit 145cm ?
- auf 100 Lb^{amp} Platten mit 145cm ? die Bank so ausplattieren, dass die Platten üN nahezu confluent sind
- Kolonien in jeweils 5ml LB/25%Glyzerin resuspendieren (mit Zellkulturschaber) und die resuspendierten Kolonien von allen 100 Platten vereinigen
- Die Plasmid-DNA aus dem Bakteriensuspensat über Plasmid-Giga-Kit Säulen der Fa. *Quiagen*, Hilden, isolieren

2.2.6 Northern-Transfer

In Analogie zum Southern-Transfer von DNA beschreibt der Northern-Transfer die Übertragung von Gesamt- und polyA⁺-RNA auf Nylonmembranen. Die RNA wird nach spezieller Vorbehandlung unter denaturierenden Bedingungen in einem Formaldehyd-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und dieses anschliessend direkt für den Northern-Transfer eingesetzt. Der Northern-Transfer erfolgte auf Hybond-N-Nylon-Membranen (*Amersham Pharmacia Biotech*, Buckinghamshire, England).

- Aufbau der Northern-Transfer-Apparatur (Sambrook et al., 1989), RNA-Transfer üN in 20xSSPE
- Northern-Transfer-Apparatur abbauen, Nylonmembran trocknen und RNA bei 120000?J am UV-Stratalinker 2400, *Stratagene*, La Jolla, USA, „crosslinken“

Lösungen:

- RNA-Gel: 1,5g Agarose + 10ml 10xMOPS + 87ml H₂O aufkochen, bei ca. 70°C Zugabe von 5.1ml 37% Formaldehyd, mischen und Gel giessen;
Laufpuffer: 1xMOPS
- Proben: 9?1 RNA + H₂O, 10?1 deionisiertes Formamid, 4?1 37% Formaldehyd, 3?1 10xMOPS, 1?1 Ethidiumbromid (500? g/ml) mischen; 5min bei 65°C inkubieren; anschliessend auf Eis stellen, 3?1 Blaumarker hinzufügen und aufs Gel auftragen

Blaumarker:	70% Glycerin; 0.1% Bromphenolblau; 0.1% Xylencyanol
10xMOPS:	0,2M MOPS; 0,05M Natriumacetat; 0,01M EDTA
20xSSPE:	3,6M NaCl; 0,2M NaH ₂ PO ₄ ; 0,02M EDTA; pH 7.4

2.2.7 Erzeugung spezifischer Nukleinsäure-Sonden

Zur Erzeugung einer markierten Nukleinsäure, die an membrangebundene DNA oder RNA (Southern- bzw. Northern-Blot) binden kann, besteht die Möglichkeit entweder radioaktive Nukleotide wie z.B. P³²-dCTP, oder durch spezifische Antikörper nachweisbare DIG-markierte Nukleotide in die DNA einzubauen. DIG-markierte DNA und RNA kann auch sehr gut zur Lokalisation der RNA in Fliegenembryonen eingesetzt werden.

2.2.7.1 Radioaktivmarkierung von DNA-Sonden

Zur Herstellung von radioaktiv markierten DNA-Sonden wurde das rediprime II random prime labelling system von *Amersham Pharmacia Biotech*, Buckinghamshire, England, nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Prinzipiell binden in ihrer Sequenz zufällige Hexanukleotide ('random primer') an die denaturierte 'Muster'-DNA ('template') und dienen somit als Startstellen für das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I, welches dann die radioaktiv markierte DNA-Sonde synthetisiert.

2.2.7.2 DIG-Markierung von DNA- und RNA-Sonden

Bei der DIG-Markierung von DNA wird im Prinzip genauso vorgegangen wie bei der Markierung mit radioaktiven Nukleotiden. Für die Reaktion wurde der Random-Prime DNA-Labeling Kit von *Roche*, Basel, Schweiz, verwendet.

Für die Herstellung von DIG-markierter RNA wurde die entsprechende DNA-Matrize in einen Vektor zwischen zwei gegenläufige Promotersequenzen kloniert. Dieser Vektor wurde dann entweder vor oder hinter der klonierten cDNA mit einem Restriktionsenzym gespalten, je nachdem, ob sense oder antisense RNA erzeugt werden sollte.

Es wurde sowohl DIG-markierte RNA für das Insert in BIC4 als auch für BIC1 hergestellt. Das jeweilige Insert wurde mit dem Restriktionsenzym BglII herausgeschnitten und in den

BamHI geschnittenen pBS KS (+) Vektor von *Stratagene*, Heidelberg, eingesetzt. Das neu entstandene Plasmid mit dem Insert aus BIC4 wurde mit pBSBIC4 bezeichnet, das mit dem Insert aus BIC1 dementsprechend mit pBSBIC1. Da das jeweilige Insert bei der Klonierung prinzipiell in (+) als auch in (-) Orientierung im pBS KS (+) vorliegen kann, wurde die Orientierung des Inserts durch Restriktion mit Asp718 für pBSBIC4 und SacI für das pBSBIC1 bestimmt.

Die Plasmide wurden dann mit XbaI oder XhoI geschnitten, also von der jeweiligen Promoterregion ausgesehen hinter dem Insert. Die so geschnittene DNA wurde als Matritze für die Produktion DIG markierter RNA mit dem DIG-RNA „Labeling“-Kit von *Roche*, Basel, Schweiz, eingesetzt. Je nachdem ob mit XbaI oder XhoI geschnitten wurde, ergab sich durch Einsatz von T3 oder T7 RNA-Polymerase (+) oder (-) RNA.

Die erhaltenen markierten RNA Sonden wurden nach der Markierungsreaktion auf einem RNA Gel unter denaturierenden Bedingungen auf ihre Grösse hin getestet.

2.2.8 Hybridisierung und Autoradiographie

Die Hybridisierung von radioaktiv markierten DNA-Sonden an membrangebundene DNA erfolgte nach einem von G.M. Church (1984) entwickelten Protokoll.

- Nylonmembran mindestens 30min bei 65°C in Church-Hyb vorhybridisieren
- Hybridisierung mit der radioaktiv markierten DNA-Sonde in einem möglichst kleinen Volumen Church-Hyb μ N bei 65°C
- Waschen in Church-Wash für mindestens 3 x 20min
- Nylonmembran gegen Röntgenfilm bei -70°C exponieren

Lösungen:

1M Church-Stock: 89g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 900ml H_2O lösen, pH 7.2 mit H_3PO_4 einstellen und auf 1l auffüllen

Church-Hyb: 0,5M Church-Stock, 7% SDS

Church-Wash: 0,04M Church-Stock, 1% SDS

2.2.9 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- oder die wesentlich genauer arbeitende Pfu-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 nested-PCR und 3´-RACE angewandt. Für alle PCR-Anwendungen wurde der Thermocycler PTC-150 der Firma *MJ Research*, Watertown, USA, eingesetzt. Die Aufreinigung aller PCR-Produkte erfolgte mit dem JETquick PCR Purification Spin Kit, *Genomed*, Bad Oeynhausen. Für die Subklonierung von PCR-Produkten, die mit der Taq-Polymerase erzeugt wurden, konnte der TOPO TA Cloning Kit von *Invitrogen*, Groningen, Niederlande, unter Berücksichtigung der Herstellerangaben benutzt werden. Alternativ hierzu wurden künstliche Schnittstellen an die Primerenden angefügt, die dann zur Klonierung des entsprechenden PCR-Fragmentes genutzt werden konnten.

2.2.9.1 Standard-PCR

Die PCR auf Plasmid-DNA erfolgte nach einem Standardprotokoll.

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

<u>template-Mix</u>		<u>Taq-Mix (je Reaktion)</u>	
1?l	‘template’-DNA (1ng/µl)	5?l	10xReaktionspuffer
0,5?l	‘Primer’ 1 (50mM)	4?l	25mM MgCl ₂
0,5?l	‘Primer’ 2 (50mM)	15,5µl	H ₂ O
2?l	dNTP-Mix (je 10mM)	0.5?l	Taq-Polymerase (5U/?l)
21?l	H ₂ O		

Die beiden Ansätze wurden jeweils getrennt auf Eis zusammengemischt und direkt nach Zugabe der Taq-Polymerase zusammen in ein PCR-Gefäß gegeben.

Ein passendes Standard-PCR-Programm sah folgendermassen aus:

	Dauer	Temperatur	Bedeutung
	1-5min	95°C	Denaturierung der DNA
	30sec	95°C	Denaturierung der DNA
35x wdh.	30sec	Primer'- abhängig	Bindung der 'Primer' an die 'template'-DNA ('Annealing')
	1min/1kb	72°C	DNA-Synthese ('Elongation')
	10min	72°C	finale DNA-Synthese ('Elongation')
	halten	4°C	Reaktionsende

Tab. 3: Standard-PCR-Programm

2.2.9.2 3'/5'-RACE

Im Gegensatz zur RT-PCR ermöglicht die RACE-Technologie (rapid amplification of cDNA ends) die spezifische Amplifikation auch unbekannter Sequenzen [Ohara, 1989 #144]. Eine am 5'- u./o. 3'-Ende unvollständige cDNA lässt sich so ohne zusätzliche Sequenzinformationen in beiden Richtungen vervollständigen. Ein aufwendiges Sichten von cDNA-Banken kann so entfallen. Im Laufe dieser Arbeit wurde der RACE-Kit von *Boehringer/Roche Diagnostics*, Mannheim (5'/3'-RACE Kit), eingesetzt. Beim 5'-RACE wird zunächst in einer RT-Reaktion mit einem Oligo-dT-Primer bzw. einem genspezifischen Primer einzelsträngige DNA hergestellt und am 5'-Ende mit einer Ankersequenz versehen. Ein Anker-Primer und ein genspezifischer Primer dienen dann der weiteren Amplifikation. Im Falle des 3'-RACE wird für die RT-Reaktion ein Oligo-dT-Primer mit Ankersequenz verwendet, das gesuchte 3'-Ende des Gens wird dann durch eine PCR mit einem Anker-Primer und einem genspezifischen Primer amplifiziert. Um beim 5'- oder 3'-RACE ein einzelnes PCR-Produkt zu erhalten, sind evtl. weitere PCR-Reaktionen mit inneren, sog. 'nested'-Primern nötig.

2.2.9.2.1 cDNA Synthese

Bei der RT-PCR geht der eigentlichen PCR eine rreverse 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 (Mo-MLV) 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 mit der Hilfe eines Oligo-dT-`Primers´ oder nur die gewünschte Subpopulation durch den Einsatz eines genspezifischen `Primers´, gefolgt von einer PCR mit genspezifischen `Primern´. Für die RT-Reaktion wurde die AMV Reverse Transkriptase der Firma *Roche*, Mannheim, nach Herstellerangaben verwendet.

Nachfolgend ist ein typischer Reaktionsansatz dargestellt:

- 1?l polyA⁺-RNA (ca. 1?g)
- 2?l dNTP-Mix (je 10mM)
- 4?l cDNA-Synthese-Puffer (10x)
- 1?l spezif. `Primer´ o. Oligo-dT-`Primer´ (37,5?M)P
- 1?l AMV Reverse Transkriptase (20U/?l)
- 11?l H₂O

- für 80min bei 50°C inkubieren
- für 10min bei 65°C erhitzen (Inaktivierung der reversen Transkriptase), abkühlen auf Eis

2.2.9.2.2 Amplifikationsreaktion mit `anchor´- und spezifischem Primer

Nach Abschluss der cDNA-Synthese wurde 1µl für die anschließende RACE-Reaktion verwendet. Dabei wurde das PCR-Programm erst einmal mit zwei äusseren Primern (einer

davon der 'anchor'-Primer aus dem 3'/5'-RACE-Kit) durchlaufen. Von dieser ersten Reaktion wurde 1µl für die PCR mit den inneren Primern durchgeführt.

2.2.10 Plasmid-,Rescue“

P-Element-Insertionen in das Genom von *Drosophila melanogaster* können Mutationen mit einem spezifischen Phänotyp hervorrufen. Für die Erzeugung solcher Mutationen werden modifizierte P-Elemente eingesetzt, die anstelle des Transposase-Gens zwischen den „inverted repeats“ einen „origin of replication“, ein Ampicillinresistenzgen und ein *lacZ*-Reportergen tragen (Bier et al., 1989). Zur Kartierung des Insertionsortes des P-Elementes kann man die Methode des sogenannten „Plasmid-Rescues“ anwenden. Das Ziel ist die Bestimmung von DNA-Sequenzen in unmittelbarer Nachbarschaft von P-Element-Insertionen. Durch die Restriktionsspaltung der genomischen DNA eines P-Element-tragenden *Drosophila*-Stammes mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease, anschließender Zirkularisierung der DNA-Fragmente mit einer DNA-Ligase und Transformation in Bakterien lassen sich Plasmide isolieren, die neben den für die Erhaltung des Plasmides notwendigen Sequenzen, auch sich daran anschließende genomische Sequenzbereiche von *Drosophila* enthalten. Neben den Sequenzinformationen kann die Anwesenheit des *lacZ*-Reportergens ausserdem einen ersten Eindruck vom Expressionsmuster des von der Mutation betroffenen Gens vermitteln.

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

2.2.10.1 Restriktionsspaltung genomischer DNA

Welche Restriktionsendonuklease für einen „Plasmid-Rescue“ geeignet ist, hängt von der Art des verwendeten P-Element-Vektors und von der Tatsache ab, ob der Plasmid-Rescue über das 5'- oder 3'-Ende des P-Element-Vektors erfolgen soll. Die präparierte genomische DNA wurde wie folgt gespalten:

- 10?1 genomische DNA
- 2.5?1 10xRestriktionspuffer
- 2?1 RNase A (100? g/ml)

1?l Restriktionsendonuklease (10U)

9.5?l H₂O

- 2.5h bei 37°C inkubieren
- 30min bei 65°C inkubieren (Restriktionsendonuklease hitzeinaktivieren)

2.2.10.2 Ligation und Transformation in kompetente Bakterien

Der durch die Restriktionsspaltung erhaltene „Pool“ von DNA-Fragmenten wird durch die nachfolgende Ligation zirkularisiert und in Bakterien transformiert. Aufgrund der Ampicillin-Selektion überleben jedoch nur solche Bakterien, die das Plasmid-Rescue-Fragment mit dem P-Element-Anteil (inklusive 'origin of replication' und Ampicillinresistenzgen) aufgenommen haben. Die Ligation erfolgt in einem grossen Volumen, um die Wahrscheinlichkeit einer Ligation mehrerer DNA-Fragmente zu einem Plasmid zu minimieren.

15?l gespaltene genomische DNA (entspricht ca. 1 Fliege)

40?l 10xLigase-Puffer

2?l Ligase (4U)

343?l H₂O

- üN bei 16°C inkubieren
- 1ml 100% Ethanol und 40?l 3M Natriumacetat zugeben
- 30min bei 4°C und 13000upm zentrifugieren
- Pellet mit 500?l 70% Ethanol waschen, 5min bei 13000upm zentrifugieren, Pellet trocknen

und in 100?l TE resuspendieren

- 5?l des in TE resuspendierten Ligationsansatzes zur Transformation von sogenannten superkompetenten Zellen einsetzen (wie z.B. die TOP10 Zellen aus dem TOPO TA Cloning Kit von *Invitrogen*, Groningen, Niederlande). Die Transformation erfolgte gemäss den Angaben des Herstellers

2.2.11 Die Herstellung der 2-Hybrid-Konstrukte

Für die Untersuchung einer Protein-Protein Wechselwirkung mit dem 2-Hybrid-System muss eines der Proteine In-Frame an die GAL4-DNA Bindungsdomäne (GAL4BD), das andere an die Aktivierungsdomäne (GAL4AD) des Gal4-Proteins aus *Saccharomyces cerevisiae* fusioniert werden.

2.2.11.1 Gal4BD-Köderkonstrukte

Als Klonierungsvektoren wurden sowohl das pGBT9- als auch das pAS2-1 Plasmid von *Clontech*, Heidelberg, eingesetzt. Die beiden Plasmide enthalten jeweils den codierenden Bereich der ersten 147 AS des Hefe Gal4-Proteins, gefolgt von einer multiplen Klonierungsstelle.

2.2.11.1.1 Gal4BD-BAZ und -PDZ-Konstrukte

Für die Herstellung dieser Köderkonstrukte wurde der komplette codierende Bereich von *bazooka* bzw. bestimmte Teile davon unter Verwendung spezifischer Primer mit angefügten Restriktionsenzymchnittstellen amplifiziert und dann unter Verwendung dieser Schnittstellen in die Vektoren eingesetzt. In der Tabelle 4 ist angegeben, welcher Teil von *baz* in welches Plasmid mit welchen Primern kloniert wurde.

Domäne	AS-Bereich	Vektor	Primer
baz	1-1464	pGBT9	Baz1140/Baz5657
baz	1-1464	pAS2-1	Baz1140/Baz5657
PDZ1-3	291-737	pGBT9	PDZ2010/PDZ3350
PDZ1-3	291-737	PAS2-1	PDZ2010/PDZ3350
PDZ1-2	291-548	pGBT9	PDZ2010/PDZ2784
PDZ2-3	401-737	pGBT9	PDZ2341/PDZ3350
PDZ1	291-407	pGBT9	PDZ2010/PDZ2361
PDZ2	401-548	pGBT9	PDZ2341/PDZ2784

PDZ3	603-737	pGBT9	PDZ2946/PDZ3350
bazNterm	1-317	pGBT9	BazNtermfor/BazNtermrev
bazCterm	741-1464	pGBT9	BazCtermfor/BazCtermrev

Tab.4: Überblick über die Primer und amplifizierte *baz*-Fragmente, die zur Erzeugung von Gal4BD Konstrukten verwendet wurden

2.2.11.1.2 Weitere Gal4BD Konstrukte

Zusätzlich zu den für den 2-Hybrid Screen erzeugten Gal4BD BAZ-Konstrukten wurden auch verschiedene Gal4BD Fusionierungen mit Proteinen erzeugt, die möglicherweise ebenfalls an die für Baz gefundenen Interaktionspartner binden können. In der Tabelle 5 werden diese zusätzlichen Konstrukte und die zu ihrer Erzeugung verwendeten Primer dargestellt.

Protein	AS-Bereich	Vektor	Primer
DmPar-6	1-351	pGBT9	5'Par6Hom275/3'Par6Hom1530
DmPar-6	1-351	pAS2-1	5'Par6Hom275/3'Par6Hom1530
Dlt	1-811	pGBT9	DLTGBT9for/DLTGBT9rev
Dlt	1-811	pACT2	DLTACTfor/DLTACTrev

Tab.5: Überblick über die klonierten Bereiche von Dm Par-6 und Dlt sowie die für die Klonierung verwendeten Primer

2.2.11.2 Gal4AD-Köderkonstrukte

Als Klonierungsvektor für die Erzeugung von Gal4AD-Konstrukten wurde das pACT2 Plasmid von *Clontech*, Heidelberg benutzt. Vor der MCS liegen die C-Terminalen 114 AS des Gal4-Proteins der Hefe, welche die Gal4 Transkriptionsaktivierungsdomäne bilden.

In der Tabelle 6 werden die in pACT2 klonierten Gene bzw. Genabschnitte sowie die für die Klonierung verwendeten Primer angegeben.

Protein	AS-Bereich	Primer
---------	------------	--------

Insc	1-859	Insc232/insc2810
DmaPKC	6-606	
Dlt	1-811	ACTDLTfor/ACTDLTrev
Baz	1-1464	Baz1140/Baz5657
DmPar6	1-351	5'Par6Hom275/3'Par6Hom1530

Tab. 6 Übersicht über in dieser Arbeit erzeugte Gal4AD Fusionskonstrukte

2.2.11.3 Klonierungen zur Verschiebung von Leserastern

Bei einigen der im 2-Hybrid-System gefundenen Klone bricht der mit der GAL4AD "in-frame"- vorliegende Leseraster bereits nach wenigen Nukleotiden ab, während sich bei Verfolgung eines anderen Leserasters ein wesentlich längeres Fusionsprotein bilden liesse. In diesen Fällen wurde eine Umklonierung der cDNA so durchgeführt, dass der entsprechende längere Leseraster nunmehr "in-frame"- mit der GAL4AD vorliegt.

2.2.11.3.1 Rasterverschiebung in BIC5

Zur Bestätigung, dass trotz der Leserasterverschiebung ein Gal4AD-DDI1 (VSM1) Fusions-protein gebildet werden kann, wurde das Insert so umkloniert, dass DDI1/VSM1 „In-Frame“ mit der Gal4AD vorliegen. Hierzu wurde das Insert aus BIC5 mit XmaCI und XhoI ausgeschnitten, die Enden aufgefüllt und dann in den SmaI geschnittenen pACT2 Vektor kloniert (Abb. 4). Hierdurch wurden 2 Nukleotide in die Nterminale Sequenz inseriert.

XmaCI	
GCC CCG GGG ATC CGA ATT CGC GGC CGC GTC GAC	GAA AAT CAC AGT
A P G I R I R G R V D E N H S	
GAC CAG CGA	
D Q R	
GCC CCC CGG GGA TCC GAA TTC GCG GCC GCG TCG ACG	AAA ATC ACA
A P R G S E F A A A S T K I T	
ACG ACC AGC GAT	
T T S D	

Abb.4: „In-Frame“ Klonierung von Klon BIC5. Die XmaCI Restriktionsschnittstelle ist fett gedruckt. Oben: MCS-Bereich von BIC5 mit rot hervorgehobener Linkersequenz und der

sich daran anschliessenden cDNA-Sequenz. Unten: die sich nach Ligation des SmaI geschnittenen pACT2 mit dem XmaCI/XhoI geschnittenen und aufgefüllten Insert aus BIC5 ergebende Sequenz mit verschobenem Leseraster. Die inserierten Nukleotide sind blau hervorgehoben

2.2.11.3.2 Rasterverschiebung in BIC8

Der Klon BIC8 wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI geschnitten, die Enden aufgefüllt und anschliessend religiert (Abb. 5). Hierdurch werden 4 Nukleotide in die Sequenz inseriert, die eine Verschiebung des Leserasters bewirken.

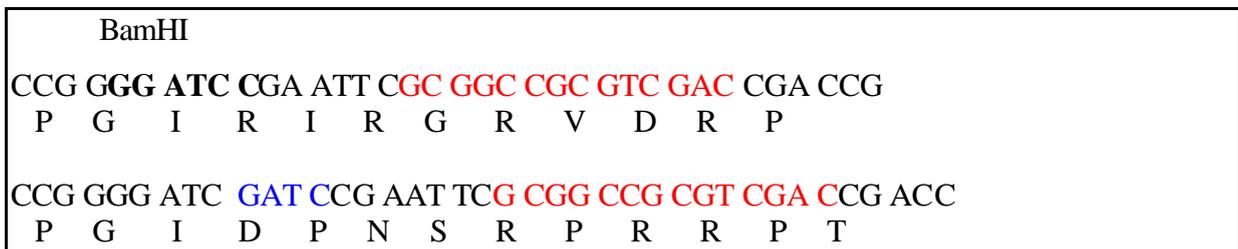


Abb.5: Darstellung der Leserasterverschiebung für BIC8. Oben: Der MCS-Bereich mit der fett gedruckten BamHI Schnittstelle und der rot hervorgehobenen Linkersequenz. Unten: Der MCS-Bereich nach Ligation der aufgefüllten BamHI-Enden mit dem verschobenen Leseraster. Die eingefügten 4 Nukleotide sind blau hervorgehoben.

2.3 Genetische Methoden

2.3.1 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 versehen wurden.

Lösungen:

Standardmedium: 356g Maisschrot; 47.5g Sojamehl; 84g Trockenhefe; 225g
 Malzextrakt;
 75ml 10% Nipagin in Ethanol; 22.5ml Propionsäure; 25g Agar; 200g

Zuckerrübensirup ->mit 4,9l H₂O auffüllen

Apfelsaftplatten: 40g Agar in 1l H₂O; 340ml Apfelsaft; 17g Saccharose
kochen, auf 60°C abkühlen und 30ml 10% Nipagin in Ethanol zugeben

2.3.2 Fliegenstämme, Chromosomen und Allele

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

2.3.2.1 Balancer-Chromosomen

Stämme	Bemerkung	Referenz
<u>1. Chromosom</u>		
FM7	Balancer-Chr.	Lindsley und Zimm, 1992
FM7blue ^{ftz}	Balancer-Chr. mit P(<i>ftz-lacZ</i>)-Insertion	Y.Hiromi
<u>2. Chromosom</u>		
CyO	Balancer-Chr.	Lindsley und Zimm, 1992
<u>3. Chromosom</u>		
TM3	Balancer-Chr.	Lindsley und Zimm, 1992
TM6B	Balancer-Chr.	Lindsley und Zimm, 1992

Tab. 7: verwendete Balancer-Chromosomen

2.3.2.2 Fliegenstämme

Bezeichnung	Bemerkung	Referenz
DPTEN ⁴⁹⁴ FRT40A/CyO	FRT Rekombinante des PTEN-Allels 494	Andreas Wodarz, persönliche Mitteilung
y,w,FLP; DPTEN ^{DJ189} FRT40A/SM5 TM6B	FRT Rekombinante des PTEN-Allels DJ189	(Gao et al., 2000)
ovoD-2L P[mini w+;ovoD1]2L-13X13P[hs neo;ry+;FRT]2L-40A/S Sp Ms(2)M bwD/CyO	Zur Erzeugung von FLP/OvoD Männchen	[Chou,1996#1961] Bloomington Stamm-Nr. 2121
FLP-Stamm y,w,P[ry+;FLP]12;CyO/Sco	Zur Erzeugung von FLP/OvoD Männchen	[Chou,1996#1961] Bloomington Stamm-Nr. 1929
I(2)k16210	P-Elementinsertionslinie mit Insertion in 56F1	BDGP
I(lacZ)H217	P-Elementinsertionslinie	(Liu und Restifo, 1998)

Tab. 8: In dieser Arbeit verwendete Fliegenstämme

2.3.3 Erzeugung von Keimbahnklonen

Ein Phänotyp, der durch die Mutation oder das Fehlen eines bestimmten Genes verursacht wird, kann vor allem in frühen Stadien der Embryogenese nur dann richtig charakterisiert werden, wenn die maternale Komponente der heterozygoten Mutter ausgeschaltet wird.

Dieses wird dadurch erreicht, dass in heterozygoten Larven durch induzierbare somatische Rekombination die Keimbahnzellen homozygot mutant werden.

Zur Erzeugung der Keimbahnklone wurde das FLP-DFS System von Chou und Perrimon angewendet (Chou und Perrimon, 1992).

2.4 Histologische Methoden

2.4.1 Verwendete Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper werden in den folgenden 2 Tabellen aufgelistet:

Antikörper	Beschreibung	Verdünnung	Referenz
? -? -gal	polyklonaler Kaninchen Antikörper	1:5000	Cappel
? -BazN-Term	polyklonaler Ratten-Antikörper	1:500	Diese Arbeit

? -BazN-Term	polyklonaler Kaninchen-Antikörper	1:500	Diese Arbeit
? -BazC-Term	polyklonaler Ratten-Antikörper	1:500	Diese Arbeit
? -PTEN	polyklonaler Ratten-Antikörper	1:100	Diese Arbeit
? -PTEN	polyklonaler Kaninchen-Antikörper	1:100	Diese Arbeit
? -Insc	polyklonaler Kaninchen-Antikörper	1:2000	Chia
? -DIG-AP	monoklonaler Maus - Antikörper	1:2000	Boehringer/Roche Diagnostics
22C10(? -Futsch)?	monoklonaler Maus - Antikörper	1:50	Klämbt
? -NT?	polyklonaler Maus - Antikörper	1:5	[Hortsch, 1990 #2432]
? -Toll-7	polyklonaler Ratten-Antikörper	1:500 1:1000	- diese Arbeit

Tab.9: verwendete primäre Antikörper

Esel-? -Kaninchen-Cy3	polyklonaler Esel-Antikörper	1:200	Dianova
Esel-? -Maus-Cy5	polyklonaler Esel-Antikörper	1:200	Dianova
Ziege-? -Maus -HRP	polyklonaler Ziegen-Antikörper	1:750	Dianova
Ziege-? -Kaninchen-HRP	polyklonaler Ziegen-Antikörper	1:750	Dianova
Ziege-? -Ratte-HRP	polyklonaler Ziegen-Antikörper	1:750	Dianova

Tab.10: verwendete sekundäre Antikörper

2.4.2 Antikörperfärbung an Embryonen

Um die Fliegenembryonen für die Antikörper zugänglich zu machen, müssen die äusseren Hüllen (Chorion und Vitellinmembran) entfernt werden. Zur anschliessenden Fixierung der Embryonen werden verschiedenen Methoden angewandt, da die Art der Fixierung Einfluss auf die Ergebnisse der Antikörperfärbung besitzen kann.

2.4.2.1 Fixierung in Formaldehyd

- Embryonen dechorionisieren (ca. 4 min in Natriumhypochlorit), anschliessend gut mit H₂O waschen
- Embryonen in Eppendorf-Gefäss mit Fixierlösung überführen und 10 bis 15min invertieren
(Über-Kopf-Rotor) fixieren
- Embryonen devitellinisieren: wässriges Fixativ (untere Phase) abziehen, 500?l Methanol zugeben und 30sec vortexen, Embryonen absinken lassen.
- 2-3 x in Methanol waschen, dann 10min in Methanol stehen lassen
- Mit der Antikörperfärbung fortfahren oder Embryonen in Methanol bei -20°C lagern

Lösungen:

Fixierlösung: 200?l PBS; 125?l 37% Formaldehyd; 300?l Heptan

2.4.2.2 Hitzefixierung

- Embryonen dechorionisieren (ca. 4 min in Natriumhypochlorid), anschliessend gut mit H₂O waschen
- Embryonen in ein Szintillationsgefäss mit 2ml kochender 1 x Tritonsalzlösung überführen, kurz schütteln und nach wenigen Sekunden das Szintillationsgefäss mit eiskalter 1 x Tritonsalzlösung auffüllen
- Nach 2-3minütiger Inkubation auf Eis die Tritonsalzlösung abschütten und jeweils 2,5ml Heptan und Methanol zugeben
- 30sec vortexen, Embryonen absinken lassen und frisches Methanol zugeben
- die Embryonen in eine Pipette mit breiter Öffnung aufnehmen, in frisches Methanol überführen, 2-3 x mit Methanol waschen
- Mit der Antikörperfärbung fortfahren oder Embryonen in Methanol bei -20°C lagern

Lösungen:

Tritonsalzlsg.: 1l H₂O, 0.3ml TritonX-100, 4g NaCl

2.4.2.3 Antikörperfärbung

- frische oder eingefrorene Embryonen mit 1 x PBT waschen
- Embryonen 3 x 20min in 1xPBT + 5% NHS (Pferdeserum) 'blocken'
- Inkubation der Embryonen mit dem ersten Antikörper (in 1xPBT + 5% NHS) üN bei 4°C
- ersten Antikörper abziehen und durch 1xPBT ersetzen
- 3 x 20min 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
- 3 x mit PBT waschen und in Mowiol einbetten

Lösungen:

Mowiol: 5g Mowiol in 20ml PBS geben, 16h bei RT rühren, 10ml Glycerin hinzufügen und wieder 16h bei RT rühren, 15min mit 4000upm zentrifugieren, den Überstand aliquotieren und bei -20°C aufbewahren. Nach dem Auftauen eine Spatelspitze 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]-Octan zusetzen und 1h auf einem Über-Kopf-Schüttler inkubieren.

2.4.3 X-Gal-Färbung an Embryonen

- Embryonen dechorionisieren (ca. 4min in Natriumhypochlorit) und gut mit H_2O waschen
- Embryonen in Eppendorf-Gefäss mit ca. 500 μl Fixierlösung überführen und 10min am Über-Kopf-Rotor fixieren
- Embryonen solange mit 1xPBT waschen, bis sie nicht mehr aneinanderhaften (1xPBT dabei häufiger austauschen)
- Embryonen in 3er Blockschälchen überführen, 1xPBT abziehen und durch 200 μl Färbelösung ersetzen
- Färbung unter häufiger Kontrolle bei RT oder 37°C , eventuell $\ddot{\text{u}}\text{N}$ im Kühlschrank
- Färbelösung abziehen, mehrfach mit 1xPBT waschen und mehrere Stunden bis $\ddot{\text{u}}\text{N}$ im Kühlschrank in 50% Glycerin inkubieren
- in 100% Glycerin einbetten und gegebenenfalls mit Nagellack versiegeln

Lösungen:

Fixierlösung: im Schliffreagenzglas: 0.5ml 50% Glutaraldehyd, 1.5ml 1xPBS,

8ml Heptan; schütteln und aus oberer Heptanphase 6ml weiterverwenden

10xPBS: 1.3M NaCl, 0.07M Na_2HPO_4 , 0.03M NaH_2PO_4 , ad 1l mit H_2O auffüllen und autoklavieren; für 1xPBS 10xPBS 1:10 mit autoklaviertem H_2O verdünnen

1xPBT: 1xPBS + 0.1% Triton X-100 (*Serva*, nichtionisches Detergenz)

Färbelösung: 20 μl 10% X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactosid)-DMSO in 1ml

X-Gal-Puffer (X-Gal-Puffer bei 50°C vorwärmen, X-Gal-DMSO zugeben und

noch einige min bei 50°C vorinkubieren)

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

2.4.4 *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 425?l 1xPBS, 75?l 37% Formaldehyd und 500?l 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 4.5?l NBT und 3.5?l 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.

2.4.4.1 RNA *in situ*-Hybridisierung mit DNA-Sonde

Zur Herstellung DIG-markierter DNA-Sonden wurde DIG-High Prime von *Boehringer/Roche Diagnostics*, Mannheim, nach Herstellerangaben verwendet und die Sondenkonzentration im Anschluss durch einen Spot-Test ermittelt.

- Embryonen in einem 1:1 Gemisch aus Xylol und Ethanol für 30min inkubieren
- 5 x kurz mit Ethanol, 2 x kurz mit Methanol, 3 x kurz mit 1xPBT waschen
- 20min in 1xPBS + 5% Formaldehyd fixieren
- 5 x kurz mit 1xPBT waschen
- 4min in 1xPBT + 50? g/ml Proteinase K inkubieren (auf keinen Fall länger)
- 2 x 2min mit 1xPBT + 2mg/ml Glycin waschen
- 2 x kurz mit 1xPBT waschen
- 15min in 1xPBS + 5% Formaldehyd nachfixieren
- 5 x kurz mit 1xPBT waschen
- kurz in einem 1:1 Gemisch aus 1xPBT und Hybridisierlösung inkubieren
- 3 x kurz mit Hybridisierlösung waschen
- mindestens 1h in Hybridisierlösung bei 50°C vorhybridisieren
- Überstand abziehen und 30?l Hybridisierlösung + 25ng DNA-Sonde (10min in Hybridisierlösung gekocht und auf Eis/Ethanol abgekühlt) zugeben
- üN bei 50°C hybridisieren
- 30min in Hybridisierlösung bei 50°C waschen
- 30min in einem 1:1 Gemisch aus 1xPBT und Hybridisierlösung waschen
- 5 x 20min mit 1xPBT bei 50°C waschen
- 1h mit präabsorbiertem ? -DIG-Antikörper (1:2000, verdünnt in 1xPBT) inkubieren
- 4 x 15min mit 1xPBT und 3 x 5min mit NBT-Puffer waschen
- Färbereaktion durchführen, Embryonen entwässern und Dauerpräparat anfertigen

Lösungen:

Hybridisierlösung: 50% deionisiertes Formamid, 5xSSC, 100? g/ml denaturierte Lachsspermien-DNA, 100? g/ml Heparin, 0.1% Triton X-100

NBT-Puffer: 100mM NaCl, 50mM MgCl₂, 100mM Tris-HCl pH 9.5, 0.1% Triton X-100

NBT: 75mg/ml Nitroblau-Tetrazolium-Salz in DMF

BCIP: 50mg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat, Toluidin-Salz in DMF

2.4.4.2 RNA *in situ*-Hybridisierung mit RNA-Sonde

Bei der Verwendung einer DIG markierten RNA-Sonde wird im Prinzip nach dem gleichen Protokoll wie bei der DNA vorgegangen. Anders als die DNA wird die RNA vor der Zugabe zu der Hybridisierlösung jedoch nur 10min bei 65°C denaturiert.

2.4.5 Präparation embryonaler Kutikula

Fliegen des gewünschten Genotyps werden ü.N auf Apfelsaftagarplatten 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 Natriumhypochlorit) und nochmaligem Waschen mit H₂O werden die Embryonen auf einem Objektträger in einen Tropfen Hoyers/Lactat überführt und eingedeckelt. Die Klärung erfolgt üN bei 65°C.

Lösungen:

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

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Erzeugung spezifischer Antikörper gegen GST-Fusionsproteine

Für die Erzeugung eines Antikörpers gegen ein bestimmtes Protein wurden möglichst nicht konservierte Bereiche der zugehörigen Gensequenz in einen GST-Vektor kloniert. Nach Expression des Fusionsproteines in Bakterien wurde es extrahiert und für die Immunisierung an *Eurogentec*, Seraing, Belgien gesandt.

2.5.1.1 Herstellung eines GST -Fusionsproteins

Die cDNA wurde *in frame* an das 3'-Ende des Glutathion-S-Transferase (GST)-Gens in den pGEX-4T-1(-2, -3)-Vektor kloniert und die korrekte Orientierung durch eine Restriktionsspaltung überprüft.

Das pGEX-cDNA-Konstrukt wurde in elektrokompente XL1-blue Bakterienzellen transformiert, und in diesen durch Zugabe von IPTG jeweils die Expression des GST-Fusionsproteins induziert. Zur Kontrolle der Induktion wurde jeweils 1ml einer induzierten Kultur und 1ml einer nicht-induzierten Kultur abzentrifugiert, das Pellet in 100µl 2xSDS-Probenpuffer aufgenommen und 20µl auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Nach einer Coomassie-Färbung sollte in der induzierten Probe eine Bande vorkommen, die die erwartete Grösse besitzt und die in der uninduzierten Probe nicht vorkommt. Für die Extraktion des Fusionsproteins wurde folgendermassen vorgegangen:

- Animpfen einer 20ml LB_{amp}-Vorkultur und üN-Inkubation bei 37°C im Schüttler
- 250ml vorgewärmtes LB_{amp} mit der Vorkultur animpfen (OD₆₀₀ < 0,1) und Kultur bei 37°C im Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6-0,8 wachsen lassen
- Bakterien durch Zugabe von 0,5ml 0,5M IPTG (= 1mM) induzieren und weitere 4h wachsen lassen
- 5min bei 5000upm zentrifugieren, um Bakterien zu pelletieren
- Überstand verwerfen, Pellet kann bis zur Aufarbeitung bei -20°C gelagert werden
- Pellet in 10ml eiskaltem 1xPBS vollständig resuspendieren
- 6 x 20sec auf Eis sonifizieren, jeweils 30sec Pause
- 1,1ml 10% Triton X-100 (= 1%) zugeben
- 30min bei Raumtemperatur leicht schüttelnd inkubieren
- 15min bei 10000upm, 4°C, zentrifugieren (Kontrollprobe vom Pellet nehmen!)
- Überstand in Eppendorf-Gefässe überführen und 250?l Glutathion Sepharose 4B zugeben
- 60min bei Raumtemperatur auf dem Taumler inkubieren
- 15min bei 10000upm, 4°C, zentrifugieren (Kontrollprobe vom Überstand nehmen!)
- Glutathion Sepharose 4B abziehen und auf zwei Eppendorf-Gefässe verteilen
- 2min bei 13000upm zentrifugieren und Überstand abziehen
- Glutathion Sepharose 4B dreimal mit je 500?l 1xPBS waschen (zwischendurch jeweils 2min bei 13000upm zentrifugieren und Überstand abziehen)

- Zugabe von 100?l Glutathion Elutionspuffer und Inkubation für 10min bei RT
- 2min bei 13000upm zentrifugieren und Überstand aufbewahren
- Zugabe von 100?l Glutathion Elutionspuffer, Inkubation für 10min bei RT und Zenrifugation für 2min bei 13000upm noch dreimal wiederholen (Überstände sammeln)

Jeweils 10?l des eluierten Proteins und aller Kontrollproben wurden mit 10?l 2xSDS Probenpuffer für 5min aufgeköcht und anschliessend durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie®-blue-Färbung analysiert.

Lösungen:

2 x SDS-Probenpuffer: 100mM Tris-HCl pH 6.8; 200mM DTT; 4% SDS, 0.2% Bromphenolblau, 20% Glycerin

SDS-Elektrophoresepuffer: 25mM Tris; 250mM Glyzin pH 8.3; 0.1% SDS

Glutathion Elutionspuffer: 10mM reduziertes Glutathion in 50mM Tris/HCl pH 8.0

2.5.1.2 BAZ GST-Fusionsproteine

Die codierende Sequenz für die ersten 297 AS des BAZ N-Terminus wurde durch eine PCR-Reaktion mit den Primern BazNtermfor und BazNtermrev amplifiziert und durch Verwendung der angefügten Schnittstellen SmaI und BamHI in den pGEX-4T-1 Vektor kloniert. Der direkte Vergleich zwischen einer induzierten und nicht-induzierten Probe des transformierten Bakterienstammes XL-1 blue zeigte, dass in der induzierten Bakterienkultur zusätzlich zu den sonstigen Proteinen ein ca. 58kDa schweres Protein vorhanden war, wie es von der Grösse des GST-BAZ-N-Term Fusionsproteins erwartet wurde. Das Protein konnte in löslicher Form erhalten und daher mit Glutathion-Sepharose Kügelchen weiter aufgereinigt werden. Mit dem aufgereinigten Protein wurde zunächst eine Ratte und später eine weitere Ratte und ein Kaninchen immunisiert.

Zur Erzeugung eines Fusionsproteins mit den letzten 518 AS vom C-Terminus von Bazooka wurde ein 2,3kb SalI-Fragment mit dem Baz-C-Terminus aus der *baz* cDNA ausgeschnitten und in den pGEX-4T-2 eingesetzt. Das hiermit erzeugte Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 82kDa konnte nicht in löslicher Form erhalten werden und wurde daher aus einem Coomassie® gefärbten Gel ausgeschnitten und in dieser Form für die Injektion einer Ratte bei *Eurogentec*, Seraing, Belgien, benutzt.

2.5.1.3 Pten und Toll-7 GST-Fusionsproteine

Zur Erzeugung eines GST-Pten- und eines GST-Toll-7-Fusionsproteins wurde das jeweilige Insert aus BIC7 bzw. BIC1 mit den Restriktionsenzymen SalI und XhoI ausgeschnitten und zwischen die entsprechenden Schnittstellen des pGEX-4T-3 gesetzt.

Diese Klonierungen und die anschliessende Proteinaufreinigung aus induzierten Bakterienkulturen wurden freundlicherweise von Frau Alexandra Grimm durchgeführt.

Das ca. 48kD grosse GST-Pten Fusionsprotein konnte mit an Sepharose-Kügelchen gebundenem Glutathion aus dem durch Zentrifugation erhaltenen Überstand isoliert werden, das GST-Toll7-Fusionsprotein verblieb dagegen im Zellpellet. Zur Immunisierung mit diesem Protein wurde daher die aus einem Coomassie® gefärbten Gel ausgeschnittene Bande benutzt.

2.5.2 Herstellung von Embryonenextrakten

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

Lösungen:

Lysis-Puffer: 150mM NaCl; 50mM Tris pH 8.0; 1% Triton X-100; inklusive folgenden Protease-Inhibitoren: Aprotinin; Leupeptin; Pepstatin; Pefabloc (je 2? g/ml)

2.5.3 SDS-PAGE-Gelelektrophorese und Western-Blotting

Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine und der anschliessende Transfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte mit Hilfe des Protean2-Systems der Firma *Biorad*, München (Mini Trans-blot), gemäss den Angaben des Herstellers. Die Proteine wurden in 7,5-12%igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt, und nach dem Western-Transfer durch eine Ponceau S-Färbung (0.01% Ponceau S (w/v) in 0.5% Essigsäure (v/v)) überprüft. Bei der Proteindetektion wurde weiterhin wie folgt vorgegangen:

- Nitrozellulosemembran für 1h in Blockierlösung inkubieren
- Einschweissen der Nitrozellulosemembran in Plastikfolie mit 4ml Antikörperlösung
- (Blockierlösung+Antikörper), möglichst luftblasenfrei
- Bei 4°C üN auf einem Taumler inkubieren, dann 4 x 15min in 1xTBST waschen
- Inkubation mit dem entsprechend verdünnten sekundärem Antikörper (POD-gekoppelt); 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

Lösungen:

Trenngel: 2.5ml 30% Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1) für 10%iges Gel; 2.8ml 1M Tris pH 8.8; 76µl 10% SDS; 2.1ml H₂O, 30µl 10% APS; 8µl TEMED

Sammelgel: 310µl 30% Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1); 235µl 1M Tris pH 6.8; 20µl 10% SDS; 1.3ml H₂O; 10µl 10% APS; 5µl TEMED

1xTBST: 50mM Tris pH 7.5; 150mM NaCl; 0.1% Tween

Blockierlsg.: 3% Milchpulver; 1% BSA in 1xTBST

III Ergebnisse

3.1 Erzeugung von Gal4BD-BAZ-Köderkonstrukten

Bazooka besitzt 3 PDZ-Motive (Abb.6). PDZ-Domänen wurden bereits in anderen Arbeiten erfolgreich im „2-Hybrid“-System zur Suche nach Interaktionspartnern eingesetzt (Schneider et al., 1999; Izawa et al., 2002; Kausalya et al., 2001). Daher wurden für den eigentlichen „2-Hybrid-Screen“ die Baz PDZ-Domänen hinter die Gal4BD in dem Hefektor pGBT9 kloniert. Um nach Identifizierung von Interaktionspartnern den Bindungsbereich für diese eingrenzen zu können, wurden die PDZ-Domänen auch einzeln und in Paaren an die GAL4BD in dem pGBT9-Vektor fusioniert. Auch das vollständige Baz-Protein wurde als Köder eingesetzt, um eine eventuelle Homodimerbildung von Bazooka zu untersuchen, und neben der Bindung der isolierten Interaktionspartner an die PDZ-Domänen dies auch für das vollständige Bazooka Protein zeigen zu können. Die jeweils an GAL4BD fusionierten Aminosäurebereiche des Baz-Proteins zeigt die Tabelle 4, eine Übersicht über die jeweils klonierten Bazooka-Bereiche wird in der Abb. 6 gegeben.

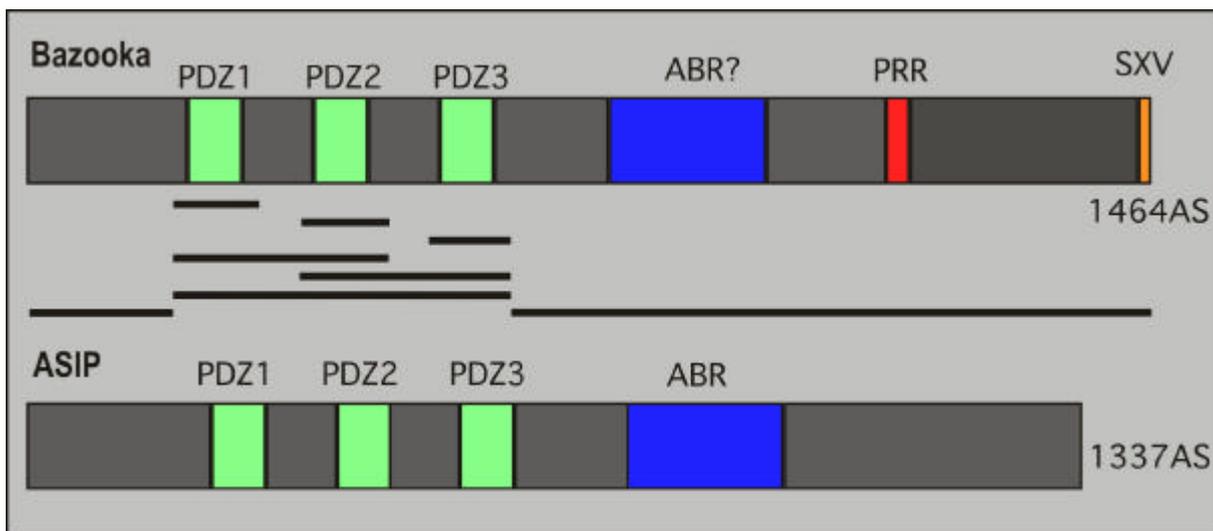


Abb.6: Vergleich des Bazooka-Proteins mit dem Säuger Homolog Asip

Der der aPKC-Binderegion (ABR) in Asip entsprechende Bereich in dem Bazooka-Protein ist blau hervorgehoben. Bazooka besitzt im Gegensatz zu Asip eine Prolin-reiche Region in der Nähe des C-Terminus (PRR) und ein PDZ-Bindemotiv am unmittelbaren C-terminus (-SXV). Die für den „2-Hybrid-Screen“ und Interaktionsstudien klonierten Bazooka-Bereiche sind mit schwarzen Strichen dargestellt.

3.1.1 Erzeugung von Baz spezifischen Antikörpern

Sowohl gegen die N-Terminalen 297 AS als auch gegen die C-Terminalen 518 AS des Baz Proteins wurden spezifische Antikörper erzeugt. Hierzu wurden rekombinante GST-

Fusionsproteine erzeugt, aufgereinigt und für die Immunisierung von Kaninchen und Ratten eingesetzt.

Die erhaltenen Antikörper wurden u.a. für den Nachweis der Kolokalisation der Baz- und Insc-Proteine, sowie für Immunpräzitationsexperimente (durchgeführt von A.Wodarz) mit diesen Proteinen eingesetzt und die Ergebnisse dieser Experimente in der Zeitschrift Nature veröffentlicht (Wodarz et al., 1999). Hierdurch wird die Spezifität des erzeugten Antikörpers gut demonstriert, daher werden die Darstellungen dieser Experimente in der Abb.7 wiedergegeben, ohne jedoch näher auf die dabei untersuchte Interaktion mit Insc einzugehen.

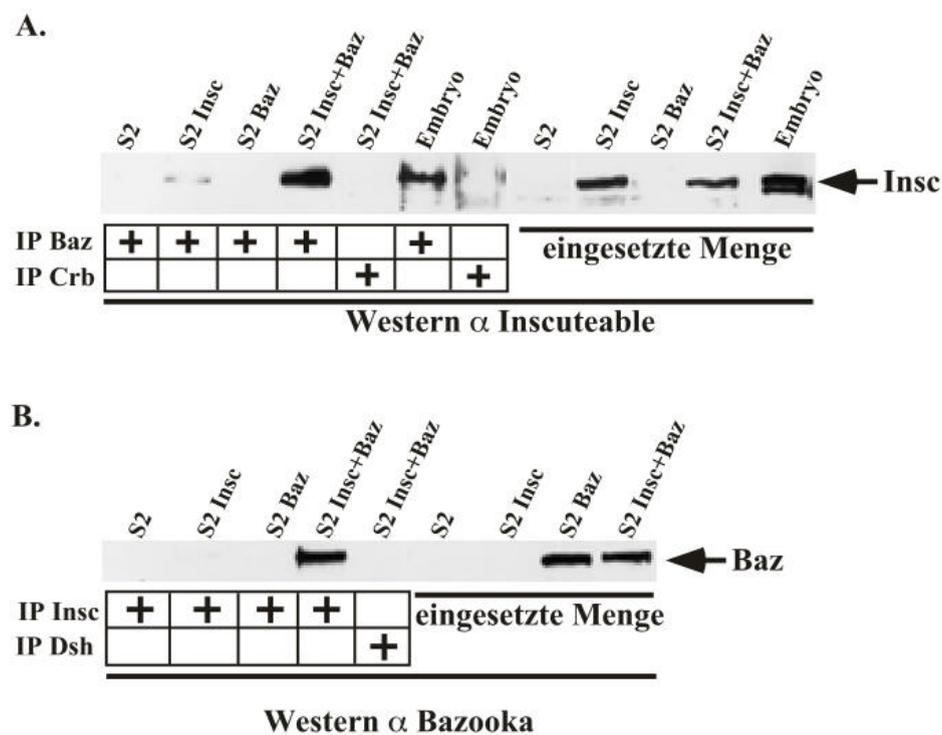


Abb. 7: Immunpräzitationen (IP) von Insc und Baz

A. IP mit dem C-Terminus spezifischen Baz-Antikörper, Kontrolle mit einem Crb Antikörper, B. IP mit einem Insc spezifischen Antikörper, Kontrolle mit einem Dsh Antikörper. S2: Schneiderzelleextrakt; S2 Insc, S2 Baz, S2 Insc+Baz: mit den jeweiligen cDNAs transformierte S2-Zellen

3.1.2 Gal4BD-BAZ Expression in der Hefe

Die Transformation mit einem Plasmid, welches die codierende Sequenz für ein Gal4 Fusionsprotein enthält bietet keine Gewähr dafür, dass dieses Fusionsprotein in der transformierten Zelle erzeugt wird. Das Gal4BD-BAZ-Protein wurde daher in dem

Hefestamm Y190 durch einen Western-Blot nachgewiesen (Abb. 8A und B). In zur Kontrolle verwendeten Extrakten von untransformierten bzw. mit dem leeren Vektor transformierten Hefezellen wurde keine spezifische Bande detektiert. In mit pAS2-1/Baz transformierter Hefe treten neben der erwarteten Bande noch eine ganze Reihe weiterer kleinerer Banden auf, bei denen es sich um Abbauprodukte handelt. Das erwartete Molekulargewicht beträgt ca. 180kDa, die bei dem „Western-Blot“ in Abb.8 auftretende Abweichung beruht auf dem verwendeten Molekulargewichtsmarker. Auch die übrigen, in der Abb.6 angedeuteten „bait“-Konstrukte, wurden so auf die Expression des Fusionsproteins getestet (nicht gezeigt).

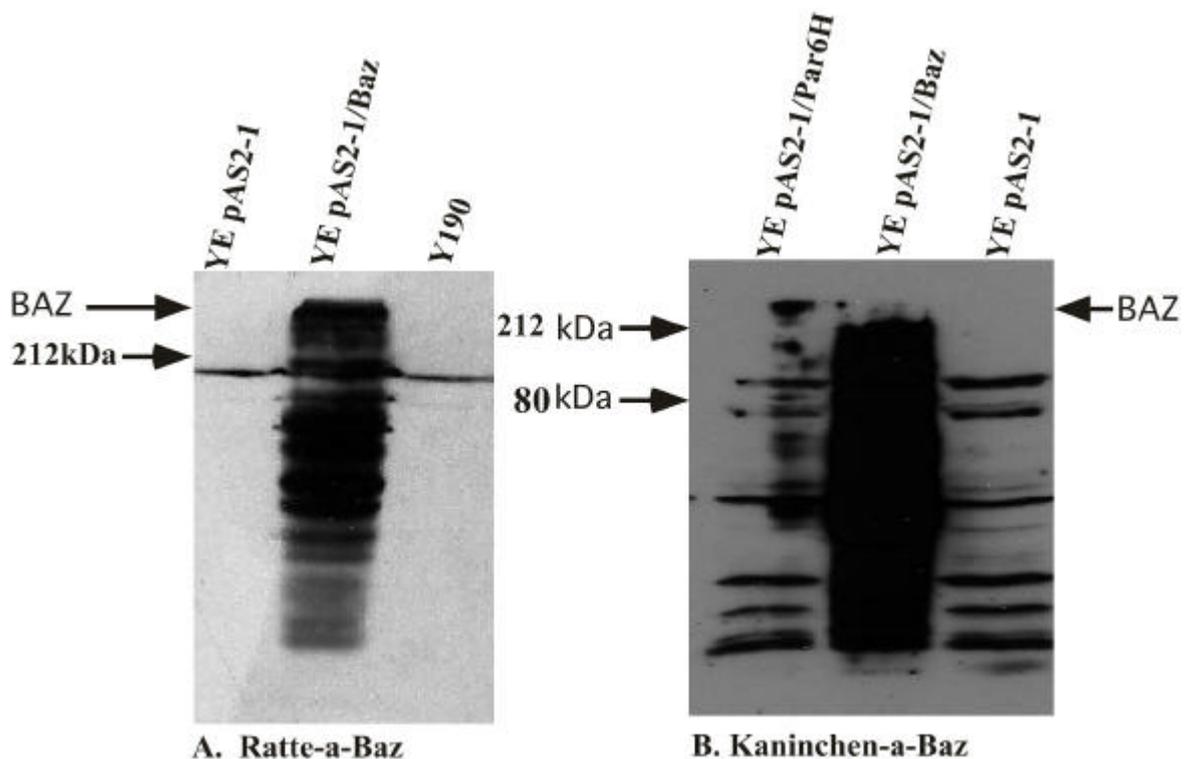


Abb. 8: Nachweis der Expression von Gal4 Fusionsproteinen in der Hefe

A Expression des Gal4BD-BAZ Fusionsproteins mit dem in Ratten erzeugten Antiserum; B Nachweis von Baz mit einem Kaninchenantiserum. Bei B ist in Spur 1 im Hintergrund eine Überlagerung mit Signalen aus Spur 2 zu sehen, wo das GAL4BD-BAZ Fusionsprotein, durch starke Degradation in vielen Einzelbanden über die gesamte Spur2 verteilt, zu erkennen ist; die grösste der Banden entspricht dem gesamten Fusionsprotein.

Ein pAS2-1/Par-6H Extrakt diente in B zusätzlich als Negativkontrolle. YE: „Yeast-Extract“; pAS2-1: leerer Vektor; Y190: Extrakt aus nichttransformierter und in Minimalmedium kultivierter Hefe

3.2 „Two-Hybrid-Screen“

Für die Durchführung des „Screens“ wurde das Matchmaker2-System von Clontech benutzt. Der hierzugehörige Hefestamm Y190 mit den unter UAS-Kontrolle stehenden Reporter genen β -Galactosidase und *HIS3* wurde mit dem pGBT9/PDZ1-3 Konstrukt transformiert. Bei der

Zweittransformation mit der Matchmaker cDNA Bibliothek wurde pro Transformationsansatz 1µg DNA eingesetzt und eine Transformationsrate von durchschnittlich $1 \times 10^4/\mu\text{g}$ DNA erzielt. Die anschliessende Selektion erfolgte auf $\text{Leu}^-/\text{Trp}^-$ oder $\text{Leu}^-/\text{Trp}^-/\text{His}^-$, je nachdem welche Strategie bei der Selektion positiver Klone benutzt wurde. Bei der Verwendung des *his3*-Reportergens werden nur solche Kolonien erhalten, die eine Interaktion der Fusionsproteine aufweisen. Dies hat gegenüber der $\text{Leu}^-/\text{Trp}^-$ -Selektion den Vorteil, dass nicht unter Tausenden positiver Kolonien eine positive über einen X-Gal Test herausselektioniert werden muss. Möglicherweise wird jedoch bei der $\text{Leu}^-/\text{Trp}^-/\text{His}^-$ -Selektion ein zu grosser Druck auf die Hefezelle ausgeübt und einige, nur schwache Interaktionspartner, werden mit diesem System nicht identifiziert (persönliche Mitteilung Bettina Wunderlich). Insgesamt ist aber festzustellen, dass die Verwendung des lacZ Reportergens für die Erstselektion zu umständlich und die HIS-Selektion geeigneter ist.

3.3 Positive Interaktionsklone aus dem „2-Hybrid-Screen“

Eine Hefekolonie wurde dann als positiv eingestuft, wenn sie sich erstens im Gegensatz zu einer Negativkontrolle bei dem β -Galactosidase-Filtertest blau verfärbte und zweitens auf einem Histidin-freiem Medium in der Gegenwart von 50mM 3-AT wachsen konnte et vice versa. Isolierte positive Interaktions-Plasmide wurden mit BIC (Bazooka interacting clone) und einer darauffolgenden Nummer bezeichnet. Insgesamt wurden 3×10^6 Transformanden untersucht und 5 positive Klone erhalten. Durch eine Erstselektion auf $\text{Trp}^-/\text{Leu}^-$ mit anschliessendem X-Gal Test wurden 2×10^6 Transformanden untersucht und die positiven Klone BIC1 und BIC4 erhalten. BIC2 enthält eine cDNA des für einen Transkriptionsfaktor kodierenden Gens *caudal* und reagiert auch mit pGBTLAM5'. Bei letzterem wurde ein Teil des menschlichen Lamin-Gens hinter die Gal4BD-Sequenz in pGBT9 kloniert. Es handelt sich also bei BIC2 um einen sogenannten falsch positiven Klon. Aus der Hefekolonie mit der Bezeichnung BIC3 konnte kein Plasmid isoliert werden, welches bei einer Retransformation erneut zu einem positiven X-Gal Test führte.

Die Erstselektion auf $\text{His}^-/\text{Trp}^-/\text{Leu}^-/50\text{mM}$ 3-AT ergab die Klone BIC5, BIC7 und BIC8. Bei einem zunächst als positiv eingestuften Klon BIC6 zeigte sich bei weiteren Überprüfungen kein positives Signal mehr beim X-Gal Test.

Bei drei der gefundenen positiven Interaktionsklone stimmte das Leseraster für die Gal4AD mit dem codierenden Raster der integrierten cDNA überein. Dies sind die Klone BIC1, BIC4, und BIC7, die daher zunächst für weitergehende Untersuchungen ausgewählt wurden.

3.3.1 Der BAZ Interaktionspartner TOLL-7

Der Klon BIC1 besitzt ein Insert einer 2,5kb grossen cDNA, die zu einem GAL4AD Fusionsprotein mit den C-terminalen 296 AS des durch *toll-7* codierten Gens führt (Tauszig et al., 2000). Die restliche cDNA in BIC1 stammt aus dem 3'UTR-Bereich von *toll-7*. Die Bezeichnung für dieses zunächst nur nach der Genomsequenzierung durch das BDGP vorhergesagte Gen beruht auf dem Vorkommen einer Domäne, die zuerst im Toll-Protein von *Drosophila melanogaster* entdeckt wurde, welches an der Etablierung der dorso-ventralen Polarität im Embryo beteiligt ist (Hashimoto et al., 1988). Ausserdem sind verschiedene Mitglieder der Toll-Familie sowohl bei Insekten als auch bei Säugern an der Immunabwehr gegen Bakterien und Pilze beteiligt (O'Neill, 2000). Es handelt sich hierbei um Typ1-Transmembranrezeptoren, die eine intrazelluläre Domäne von ca. 200 AS besitzen, wie sie auch bei dem Interleukin-1 Rezeptor IL-1R vorkommt. Diese Domäne wird als Toll/IL-1R homologe Region (TIR) bezeichnet.

Toll-7 ist ein 1446 AS langes Protein, welches neben der in der Nähe des C-Terminus gelegenen TIR-Domäne noch zahlreiche Leucin-reiche Wiederholungen (LRR) aufweist, die jedoch ausnahmslos im extrazellulären Bereich des Proteins liegen. Hierbei handelt es sich um nur 22-26AS lange Motive, die im allgemeinen bei Protein-Protein Wechselwirkungen und der Zelladhäsion eine Rolle spielen (Gay et al., 1991). *Toll-7* besitzt eine sehr starke Homologie zu dem Gen *18-wheeler* (Eldon et al., 1994). Diese beträgt auf der Proteinebene 56.2%, im Bereich der LRR besteht eine Identität von 83%. Eine schematische Übersicht über die Proteine Toll, 18-Wheeler und Toll-7 sowie über die jeweilige Domänenstruktur wird in der Abb.10 gegeben.

Im Gegensatz zum 18W C-Terminus (-FLV) weist der des Toll-Proteins (-SDV) (Hashimoto et al., 1988), am unmittelbaren C-Terminus ähnlich wie Toll-7 ein klassisches PDZ-Bindemotiv auf. Eine mögliche Bindung des Toll-Proteins an die PDZ-Domänen von Baz wurde in einem „2-Hybrid“-Interaktionstest untersucht. Dabei konnte keine Bindung eines Gal4AD-TOLL Fusionsproteins an das Gal4BD-PDZ1-3 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Toll-7 bindet ganz spezifisch an die erste PDZ-Domäne von Baz. Ein Überblick über die zur Eingrenzung der Bindedomäne durchgeführten „2-Hybrid“ Experimente gibt die Tabelle 11. Eine Bindung von 18W an Baz wurde nicht untersucht, da schon das jeweilige mRNA *in situ* Muster vollkommen verschieden ist. Die embryonale Lokalisation des 18w-Proteins wurde bisher nicht untersucht. Während Toll-7 jedoch eindeutig ein neural lokalisierendes Protein ist (s.u.), ist über eine solche Lokalisation in der Larve nichts bekannt (Williams et al., 1997).

	PDZ1	PDZ2	PDZ3	PDZ1-2	PDZ2-3	PDZ1-3	BAZ
BIC1	++	-	-	++	-	++	+

Tab.11: Überblick über die getesteten Interaktionen von verschiedenen Baz-Domänen und des vollständigen Baz-Proteins mit BIC1(TOLL-7)

Gegen ein GST-Fusionsprotein mit den C-Terminalen 296 AS von Toll-7 wurde in einer Ratte ein Antiserum erzeugt (Abb.9) und dieses für den Nachweis der Proteinexpression in Hefe und im Embryo eingesetzt.

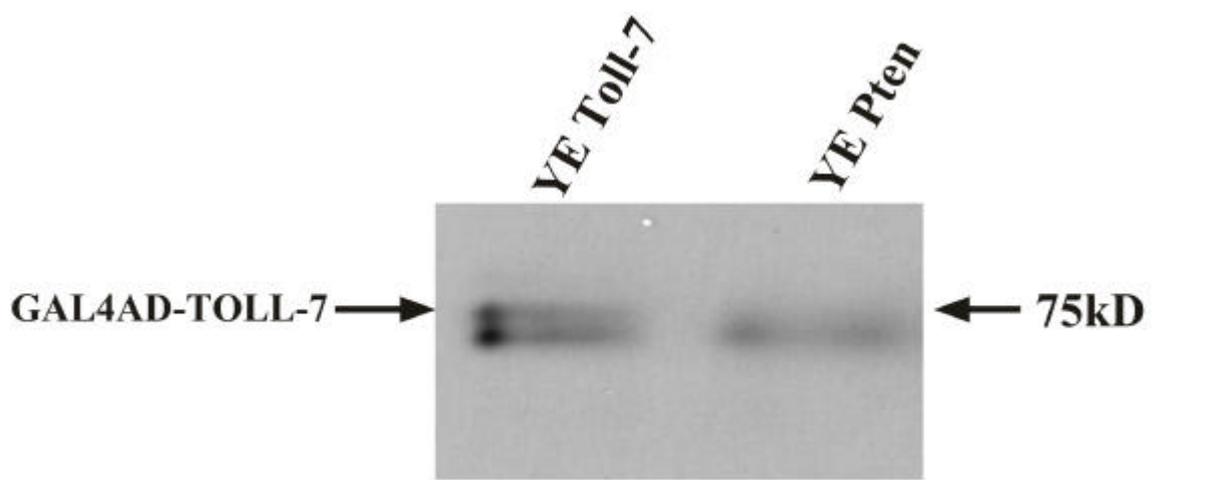


Abb.9: Spezifität des Ratten-anti-Toll-7 Antiserums

Hefeextrakte (YE) von *toll-7* und *pten* transformierten Hefen. In dem Extrakt aus *toll-7* transformierter Hefe wird eine zusätzliche Bande detektiert, die in der anderen Spur nicht auftritt.

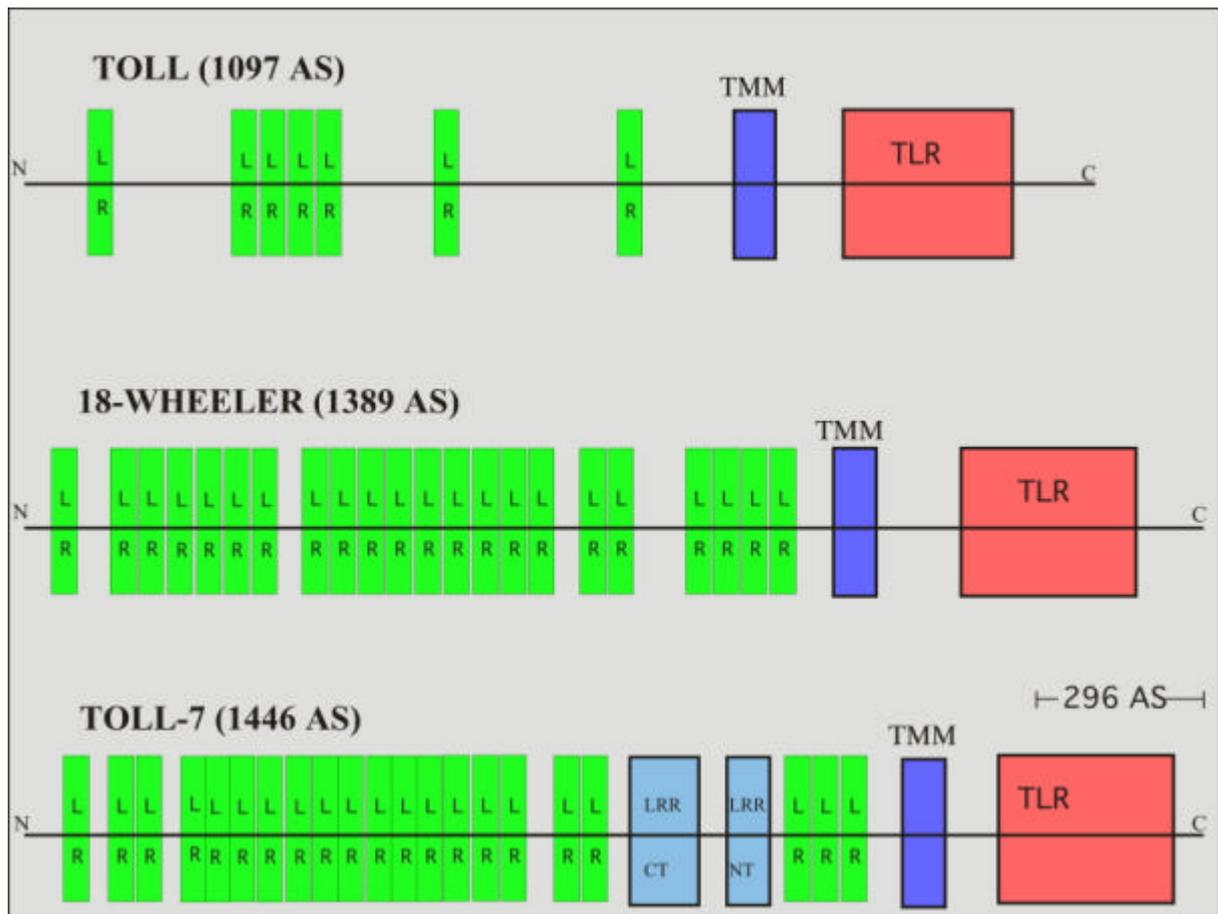


Abb. 10: Vergleich der Domänenstruktur der TIR-Proteine TOLL, 18-WHEELER und TOLL-7

Alle drei Proteine weisen vom N-Terminus aus gesehen die gleiche Abfolge von „Leucin-rich-repeats“ (LRR)-Domänen, „Transmembrane-Domäne“ (TMM) und „TOLL-IL1-Rezeptor“ (TLR)-Domäne auf. Der in dem 2 Hybrid-Klon BIC1 vorhandene Anteil von TOLL-7 (296 AS) wird oberhalb des TOLL-7 Schemas angezeigt.

3.3.1.1 Verteilung der *toll-7* RNA

Die Expression des *toll-7* Gens kann ab dem zellulären Blastodermstadium der Embryogenese verfolgt werden (Abb. 11 A). Hier wird vor allem in dem zentralen Bereich des Embryos (30-70% Eilänge) die mRNA detektiert, in geringerem Maße auch im posterioren Bereich. In diesem Stadium ist anterior keine Expression nachzuweisen. In den Polzellen wurde ebenfalls keine mRNA von *toll-7* detektiert. Im gastrulierenden Embryo wird im Mesoderm eine Expression beobachtet (Abb.11 B), im Stadium 10 (ausgestreckter Keimstreifen) tritt neben der mesodermalen Expression ein segmentales Muster auf (Abb.11C), welches jedoch nicht auf ectodermaler Expression beruht, wie in Abb.11E besser zu erkennen ist. Im Gegensatz zur *baz* Expression im Hinterdarm kann eine solche für *toll-7* nicht beobachtet werden. Eine ventrale Ansicht zeigt wahrscheinlich eine Subpopulation von gefärbten Neuroblasten

(Abb.11 D u. H). Im Stadium 12 wird eine starke Färbung in den Neuromeren der Segmente beobachtet (11 G u. H). Die posterioren Spirakeln und die Bein-Imaginal-scheiben (LID) zeigen eine starke Expression (Abb.11 G u. H). Toll-7 ist sowohl im ZNS als auch im PNS exprimiert.

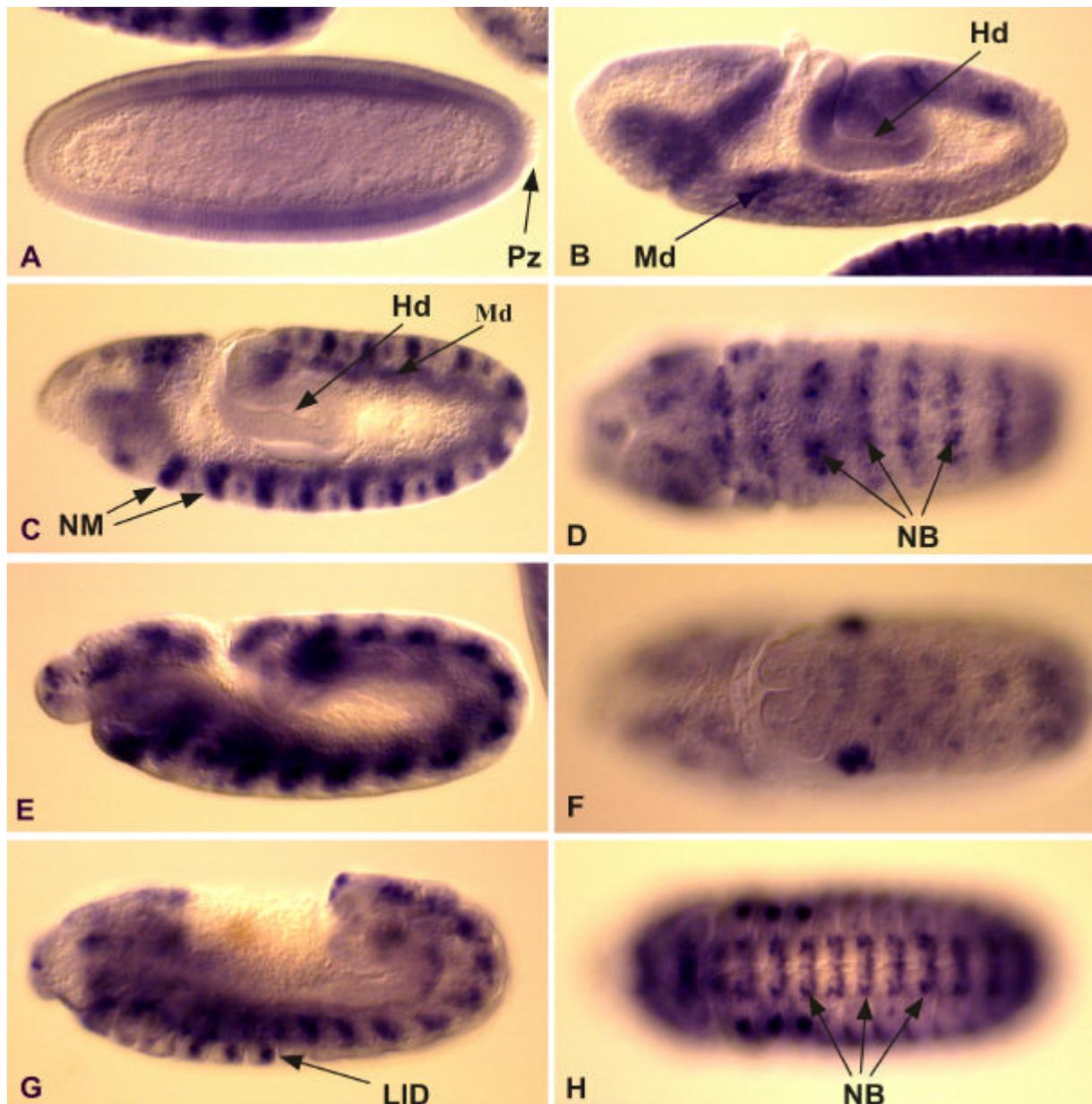


Abb. 11: Verteilungsmuster der *toll-7* mRNA während der Embryogenese von *Drosophila melanogaster*

A zelluläres Blastodermstadium (St.5), B gastrulierender Embryo, C ausgestreckter Keimstreifen (St.10), D ventrale Ansicht ca. St. 10, E Stadium11 F ca. Stadium 11 ventrale Ansicht, G und H Stadium12 mit lateraler bzw. ventraler Ansicht. Pz: Polzellen, Md: Mesoderm, NM: Neuromer, Hd: Hinterdarm, NB: Neuroblast, LID: „Leg Imaginal Disc“

3.3.1.2 Untersuchung der TOLL-7-Expression in Embryonalstadien

Der in Ratten erzeugte, gegen den C-Terminus von Toll-7 gerichtete Antikörper wurde eingesetzt, um die Lokalisation des Proteins in Embryo und Larve zu untersuchen. Dabei wurde auch bestimmt, ob Toll-7 und Baz in einem Stadium der *D.melanogaster* Entwicklung eine gemeinsame Lokalisation aufweisen.

Die Protein Expression von Toll-7 ist ab ca. Stadium 12 nachweisbar, in dem der Keimstreifen sich bereits weit zurück gezogen hat (Abb. 12).

Während das Bazooka-Protein im Stadium 11 in Epidermis und Hinterdarmepithel deutlich apikal zu erkennen ist (Abb.12A), kann hier keine spezifische Toll-7 Expression beobachtet werden.

Erst im Stadium 12 kann Toll-7 nachgewiesen werden. Besonders stark ist die Expression in den einzelnen Neuromeren der Segmente (Abb.12E). In diesem frühen Stadium wird der Proventrikulus vom Toll-7 Protein umgeben (Abb.12E Pfeilkopf), weiterhin findet sich das Protein in einer Region am posterioren Ende des Embryos und im procephalen Bereich.

Bei der in auffälliger Weise den Proventrikulus umlaufenden Toll-7 Färbung (Abb.12 D-F) könnte es sich um das stomatogastriische Nervensystem handeln, die Färbung kann auch noch weiter in anteriorer Richtung, also zum Ösophagus hin, verfolgt werden.

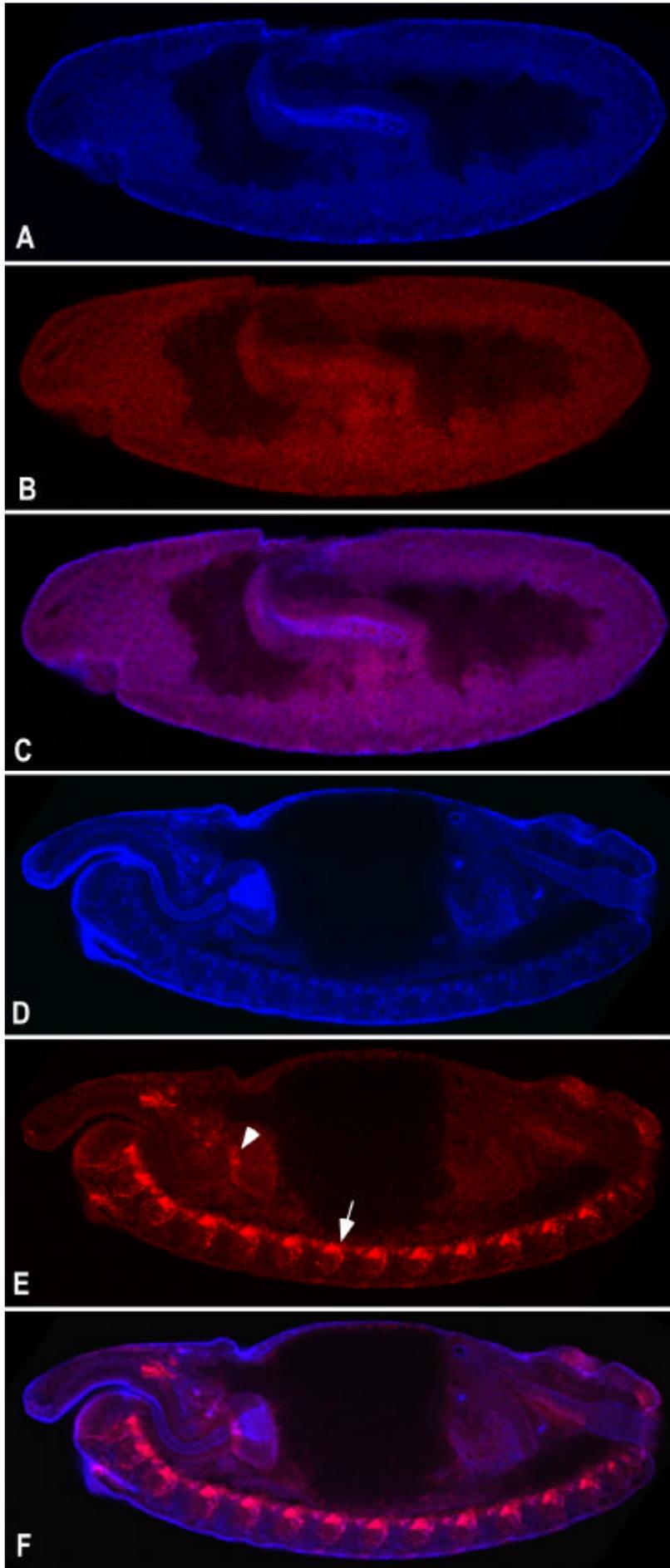


Abb. 12: Expression von Baz und TOLL-7 im WT

Laterale Ansicht verschiedener Embryogenesestadien, anterior ist links, dorsal oben.

A und D: Kaninchen- α -Baz in blau
 B und E: Ratte- α -TOLL-7 in rot,
 In C und F ist die jeweilige Überlagerung für die Beurteilung einer Kolo-kalisation wiedergegeben.
 Die Toll-7 Expression beginnt erst ab ungefähr Stadium 12.
 In A-C ist ein Stadium 11 Embryo gezeigt, bei dem die Expression des Bazooka-Proteins in der Epidermis und dem posterioren Mitteldarm-epithel deutlich zu erkennen ist, während im Vergleich dazu eine spezifische Toll-7-Färbung nicht nachweisbar ist. Eine Vergrößerung des ventralen Bereiches eines Stadium 11 Embryos zeigt eine starke apikale Baz-Färbung in den Neuroblasten, jedoch keine TOLL-7 Färbung (Abb.10).
 D-F: Stadium 12 Embryo
 Die Toll-7 Expression beginnt in den Neuromeren der einzelnen Segmente (E, Pfeil).
 Auch am posterioren Ende des Embryos ist eine Region mit Toll-7 Expression zu erkennen.
 TOLL-7 befindet sich auch direkt an dem Übergang vom Ösophagus zum Proventrikulus (E, Pfeilkopf)
 Eine Kolo-kalisation von Baz und Toll-7 ist in diesen Stadien nicht zu erkennen.

Nicht nur im Epithel kann keinerlei Toll-7 Expression nachgewiesen werden, auch in den Neuroblasten der ventralen neurogenen Region findet sich bei gleichzeitigem deutlichem Nachweis von Baz kein Toll-7 (Abb.13).

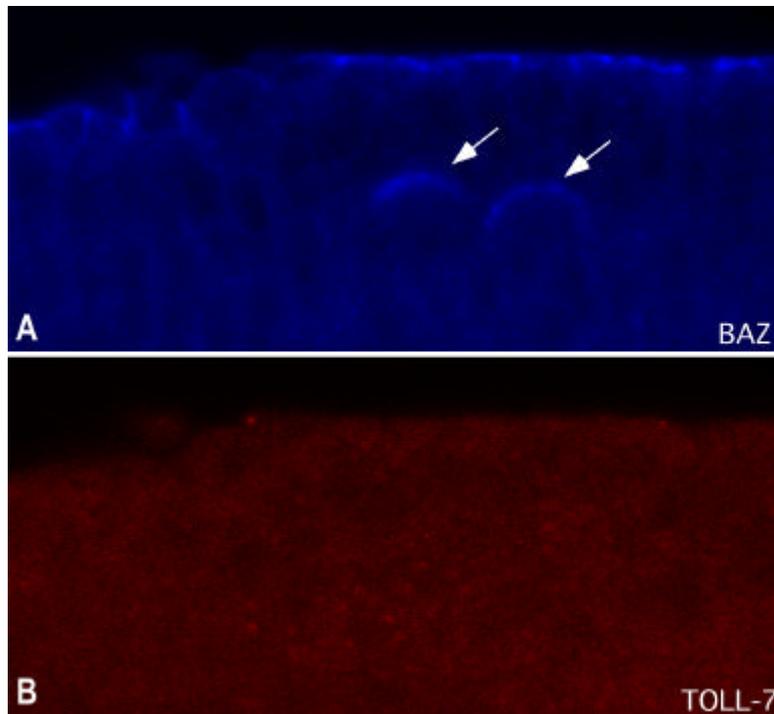


Abb.13: Vergrößerte Darstellung eines Ausschnitts aus der ventralen neurogenen Region des in Abb. 9 A gezeigten Embryos im Stadium 11

Während die BAZ-Färbung auf der apikalen Seite des Epithels und mit dem typischen apikalen Halbmond in den Neuroblasten (Pfeile) gut zu erkennen ist, fehlt hier jegliche spezifische Toll-7 Färbung.

Da sich Toll-7 besonders gut im ZNS nachweisen lässt, wurde geprüft, ob hier eine Kolokalisation mit Baz besteht. Dabei ergaben sich keinerlei Hinweise, dass Baz überhaupt in diesem Entwicklungsstadium im ZNS exprimiert wird (Abb.14).

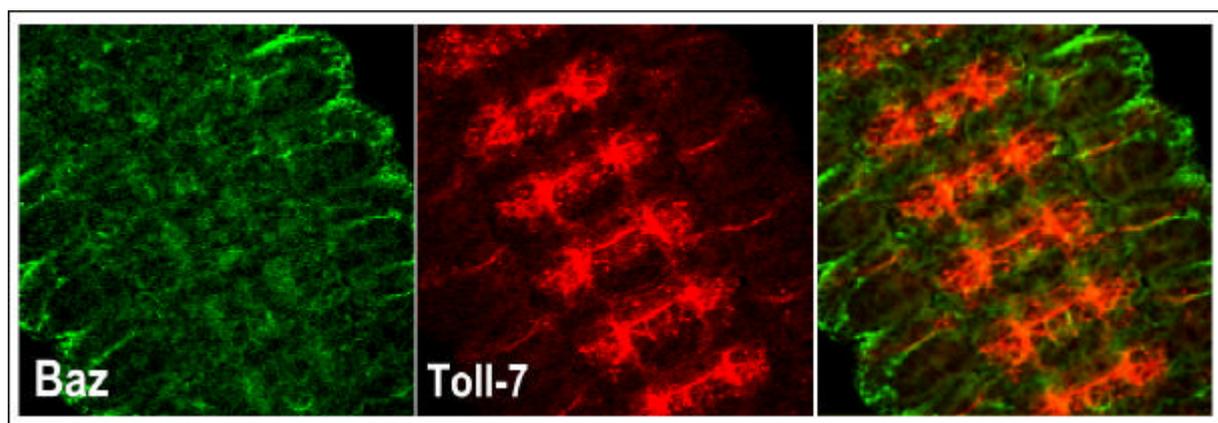


Abb. 14: Koimmunofärbung von WT-Embryonen mit Kaninchen-? -BAZ und Ratte-? -TOLL-7

Gezeigt ist eine Vergrößerung einer ventralen Aufsicht auf das ZNS eines Embryos in Stadium 14. Ganz links: keinerlei Baz-Färbung in den Konnektiven und Kommissuren, am Rand ist die Baz-Färbung des Epithels zu erkennen. Mitte: Toll-7 Färbung in einer der Kommissuren, auf beiden Seiten hiervon wird Toll-7 in verschiedenen Neuronen exprimiert. Rechts: Übereinanderlagerung der beiden Färbungen.

Um verstehen zu können, in welchen Neuronen und Nervenbahnen bei einer Toll-7 Färbung das Protein nachweisbar ist, wird im folgenden eine Darstellung der Entwicklung des embryonalen Nervensystems gegeben (detaillierte Darstellung in Campos-Ortega und Hartenstein, 1997).

Das zentrale Nervensystem von *Drosophila melanogaster* entwickelt sich aus dem Neuroektoderm und dem Mesektoderm. Zellen aus dem Mesektoderm bilden die sogenannte Mittellinie, in der Mittellinien Glia Zellen und neurale Vorläuferzellen gebildet werden. Zu beiden Seiten der Mittellinie entsteht ab dem späten Stadium 9 durch Delamination von Zellen aus dem Neuroektoderm mehrere longitudinale Reihe von Neuroblasten, aus denen ZNS Neurone gebildet werden. Die Mehrheit dieser ZNS-Neurone sind Interneurone, deren Axone über die Mittellinie hinweg zu der anderen Seite des Embryos verlaufen. Ein anteriores und posteriores Bündel solcher Axone wird jeweils als Kommissur bezeichnet. Toll-7 wird nur in den posterioren Kommissuren exprimiert (Abb.15). Die neuronalen Komponenten in jedem Segment des Embryos werden als Neuomer bezeichnet. Verschiedene Neurone senden ihre Axone in posteriorer Richtung, diese Axone laufen zunächst innerhalb des ventralen Nervenstranges bis zu dem nachfolgenden posterioren Neuomer. Dort zweigen sie in lateraler Richtung ab und bilden so die anteriore Wurzel des Intersegmentalnervs (ISN). Andere an der Mitte der anterioren Kommissur gelegene Neurone bilden die posteriore ISN-Wurzel indem sie ihre Axone in anteriorer Richtung und dann ebenfalls nach lateral senden, schliesslich fascikulieren die anteriore und posteriore Wurzel und der Nerv verläuft lateral in Richtung dorsal, wo u.a. die dorsale Muskulatur innerviert wird. Toll-7 kann nur in der posterioren der beiden ISN-Wurzeln nachgewiesen werden. Nach Fascikulation der beiden Wurzelstränge begleitet die Toll-7 Färbung den ISN bis zu den Abzweigungen zum Pentascolopodialorgan und den Haar-Sensillen (Abb.15)

Der Intersegmentalnerv wird auch durch die Projektion von Axonbahnen der ventralen Intersegmentalgruppe gebildet. Diese Gruppe von Neuronen liegt zum grössten Teil auf der ventralen Seite der Konnektive an der posterioren Seite des Segmentes. Die Axonbahnen verlaufen in anteriorer Richtung in der anterioren ISN-Wurzel. Hier wird keine Toll-7 Expression beobachtet.

Mehrere Neurone, die in der Mitte zwischen den Konnektiven liegen, senden sich an der Mittellinie gabelnde Axone aus, die den ventralen Nervenstrang durch die Segmentalnerven (SN) verlassen.

Ein SN verzweigt sich in SNa und SNb, wobei SNa für die Innervation von lateraler, SNb von ventraler Muskulatur dient. Im SN und in dessen Verzweigungen konnte keine Toll-7 Expression nachgewiesen werden (Abb.15).

Der SN und der ISN liegen sehr nahe aneinander, wenn sie den Cortex des ventralen Nervenstranges verlassen. Sie sind dabei von einer Hülle umgeben, die von zwei hintereinanderliegenden Gliazellen gebildet wird (Klämbt und Goodman, 1991). Nach Verlassen des Cortex verlieren die beiden Nervenstränge ihre gemeinsame Gliazellhülle und divergieren.

Der ISN weist einen nach dorsal gerichteten Verlauf auf, verschiedene kleinere Abzweigungen gehen zu Muskeln und sensorischen Neuronen. Nach dem Erreichen der dorsalen Muskulatur spaltet sich der ISN in zwei terminale Zweige auf, einer besteht aus den afferenten Axonen einer dorsalen Gruppe sensorischer Organe, der andere besteht aus efferenten Fibern, die dorsale Muskulatur innervieren. In beiden Zweigen kann die Toll-7 Färbung verfolgt werden (Abb.15). Ein sehr auffälliges sensorisches Organ, dessen afferente Axone in den ISN laufen, ist das Pentascolopodialorgan. Verfolgt man die Toll-7 Färbung in den afferenten Nervenbahnen des ISN (Abb. 15A u.C), die zu dem dorsalen Chordotonal-(Pentascolopodial-) organ führen, so zeigt sich, dass Toll-7 nicht in den Scolopida selber exprimiert ist, vielmehr macht die durch Toll-7 markierte Bahn plötzlich im Bereich des Pentascolopodialorganes einen Knick und endet in einem verbreiteten dicken Punkt. Das gleiche wird für eine andere Abzweigung des ISN beobachtet. Eine Erklärung, für welche Struktur dieser Punkt stehen könnte, konnte auch nach Rücksprache mit Christian Klämbt (Institut für Neurobiologie, Münster) nicht gefunden werden.

Bei einer Koimmunofärbung mit dem gegen das Futsch Protein gerichteten 22C10 Antikörper (Hummel et al., 2000), welcher das gesamte ZNS und PNS anfärbt, zeigt sich keine vollkommene Kolo-kalisation der Färbungen, vielmehr scheint die Toll-7 Färbung mit und um die 22C10 Färbung herumzulaufen (Abb.15C).

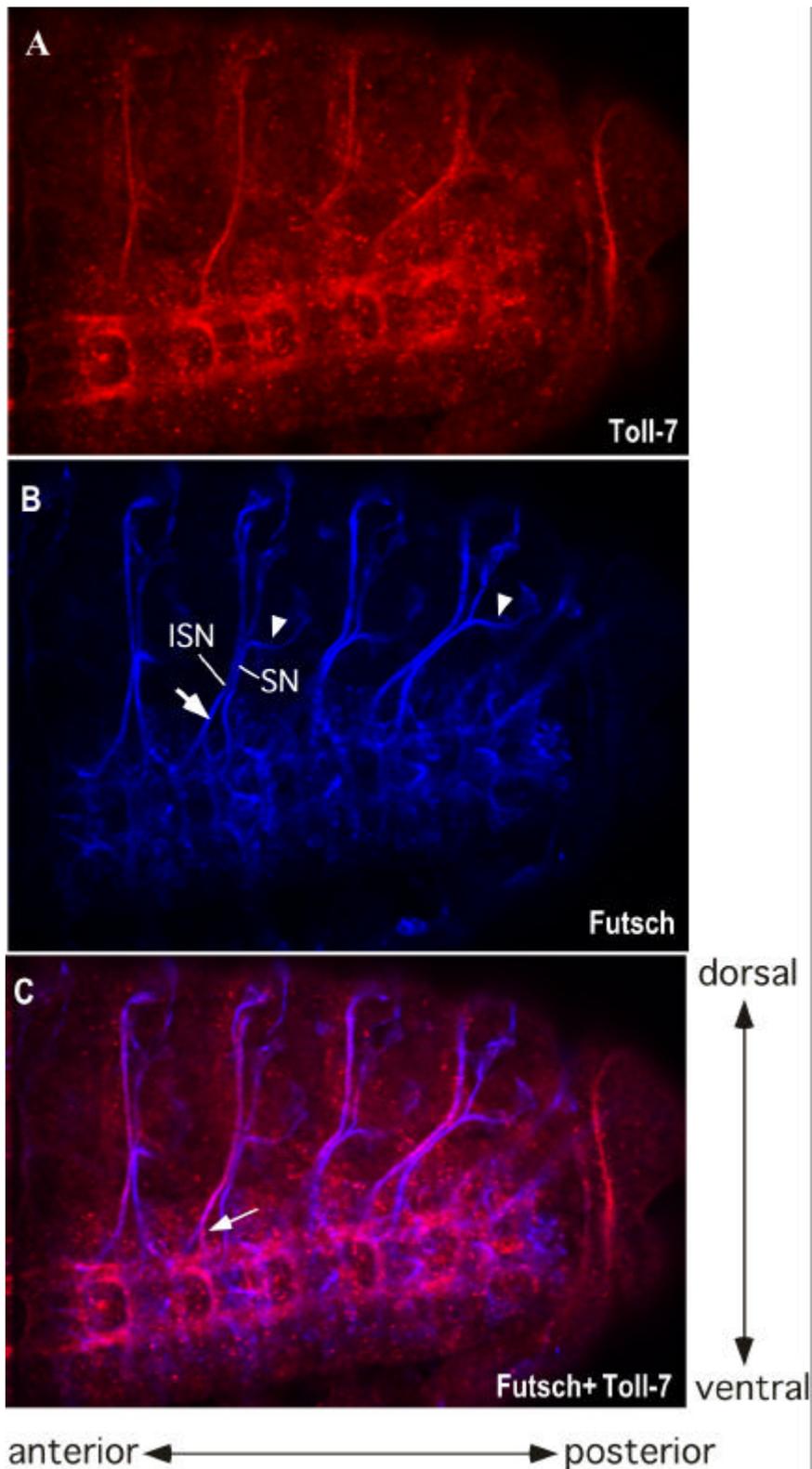


Abb.15: Koimmunofärbung von WT-Embryonen mit 22C10 (Futsch) und TOLL-7 Antiserum

Segmental (SN)- und Intersegmentalnerv (ISN) zweigen aus dem ZNS ab. Toll-7 (rot) wird nur in dem ISN (Pfeil in B) exprimiert, wobei von den beiden Wurzeln des ISN nur in der anterioren Toll-7 nachgewiesen werden kann (Pfeil in C). Nach dem Verlassen des neuralen Cortex weist der SN eine Verzweigung auf, einer der beiden Äste verläuft in lateral-posteriorer Richtung (Pfeilköpfe), der andere weiterhin nach dorsal.

3.3.1.3 Mutationen innerhalb des *toll-7* Locus

Um die Frage nach der funktionellen Bedeutung von *toll-7* aufzuklären, ist es zunächst wichtig, nach Effekten bei Mutationen oder einem Ausfall des Gens zu schauen. Die Region 56F1, in der *toll-7* liegt, zeichnet sich durch eine geringe Zahl von Genloci aus. Es existieren keine dokumentierten Defizienzen, die diesen Bereich abdecken. Jedoch kann auch durch die Insertion eines transposablen Elementes in das Gen selber oder in seine unmittelbare Umgebung das entsprechende Gen mutiert oder sogar vollkommen ausgeschaltet werden. Ein solches transposables Element bei *Drosophila melanogaster* ist das sogenannte P-Element.

In der „flybase“ Datenbank sind 4 verschiedene Insertionslinien vermerkt, die innerhalb der Region 56F1 kartieren. Bei zweien davon erschien es möglich, dass sie in der *toll-7* Region liegen. Dies ist zum einen die homozygot letale Linie I(2)k16210 (Bloomington Stock Number: BL11163), und zum anderen die homozygot lebensfähige Linie I(lacZ)H217.

I(lacZ)H217 ist ein Fliegenstamm, der bei der Suche nach EP-Linien gefunden wurde, deren Reportergen-Expressionsmuster im späten larvalen ZNS sich bei Abwesenheit der "Broad-Complex"-Proteine verändert (Liu und Restifo, 1998). Bei diesen Proteinen handelt es sich um Zink-Finger Transkriptionsfaktoren, die für viele Aspekte der Metarmorphose, z.B. die Umwandlung des larvalen in das adulte ZNS, benötigt werden (Levine et al., 1995; Restifo und White, 1991; Übersichtsartikel: Bayer et al., 1996).

Die Insertion eines P-Elementes mit dem Reportergen *lacZ* in das Genom der Fliege führt zu einem β -Gal Expressionsmuster, welches stellvertretend für das Gen betrachtet werden kann, in dessen Kontrollregion das P-Element integriert wurde. Die Koimmunofärbung mit einem β -Gal spezifischen und einem Toll-7 spezifischen Antikörper zeigt eine nahezu identische β -Gal- und Toll-7 Expression, das Reportergen im P-Element der Linie I(2)k16210 ist unter die Kontrolle des *toll-7* Enhancers geraten (Abb.16). Die β -Gal-Expression zeigt auch, dass *toll-7* in 2 Zellen des PNS exprimiert wird (Abb.16).

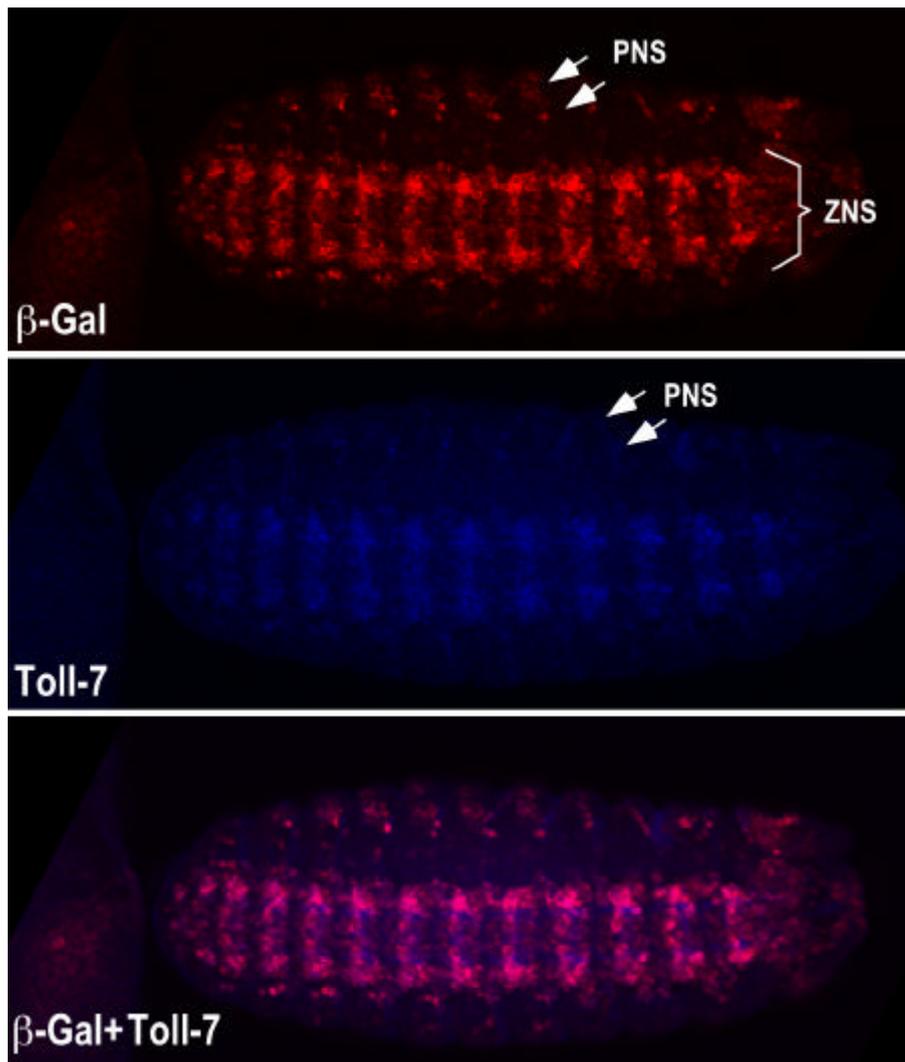


Abb.16: Koimmunofärbung mit Anti- β -Gal (rot) und Anti-Toll-7 (blau)

Gezeigt ist eine ventrale Ansicht des sich entwickelnden zentralen Nervensystems (ZNS) eines Stadium 14 I(2)k16210-Embryos. Die β -Gal Färbung wird in zwei Zellen des peripheren Nervensystems (PNS) beobachtet (Pfeile oben). Hier wird auch Toll-7 nachgewiesen (entsprechende Pfeile mittleres Bild). Im ZNS ist ein ein nahezu vollständiges Überlappen der beiden Färbungen zu erkennen.

Die Linie I(lacZ)H217 weist dagegen kein spezifisches Expressionsmuster auf, welches der *toll-7* Expression ähnelt (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet jedoch keinesfalls, dass das P-Element nicht in der Region von *toll-7* integriert sein kann. Die Linie I(lacZ)H217 wurde zusammen mit der, aufgrund des zu *toll-7* nahezu gleichen Expressionsmusters sehr interessant erscheinenden, Linie I(2)k16210 auf den Insertionsort des jeweiligen P Elementes hin untersucht.

3.3.1.3.1 P-Elementlokalisierung durch inverse PCR

Der Integrationsort der jeweiligen P-Elemente in I(lacZ)H217 und I(2)k16210 wurde durch

inverse PCR untersucht.

Sowohl am 5'-Ende als auch am 3'-Ende des P-Elementes befinden sich Schnittstellen für Restriktionsenzyme. Schneidet man nun genomische DNA eines Fliegenstammes mit einer solchen P-Elementinsertion, so entstehen DNA-Fragmente, die aus dem Ende des P-Elementes und dem genomischen Bereich bis zu der ersten Schnittstelle der Fliegen-DNA bestehen. Eine Ligation dieser Fragmente führt zu zirkulärer DNA, die durch Verwendung gegenläufiger Primer, die an die bekannte DNA-Sequenz von dem P-Elementende binden, spezifisch amplifiziert werden kann. Da die gesamte Sequenz des *Drosophila*-Genoms bekannt ist, kann durch die Sequenzierung des genomischen Anteils in dem durch die PCR amplifizierten Fragment der Insertionsort des P-Elementes bestimmt werden.

Die genomische DNA von I(2)k16210 wurde mit dem Restriktionsenzym MspI geschnitten. Die PCR mit der religierten DNA ergab ein ca. 550bp grosses Fragment, welches mit dem Primer Spep1 sequenziert wurde. Bei dieser Sequenzierung wurden erwartungsgemäss die auf den Spep1 Primer folgende Sequenz bis zu dem Ende der invertierten Wiederholung am Ende des P-Elementes erfasst. Auf dieses Ende hin folgen jedoch nur 6 Nukleotide, bis die Sequenz ab der MspI Schnittstelle des P-Elementes fortgesetzt wird. Möglicherweise ist das P-Element daher direkt neben eine MspI-Schnittstelle gesprungen, die Religation der MspI geschnittenen genomischen DNA führte somit zu einem DNA-Ring, der bis auf 6 Nukleotide nur aus dem Ende des P-Elementes besteht.

Bei der Bestimmung der Insertionsstelle in I(lacZ)H217 wurde die genomische DNA mit dem Restriktionsenzym Sau3A geschnitten und dann wieder ligiert. Bei der darauf folgenden inversen PCR-Reaktion wurden die Primer Pry4 und Plw3-1 eingesetzt. Hierdurch wurde ein ca. 1,1kb grosses PCR-Fragment erzeugt, welches aufgereinigt und zum Sequenzieren mit dem Spep1 Primer eingesetzt wurde. Bei der Sequenzierung wurden 678bp aus dem genomischen Bereich erfasst. Hiernach liegt das 3'-Ende des P-Elementes in Linie H217 15kb hinter dem *toll-7* Gen und somit in der Nähe von diesem (Abb.17). Die Linie in I(lacZ)H217 eignet sich damit durch die Anwendung geeigneter Methoden, wie z.B. unpräzise Excision oder „paternal recombination“, zur Erzeugung von Mutanten, bei denen die codierende Sequenz von *toll-7* oder ein Teil davon fehlt.

3.3.1.3.2 P-Elementlokalisierung durch „Plasmid-Rescue“

Da die P-Elementinsertionsstelle für I(2)k16210 durch inverse PCR zunächst nicht bestimmt werden konnte, wurde zusätzlich die Methode des „Plasmid-Rescues“ angewandt.

Dabei wurde ein Teil der genomischen DNA mit EcoRI, ein anderer mit ClaI geschnitten (Material und Methoden 2.2.10). Mit ClaI wurden 2 Plasmide erhalten, die sich nach Isolation wie erwartet durch ClaI wieder linearisieren liessen. Eines dieser Plasmide (PIResClaI-1) ist ca. 5.5kb gross, das andere (PIResClaI-2) ca. 9kb.

Mit EcoRI wurden 3 Plasmide erhalten, die sich durch das Enzym wieder linearisieren liessen. Eines davon ist ca. 2,8 kb (PIResEcoRI-1), die beiden anderen jeweils 7kb gross (PIResEcoRI-2) und (PIResEcoRI-3). Durch Restriktionsspaltungen (EcoRI/BamHI bzw. SalI/EcoRI) wurde festgestellt, dass der jeweils erwartete Teil des P(lacW)-Elementes in den Plasmiden vorhanden ist, und das PIResEcoRI-2 und PIResEcoRI-3 identisch sind. Die Plasmide wurden anschliessend mit dem Spep1 Primer sequenziert, der kurz vor dem Ende des P-Elementes liegt.

Die auf das Ende des P-Elementes folgende Sequenz ist in PIResClaI-1 und PIResEcoRI-1 identisch. Sie ist ebenfalls identisch zu einer Sequenz des „genomic scaffold“ AE003146.1. Das gesamte Genom von *Drosophila melanogaster* wurde nach Abschluss der Sequenzierung in sich gegenseitig überlappende Teilstücke eingeteilt, welche mit „genomic scaffold“ bezeichnet werden. Im folgenden werden diese als genomische Teilgerüste bezeichnet. Die chromosomale Lokalisation von AE003146.1 ist unbekannt, da es sich um repetitive Sequenzen handelt, wie sie in einer ganzen Reihe verschiedener genomischer Teilgerüste vorkommt.

Die genomischen Sequenzen aus PIResClaI-2 und PIResEcoRI-2 entsprechen sich ebenfalls, unterscheiden sich jedoch von den beiden anderen Sequenzen. Sie sind zu 100% homolog zu der vor der Position 228732 liegenden Sequenz des genomischen Teilgerüsts AE003794.1 (Abb.17). Und tatsächlich entsprechen die ersten 6 der sich an das P-Element anschliessenden Nukleotide denen, die durch die inverse PCR ermittelt wurden. Auf diese Nukleotide folgt auch die postulierte MspI Schnittstelle. Das P-Element von I(2)k16210 liegt in ca. 61kb Entfernung vor *toll-7*, mitten in dem einzigen 5SrRNA Gen-Cluster von *Drosophila melanogaster* (Spradling et al., 1999).

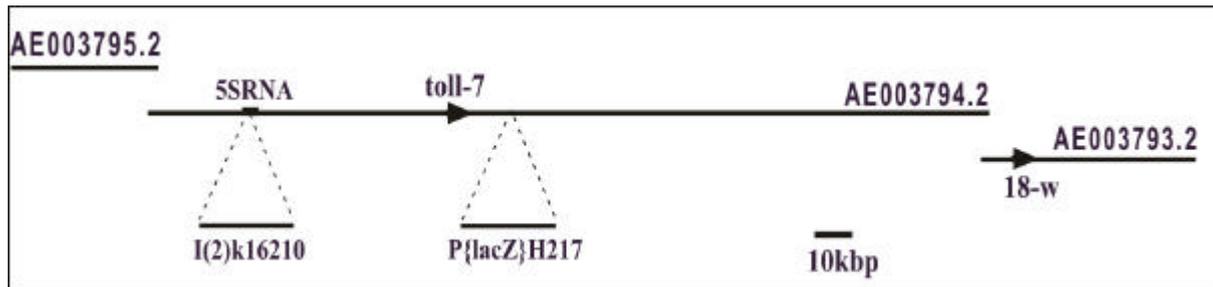


Abb. 17: Schematische Übersicht der Region 56F1 von Chromosom 2R

Dargestellt ist die relative Lokalisation zweier P-Elementinsertionen (I(2)k16210 und P{lacZ}H217) in der Region 56F1 auf dem genomischen Teilgerüst AE003794.2. Die Enden der beiden benachbarten Teilgerüsten des BDGP sind eingezeichnet, rechts das Teilgerüst AE003793.2, auf dem das *toll-7* Homolog *18-w* liegt.

Die homozygote Letalität der Linie I(2)k16210 könnte auf der Insertion in dem 5SrRNA Cluster beruhen und unabhängig von *toll-7* sein. Es stand damit weiterhin keine Mutante zur Verfügung, in der das *toll-7* Leseraster selbst betroffen ist.

Die vorhandenen Datenbanken wurden daher auf Defizienzen hin durchsucht, die in der näheren Umgebung von 56F1, also beispielsweise in 56F2 liegen. Die Angabe der Bruchpunkte solcher Defizienzen ist jedoch recht ungenau, es erschien daher durchaus möglich, dass *toll-7* in einer der benachbarten Defizienzlinien fehlt.

3.3.1.3.3 Deletionen in der Umgebung des *toll-7* Gens

Die beiden Defizienzlinien Df(2R)017 (Bloomington Stamm Nr. BL543) und Df(2R)173 (Bloomington Stamm Nr. BL340) weisen jeweils eine Defizienz auf, deren Lokalisation vom BDGP mit 56F5-56F15 angegeben wurde. Eiablagen dieser Linien wurden hitzefixiert und anschliessend auf die Toll-7 Expression hin untersucht. Dabei wurde das Auftreten von zwei Arten geschädigter Embryonen erwartet, und zwar solche, die homozygot bezüglich des Balancerchromosoms sind oder homozygot das Chromosom mit der Defizienz besitzen.

In den untersuchten Linien wurde Toll-7 in allen Embryonen nachgewiesen, die Entwicklungsschäden zeigten, sich aber mindestens bis zu dem für die Toll-7 Expression notwendigen Stadium 12 entwickelt hatten (Abb.18).

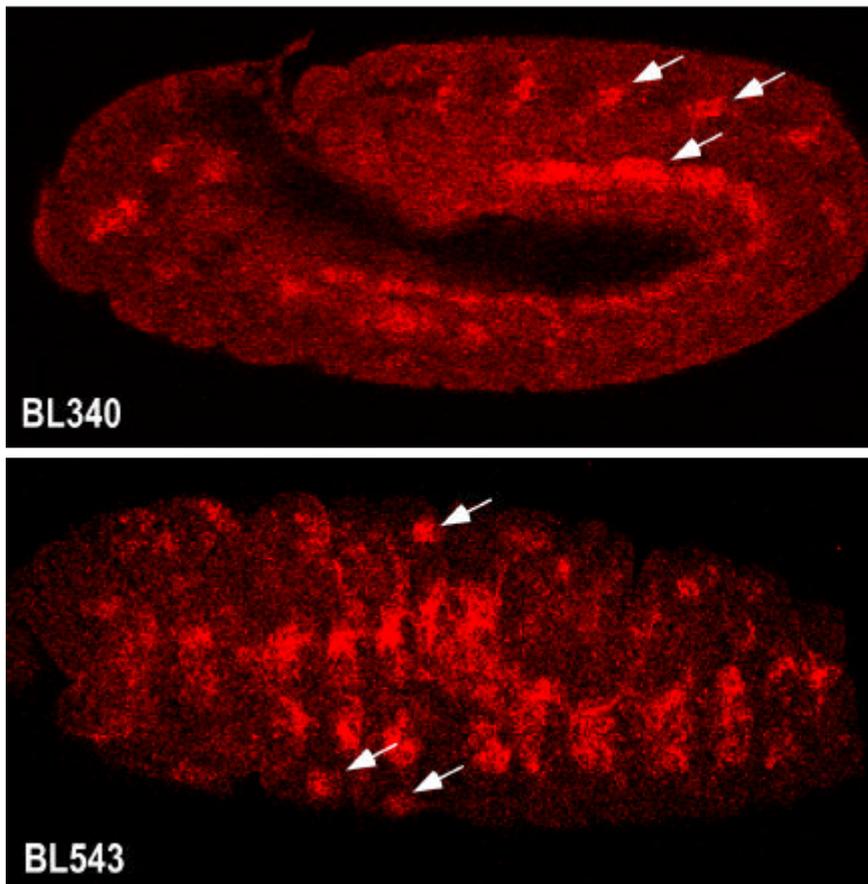


Abb.18: Toll-7 Expression in Defizienzlinien aus der Region 56F5-F15

Während die Linie BL340 kaum Schädigungen aufweist, sind die Embryonen von BL543 bereits sehr früh in der Embryogenese gestört.

Bei beiden Linien ist jedoch die Toll-7 Färbung noch deutlich zu erkennen (Pfeile), das Gen ist also nicht in dem jeweiligen deletierten Bereich enthalten.

Es wäre theoretisch möglich, dass ein homozygot mutanter *toll-7* Embryo sich nicht bis zum Stadium 12 entwickelt, ab dem eine Expression nachweisbar wäre. Die für die untersuchten Defizienzlinien gemachten Aussagen gelten damit unter der Voraussetzung, dass *toll-7* z.B. keine essentielle Bedeutung bei der Eireifung besitzt.

Die nach Feststellung der „2-Hybrid“-Interaktion des Toll-7 C-Terminus mit den Baz PDZ-Domänen durchgeführten Untersuchungen zur mRNA- und Proteinlokalisierung zeigen, dass eine Baz-Toll-7 Interaktion während der Embryogenese wahrscheinlich keine Funktion besitzt. Es existieren Hinweise auf eine mögliche larvale Funktion der Baz-Toll-7 Interaktion.

Es konnte gezeigt werden, dass Toll-7 ein Teil des zentralen und wahrscheinlich auch des peripheren Nervensystems ist. Ob es für den Aufbau des Nervensystems, seine Funktion oder sogar für beides notwendig ist, wird sich erst nach der Analyse von mutanten Formen beantworten lassen. Die in dieser Arbeit untersuchte P-Elementlinie H217 eignet sich zur Erzeugung von Mutanten, bei denen das Leseraster des *toll-7* Gens direkt betroffen ist.

3.3.2 Die Interaktionsklone BIC4 und BIC7 enthalten eine *pten* cDNA

BIC4 und BIC7 weisen beide ein nahezu identisches Insert von ca. 0,8 kB auf, in BIC4 ist die inserierte cDNA lediglich 54 bp länger als in BIC7. Diese cDNA ist zu 100% identisch zu dem *pten*-Gen von *Drosophila melanogaster* (Smith et al., 1999), wobei in dem Klon BIC4 der für die letzten 224 AS von DmPten codierende Bereich vorhanden ist. Die Säuger-Variante dieses Gens wurde unabhängig voneinander von mehreren Gruppen fast gleichzeitig gefunden, alternative Bezeichnungen für Pten ("phosphatase and tensin homolog") sind MMAC("mutated in multiple advanced cancers") und TEP1 ("TGF β -regulated and epithelial cell-enriched phosphatase 1") (Li and Sun, 1997; Li et al., 1997; Steck et al., 1997).

Kurz nach der Entdeckung des humanen *pten* wurde auch das homologe Gen in *Drosophila melanogaster* gefunden und drei verschiedene Splicevarianten (*pten*1-3), die sich vor allem am C-Terminus unterschieden, beschrieben (Smith et al., 1999). Bei der in BIC4 und 7 enthaltenen cDNA handelt es sich um eine vierte Splicevariante, die im folgenden mit *pten*4 bezeichnet wird. Kurz nach der Entdeckung der neuen Splicevariante in dieser Arbeit wurde eine entsprechende cDNA durch eine andere Arbeitsgruppe identifiziert (Huang et al., 1999).

Eine schematische Übersicht über die mit Baz interagierende Pten4 Form wird in der Abb.19 gegeben.

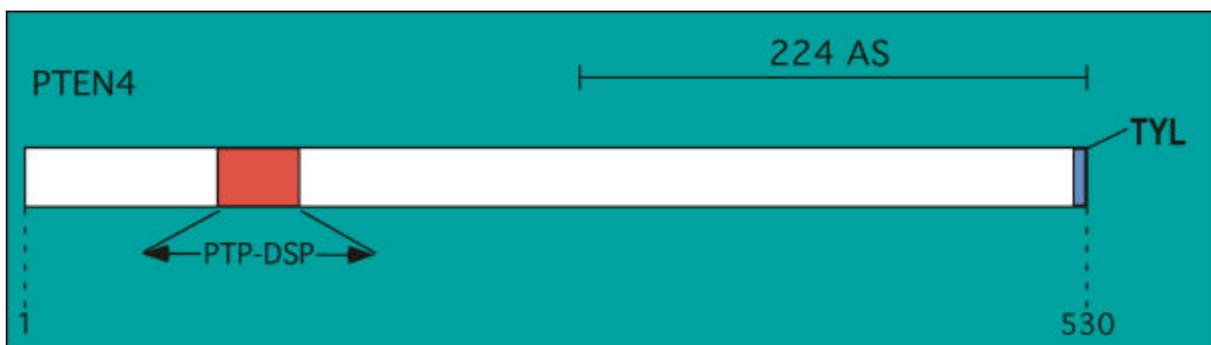


Abb.19: Schematische Übersicht über Pten4.

Das Protein weist eine zum N-Terminus hin liegende dualspezifische Phosphatase-Domäne (PTP-DSP) und ein C-Terminales PDZ-Domänen bindendes Motiv auf. Die C-Terminale 224 AS, die durch die in dem Klon BIC4 vorhandene cDNA kodiert werden, sind oben in dem Schema angezeigt.

Pten2 und die in dieser Arbeit neu beschriebene Form Pten4 unterscheiden sich nur durch das Fehlen von 3 AS im C-Terminalen Bereich von Pten2 (Abb.20). Wie der Vergleich mit der genomischen Sequenz von *Drosophila melanogaster* zeigt, liegt die für diese 3 AS codierende

Sequenz innerhalb eines Exons und es existieren keine Splicestellen, die den Verlust der drei AS in Pten2 erklären könnten.

Die Variationen an dem jeweils resultierenden DmPten-Protein befinden sich immer am C-Terminus, eine Übersicht über die resultierenden C-Termini wird in der Abb.20 gegeben.

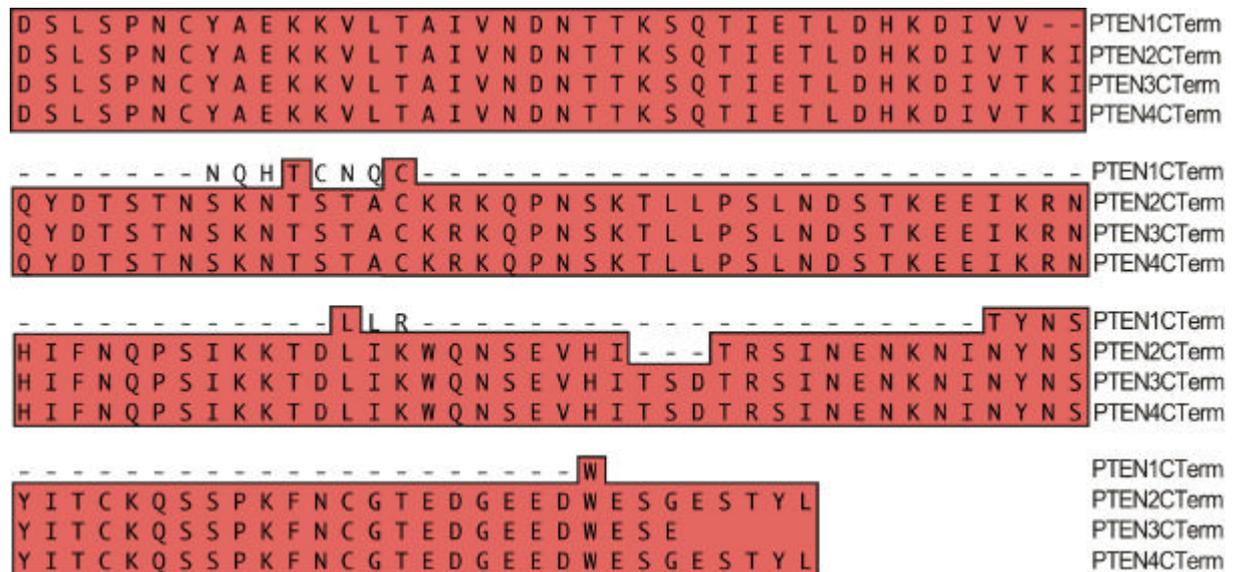


Abb.20: Vergleich der C-Termini der verschiedenen PTEN Varianten. Gezeigt wird der Bereich ab der AS 365. Der unmittelbare C-Terminus von Pten2 und Pten4 ist identisch, die beiden Formen unterscheiden sich lediglich durch ein TSD Motiv an der Position 469-471, welches bei Pten3 fehlt. Dieses TSD Motiv findet sich auch in Pten3 wieder, wobei Pten3 jedoch einen um 5 AS kürzeren C-Terminus aufweist. Sowohl Pten2 als auch Pten4 besitzen das unmittelbar am C-Terminus gelegene PDZ-Bindemotiv.

Um zu überprüfen, ob das C-Terminale –TYL Motiv für die Interaktion mit den Baz PDZ-Domänen verantwortlich ist, wurden DmPten Konstrukte mit verändertem C-Terminus auf die Interaktion im „2-Hybrid“-System hin untersucht. Hierzu wurden Konstrukte erzeugt, bei denen entweder die letzten drei AS des DmPten4 C-Terminus fehlten, oder der Pten4 C-Terminus zu dem der Pten3-Form umgewandelt wurde, welcher kein PDZ-Bindemotiv besitzt. Diese Konstrukte wurden durch PCR-Amplifikation des Inserts in BIC4 mit Primerpaaren erzeugt, bei denen der jeweilige 3'-Primer entsprechend verändert wurde (Tab.6 Mat. u. Meth.). Durch eine Sequenzierung wurden die sich jeweils ergebenden veränderten C-Termini bestätigt und anschliessend die Interaktion mit den drei PDZ-Domänen von BAZ überprüft. Die Pten3-Form kann hiernach nicht an die Baz PDZ-Domänen binden. Bei einer Deletion der letzten 3AS von Pten4 findet im „2-Hybrid“-System keine Bindung mehr an die PDZ-Domänen von Baz statt. Dies zeigt, dass Pten4 mit seinem unmittelbaren C-Terminus an Baz bindet.

DmPten4 bindet im „2-Hybrid“-System an jede der einzelnen PDZ-Domänen, wie der Interaktionstest mit den verschiedenen Domänen von Baz ergab (Tab.12). Aufgrund der Zeit, die bei dem X-Gal Test bis zur ersten Blaufärbung verging, ist die Bindung der 2. und 3. PDZ-Domäne an DmPten4 stärker als an die erste. Alle diese Interaktionstests liessen sich einwandfrei reproduzieren. Die Kontrolle mit dem pLAM5'-Plasmid blieb in unabhängig durchgeführten Transformationen stets negativ.

	PDZ1	PDZ2	PDZ3	PDZ1-2	PDZ2-3	PDZ1-3	BAZ
BIC4(p _{ten4})	+	++	++	++	++	++	+

Tab.12: Darstellung der Bindung von PTEN an verschiedene Bereiche sowie an das vollständige Baz Protein + schwache Interaktion, ++ starke Interaktion

3.3.2.1 Verteilung der *pten*-mRNA

Die mRNA von *pten* ist während der Embryogenese, mit Ausnahme der Polzellen, im gesamten Embryo ubiquitär verteilt. In der Abb.21 wird die mRNA-Verteilung in einigen Stadien der *Drosophila* Entwicklung dargestellt. Die sich bei der *in situ* Hybridisierung ergebende schnelle und starke Färbung zeigt, dass das *pten* Transkript in grossen Mengen während der Embryogenese vorhanden ist. Lediglich in den Polzellen ist keine *pten*-Expression zu erkennen (Abb.21B). Die beobachtete Färbung ist *pten*-spezifisch, da im Gegensatz zu der Färbung mit der antisense RNA-Sonde, mit der zur Kontrolle verwendeten sense-RNA keine Färbung beobachtet werden konnte (Abb.21D).

Auch in nicht zellularen Embryonen ist eine grosse Menge an *pten*-Transkript nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass *pten* eine maternale Komponente besitzt.

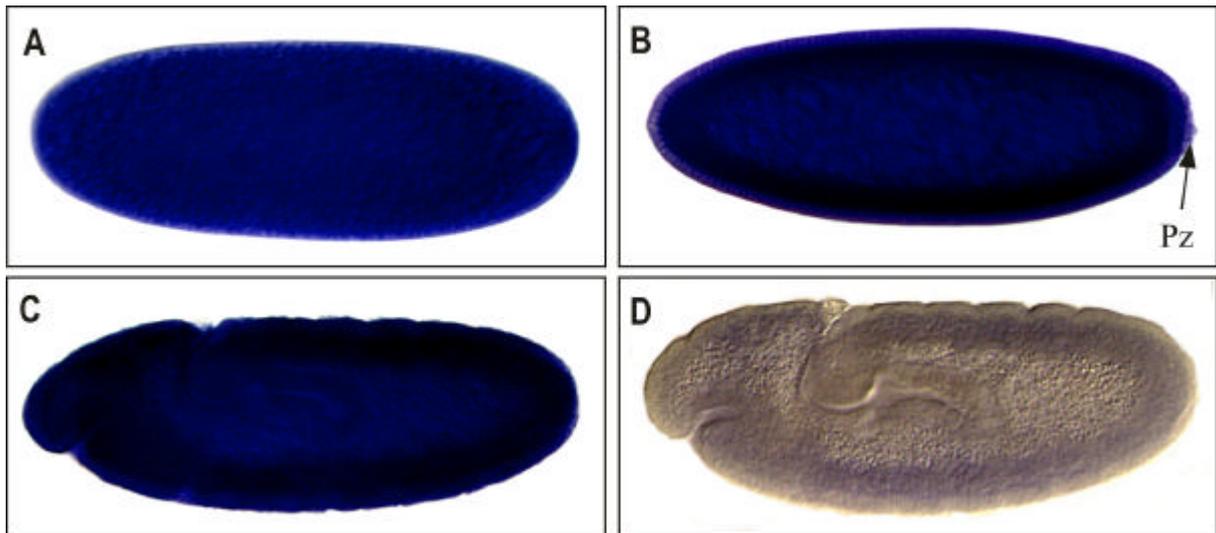


Abb.21: *pten*-RNA in WT-Embryonen.

A: syncytiales Blastodermstadium; B: zelluläres Blastodermstadium; C: Stadium 11; D: Hybridisierung mit einer sense-RNA Probe an einem Stadium 11-Embryo. Die äusserst intensive Färbung in verschiedensten Stadien zeigt die Stärke der *pten*-Expression. Diese überlagert im obigen Bild etwas die Polzellen (Pz), welche aber eindeutig nicht angefärbt sind.

3.3.2.2 Erzeugung eines DmPTEN spezifischen Antikörpers

Um die Verteilung des DmPten Proteins im Embryo zu untersuchen und später auch biochemische Experimente durchführen zu können, wurde ein GST-Fusionsprotein mit den letzten 200 AS des Pten4 Proteins erzeugt und dieses für die Immunisierung von Ratten und Kaninchen eingesetzt.

3.3.2.3 Spezifität des PTEN Antiserums

Zur Kontrolle des erzeugten DmPten-Antiserums wurde das Fusionsprotein, welches aus der GAL4AD und den letzten 224 AS von DPten4 besteht, in dem mit BIC4 transformierten Hefestamm nachgewiesen. Gleichzeitig wurde versucht, DmPten in Embryonen- und Zellkulturextrakten (Schneiderzellen, einer *Drosophila*-Zelllinie) nachzuweisen.

Hierzu wurden verschiedene Proteinfractionen unter denaturierenden Bedingungen auf einem Gel aufgetrennt und ein Western-Blot durchgeführt. Zur Kontrolle wurden auch Extrakte von Hefekulturen verwendet, die keine *Dmpten* cDNA enthielten (Abb. 22). Die ungefähre Grösse des erwarteten Fusionsproteins beträgt 43kDa, der DmPten4-Anteil liegt bei ungefähr 24kDa.

Bei den im folgenden gemachten Aussagen und gezeigten Abbildungen ist zu berücksichtigen, dass die Markerproteine des bei den Proteingelen verwendete Markers immer etwas höher laufen, als Proteine mit einem entsprechenden Molekulargewicht. Dies wurde durch den Vergleich mit anderen Proteinmarkern bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Mit dem Kaninchen- γ -DmPten4 Antikörper wurde in dem Extrakt aus Hefe, die mit dem GAL4-PTEN Plasmid transformiert worden war, eine ungefähr 60kDa grosse und eine Reihe zusätzlicher kleinerer Bande detektiert. Wegen der oben geschilderten Markerabweichung kann die 60kDa Bande dem GAL4AD-PTEN4 Protein zugeordnet werden, die kleineren Banden stellen Abbauprodukte dar.

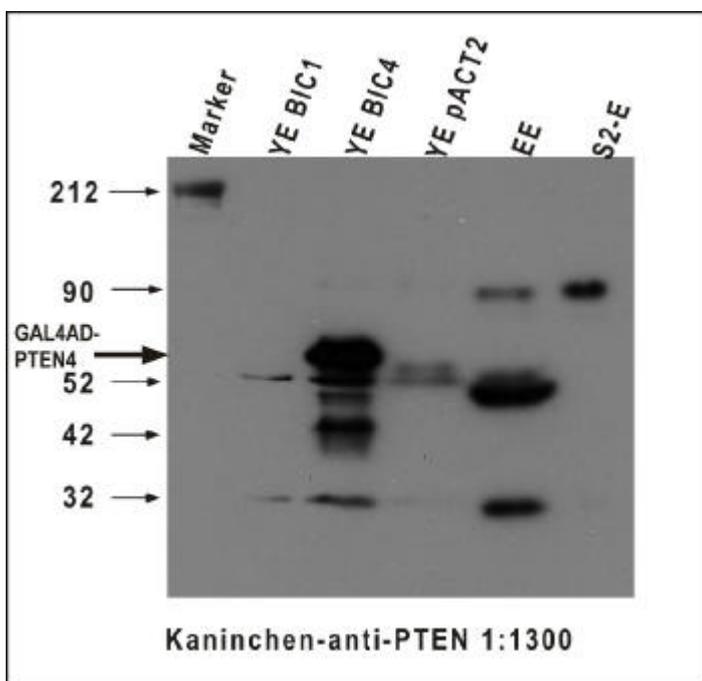


Abb. 22: Western-Blot zum Nachweis der Spezifität des PTEN Antikörpers.

YE: Hefeextrakt; BIC1: GAL4AD-Vektor mit *toll-7* cDNA; BIC4: GAL4AD-Vektor mit *pten4*-cDNA;

EE: Embryonenextrakt; S2-E: Schneiderzelleextrakt; pACT2: leerer GAL4AD-Vektor

In den Kontrollen mit leerem Vektor bzw. mit einem GAL4AD-TOLL-7 Protein wird keine dem GAL4AD-PTEN entsprechende Bande detektiert.

In dem zusammen mit den Hefeextrakten gleichzeitig getesteten Embryonenlysat und Schneiderzelleextrakt wurde jeweils eine ca. 85kDa grosse Bande nachgewiesen. Hierbei handelt es sich jedoch um ein kreuzreagierendes Protein, da bei einem "Western-Blot" mit Extrakten von *pten*-transformierten und untransformierten Schneiderzellen neben dieser unspezifischen Bande in dem Extrakt der transformierten Zellen eine spezifische ca. 70kDa grosse Bande detektiert wird, die bei untransformierten Zellen nicht auftritt (A.Wodarz,

persönliche Mitteilung). Das theoretische Molekulargewicht für DmPten4, wie es aufgrund der Proteinsequenz zu erwarten wäre, beträgt 61kDa. Auch bei den Experimenten von Andreas Wodarz wurde der o.g. Marker verwendet.

3.3.2.4 Untersuchung der PTEN Expression in Embryonalstadien

Mit den in Ratten und Kaninchen erzeugten, gegen PTEN4 gerichteten Antiseren wurde versucht zu zeigen, wo und wann in der Entwicklung des *Drosophila*-Embryos Pten exprimiert wird und ob möglicherweise eine Kolo-kalisation mit Baz besteht. Für diese Untersuchungen wurden sowohl WT-Embryonen als auch solche, bei denen in spezifischen Regionen *pten* überexprimiert wurde, verwendet.

Weder mit dem in Ratten noch dem in Kaninchen erzeugten Antiserum konnte in WT-Embryonen eine spezifische Lokalisation von Pten nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Trotz der nachgewiesenen Spezifität des Antiserums (s.o.), konnte kein signifikanter Unterschied bei Färbungen mit dem Immun- und dem Präimmunserum beobachtet werden.

3.3.2.5 Überexpression von *Dmpten4* mit dem UAS-GAL4 System

Da der DmPten Antikörper trotz seiner im "Western-Blot" gezeigten Spezifität wegen der indifferenten Färbung mit dem Immun- und dem Präimmunserum an WT-Embryonen keine Aussagen über eine Kolo-kalisation von Baz und Pten in diesen Embryonen zulässt, wurde Pten4 in Embryonen spezifisch überexprimiert. Hierzu wurde eine UAS-*pten* Linie verwendet, die freundlicherweise von Ernst Hafen, *Zürich*, zur Verfügung gestellt wurde. Bei der in dieser Linie vorhandenen *pten*-Form handelt es sich ebenfalls um *pten4* (Huang et al., 1999). Als Treiberlinie wurde der *engrailed*-GAL4 Stamm verwendet. Das *engrailed* Gen führt bei einer Expression im frühen Embryo zu einem charakteristischen Streifenmuster, die *engrailed*-mRNA kann u.a. in den Antennen-Segmenten, im ZNS, in der Epidermis und im Kopf nachgewiesen werden (DiNardo et al., 1988).

Die Überexpression von *pten* unter der Kontrolle des *engrailed*-Enhancers führt zu einer so starken Anreicherung von PTEN in einem *engrailed*-typischen Muster, dass es durch die erzeugten Antiseren nachgewiesen werden kann (Abb. 23).



Abb.23: Überexpression von PTEN unter der Kontrolle von *engrailed*
 Koimmunofärbung von enGAL4xUASPTEN Embryonen mit Kaninchen-anti-BAZ (grün) und Ratte-anti-PTEN(rot). Die unter UAS-Kontrolle stehende *pten4* cDNA wurde in diesen Embryonen unter Verwendung einer *engrailed*-Gal4-Treiberlinie überexprimiert.

Im Hinterdarmepithel führt die Überexpression dazu, dass DmPten4 an der apikalen Zelldomäne nachgewiesen werden kann, wo es mit Baz kolokalisierend ist (Abb. 24).

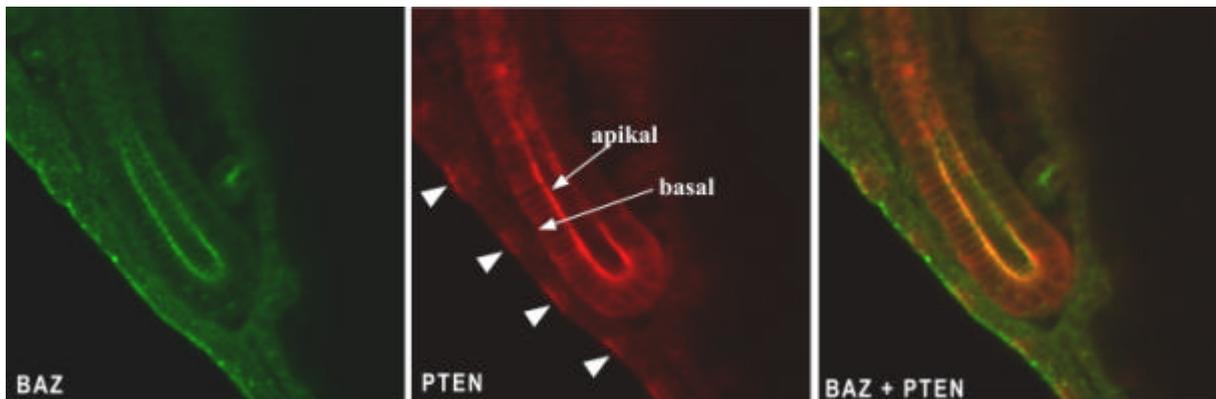


Abb. 24: Kolokalisation von Baz (grün) und Pten (rot) im Hinterdarm von enGal4/UASPten4 Embryonen
 Links: Baz Färbung in der Epidermis und auf der apikalen Seite des Hinterdarmepithels; Mitte: Pten4 wird an die dem Lumen zu gerichtete apikale Seite des Hinterdarmepithels rekrutiert. Aussen ist das epidermale, in den durch die *engrailed* Kontrolle entstehenden Streifen vorkommende, Pten zu erkennen (Pfeilköpfe); Rechts: Überlagerung der beiden Färbungen.

3.3.2.6 Der *pten*-Phänotyp in *pten*^{DJ189} Keimbahnklonen

In zygotischen Mutanten von *Dmpten* wird, wohl wegen der starken maternalen Komponente (*in situ* Abb.21) kein auffallender Phänotyp beobachtet. Bei einem Fehlen sowohl der mütterlichen als auch der zygotischen *pten*-Komponente treten bereits im zellulären Blastodermstadium die ersten Defekte auf. Nach einer Kernfärbung mit dem DNA-Farbstoff YoYo-1 sind in den *pten*^{DJ189}-Keimbahnklonen Zonen unterschiedlicher Kerndichte zu erkennen. Gleichzeitig erscheint die A/P Achse kürzer und die dorsal/ventrale (D/V) Achse länger als im WT (Abb. 25).

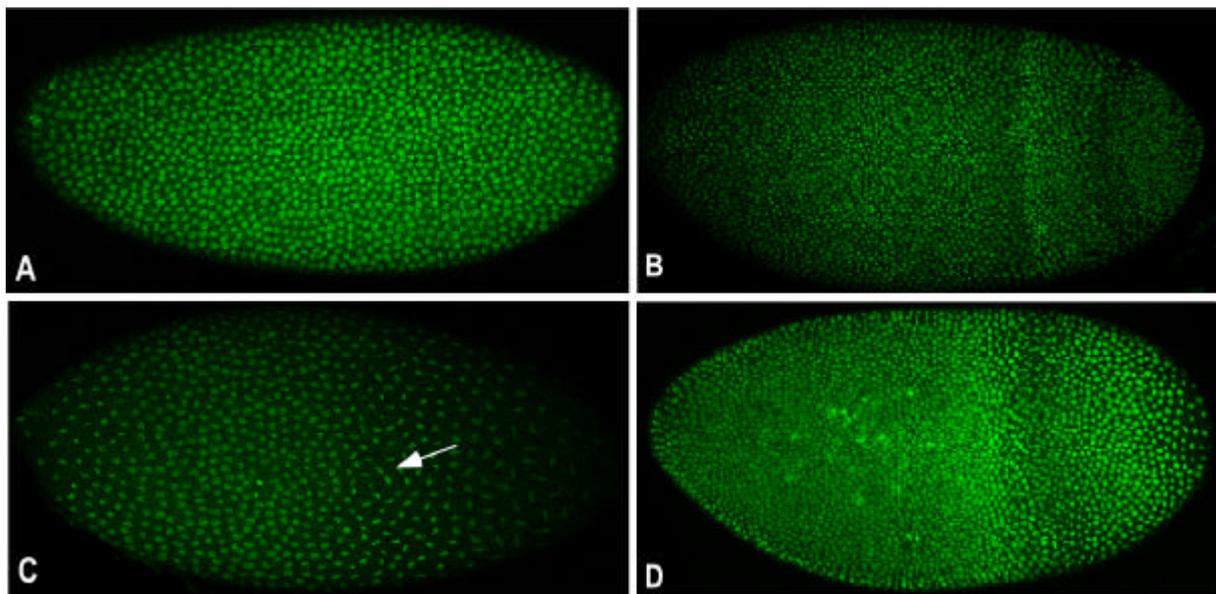


Abb.25: Kernfärbungen an *pten*^{DJ189} Keimbahnklonen

A: zelluläres Blastoderm eines WT-Embryos, B-D: zelluläre Blastodermstadien verschiedener *pten*^{DJ189} Keimbahnklone, in C wird durch den Pfeil eine Zone geringerer Kerndichte angezeigt

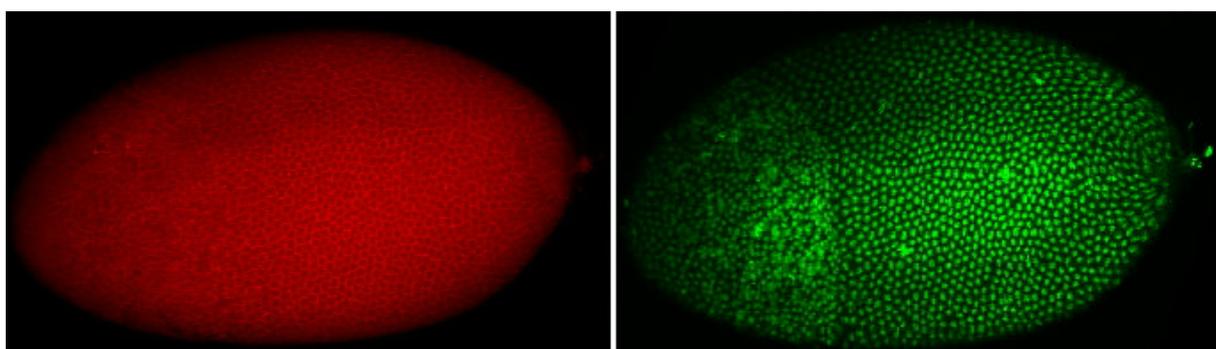


Abb.26: aPKC (rot) und Kernfärbung mit dem Nukleinsäurefarbstoff YoYo-1 (grün) an *pten*^{DJ189}-Keimbahnklonen. Während an einem Pol schon ca. 30% des Embryos in Auflösung begriffen ist, scheint der andere relativ intakt zu sein. Allerdings haben sich an der Spitze dieses "intakten" Pols auch schon einige Zellen aus dem Zellverband gelöst.

Die in *pten* Keimbahnklonen (KBK) auftretenden Defekte manifestieren sich neben einer veränderten Länge der A/P u. D/V Achsen auch in einer Degeneration an einem Ende des Embryos. Während die Zellularisierung auf der einen Seite des Embryos noch zu einem intakten Epithel zu führen scheint, sind an dem anderen Pol bereits massive Schäden zu

erkennen (Abb. 26). Bei vielen der durch die DNA-Färbung mit YoYo-1 sichtbaren Kerne wird die Färbung diffus, ein Anzeichen von Apoptose in diesen Zellen. Diese sollte durch TUNEL-„Assays“ oder Acridin-Orange Färbungen aber noch untersucht werden.

Es gibt Hinweise darauf, dass der Phänotyp der *pten*-KBK möglicherweise paternal gerettet wird (Abb. 27). Mehr als 90% der Embryonen zeigen schon sehr frühe Defekte, und entwickeln sich anscheinend nicht weiter als bis zum zellulären Blastodermstadium. Daneben finden sich aber auch solche, die weiterentwickelte Strukturen, wie z.B. die des Hinterdarms, zeigen (Abb.27). Diese Embryonen besitzen möglicherweise eine wildtypische *pten*-Kopie des Vaters, wobei eigentlich 25% paternal gerettete Embryonen erwartet werden. Um eine solche Rettung in Zukunft besser einschätzen zu können, sollten bei der Erzeugung von *pten*-Keimbahnklonen für die letzte Kreuzung Männchen verwendet werden, deren Balancer-Chromosom das lacZ Reportergen enthält. Paternal gerettete Embryonen lassen sich dann durch einen Nachweis von β -Galactosidase identifizieren.

Abb.27: Möglicherweise paternal gerettete Embryonen von *pten*-KBK

Während mit dem aPKC Antikörper (rot) die Darmepithelien angefärbt werden, zeigt die in vielen Teilen des Embryos bereits sehr diffus gewordenen Kernfärbung mit YoYo-1 (grün) an, dass in vielen Bereichen des Embryos Apoptose eingetreten ist.

3.3.3 BIC5 enthält ein VSM1-Homolog

Bei BIC5 handelt es sich um ein Plasmid, bei dem das „In-frame“ mit der Gal4AD vorliegende Leseraster zu einem Fusionsprotein mit nur 8 AS führen würde, die durch die inserierte cDNA codiert werden. Eine Klonierung zur Verschiebung des Leserasters führte zu

einem offenen Leseraster, bei dem das entstehende GAL4AD-Fusionsprotein 457 AS besitzt, welche durch die inserierte cDNA kodiert werden. Der Test mit dem 2-Hybrid-System zeigte, dass auch das durch die Leserasterverschiebung entstandene neue Plasmid bei einer Kotransformation mit pGBT9/PDZ1-3 in der Lage ist, auf His⁻/3-AT Medium zu wachsen und eine positive *lacZ* Reporteragenaktivität hervorzurufen. Ein Datenbankvergleich zeigt, dass die cDNA in BIC5 zu 100% identisch zu einem vorhergesagten Gen mit der Bezeichnung CG4420 ist. CG4420 kodiert für ein 458 AS langes Protein (Abb.28), dessen unmittelbarer C-Terminus die drei AS -ELS umfasst. Lediglich der für das N-Terminale Methionin codierende Teil dieses Proteins fehlt in der inserierten cDNA von BIC5.

Über den AS-Bereich von 198 bis 445 des CG4420 Proteins besteht eine 38%ige Identität zu VSM1/DDI1 ("v-SNARE-Master1"; "DNA-Damage Inducible protein 1") von *Saccharomyces cerevisiae* (Liu et al., 1997; Lustgarten and Gerst, 1999). VSM1 agiert als ein v-SNARE bindendes Protein, welches an sekretorische Vesikel binden kann (Lustgarten and Gerst, 1999).

Die vorhergesagte Proteinsequenz weist eine Ubiquitindomäne am N-Terminus und eine C-Terminale Ubiquitin assoziierte Domäne (UBA) auf.

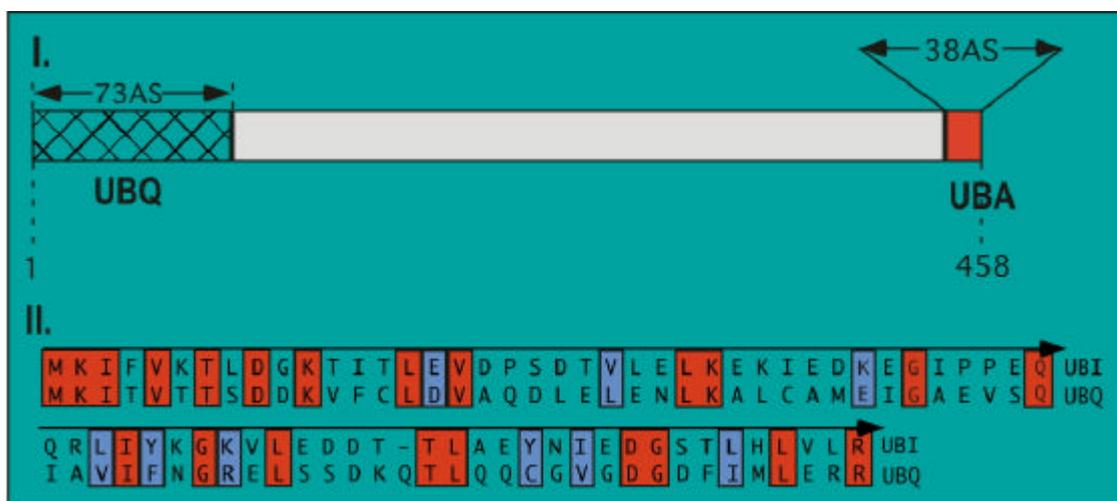


Abb.28: Die Struktur des CG4420-Proteins

Darstellung der Domänenstruktur des durch CG4420 codierten Proteins (**I.**) und ein direkter Vergleich der N-Terminale Ubiquitin-Domäne dieses Proteins mit Ubiquitin (**II.**). Gleiche AS sind rot, funktionelle Substitutionen blau unterlegt. UBI: Sequenz des Hefeubiquitins; UBQ: Ubiquitin-Domäne; UBA: Ubiquitin-assoziationsdomäne

Die UBA-Domäne taucht in Untergruppen von Proteinfamilien auf, die in dem Ubiquitin vermittelten Proteinabbau durch das zelluläre Proteasom eine Rolle spielen. Proteinabbau ist ein Teil des *C.elegans* Mechanismus bei der asymmetrische Verteilung von Proteinen und

findet möglicherweise auch während der NB-Mitose in *Drosophila melanogaster* statt, bei der Baz, DaPKC und Insc während der Anaphase nicht mehr nachweisbar sind (siehe Einleitung).

3.3.4 BIC8 codiert für das vorhergesagte Gen CG18253

Wie bei dem Klon BIC5 bricht auch hier kurz nach der GAL4AD der Leseraster ab. Somit hätte das entstandenen Fusionsprotein nur 25 AS, die von der cDNA codiert werden. Ein anderer Leseraster würde jedoch zusätzlich den AS der GAL4AD 506 AS hinzufügen, zudem besäße der C-Terminus dieses Proteins ein PDZ-Bindemotiv. Durch eine Klonierung zur Verschiebung des Leserasters wurde die GAL4AD Sequenz "in-frame"- zu dem längeren Leseraster erhalten. Wie schon bei dem Klon BIC5 resultiert aus der Leserasterverschiebung ein Plasmid, dass mit dem verschobenen Leseraster weiterhin im „2-Hybrid“-System positiv reagiert.

Zur Eingrenzung des Bereiches in Baz, der für die Bindung an BIC8 verantwortlich ist, wurden weitere „2-Hybrid“-Interaktionen geprüft (Tab.13). Hiernach erfolgt die Bindung wahrscheinlich über die zweite PDZ-Domäne von Baz, was jedoch noch durch den Interaktionstest mit nur jeweils einer der PDZ-Domänen überprüft werden muss.

	PDZ1-2	PDZ2-3	PDZ1-3
BIC8	++	++	++

Tab.13: Interaktionen zwischen BIC8 und verschiedenen Baz PDZ-Domänenbereichen

Die im „2-Hybrid“-System getesteten Kombinationen zur Eingrenzung der Baz Bindungsdomäne für BIC8.

– keine Interaktion, ++ starke Interaktion

Das Insert in BIC8 ist zu 100% identisch zu dem vorhergesagten Gen CG18253, welches im Bereich 82D des *Drosophila melanogaster* Chromosom 3 liegt. Eine CG18253 entsprechende Sequenz ist auch in einem EST-Klon mit der Bezeichnung GH26442 aus dem BDGP enthalten. Dieser Klon wurde durchsequenziert, um die vollständige CG18253 cDNA-Sequenz zu erhalten. Die BIC8 und GH26442 Sequenzen wurden zur Aufklärung der Genstruktur von CG18253 verwendet.

3.3.4.1 Genstruktur von CG18253

Durch das BDGP wurden in dem genomischen Teilgerüst AE003605.2 zwei aufeinanderfolgende Gene mit den Bezeichnungen CG18253 und CG1055 postuliert. Der Vergleich der GH26442 und BIC8 cDNAs mit der Sequenz von AE003605.2 zeigte, dass die vom BDGP vorhergesagten Gene in Wirklichkeit Teile eines Gens darstellen, welches die Bezeichnung CG18253 beibehält, während CG1055 nunmehr weggefallen ist.

Der Vergleich der GH26442 cDNA-Sequenz mit der von BIC8 zeigt, dass eines der CG18253 Exons alternativ genutzt und 2 verschiedene Spliceformen gebildet werden können (Abb.29). Die beiden mRNA Sequenzen ergeben sich danach durch die Aneinanderreihung folgender Bereiche des genomischen Teilgerüsts AE003605.2, wobei der rot hervorgehobene Bereich alternativ genutzt wird:

Exon1: 137337..137533, Exon2: 138194..139274, Exon3: 139844..140217,
 Exon4: 140328..141238, Exon5: 141345..141520, Exon6: 141784..141888,
 Exon7: 142066..143121.

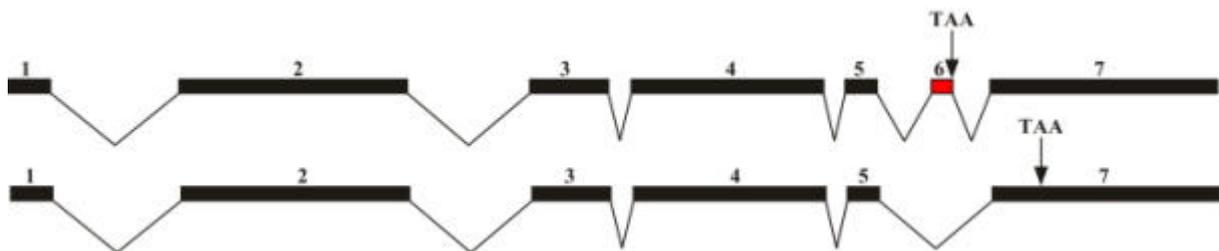


Abb.29: Exon-Intron Struktur von CG18253

Die Entstehung von zwei Splicevarianten durch die alternative Insertion von Exon Nr.6 (rot). Die Position des jeweils genutzten STOP-Codons ist durch einen Pfeil markiert.

Beide Transkripte werden im Fliegenembryo gebildet, in dem EST-Klon GH26442 ist das zusätzliche Exon vorhanden, während es bei der in BIC8 vorliegenden cDNA fehlt. Eine „Northern-Blot“-Analyse wurde jedoch nicht durchgeführt. Durch das zusätzliche Exon in GH26442 wird ein kürzeres offenes Leseraster erzeugt, als ohne dieses Exon, da ein STOP-Codon am Ende dieses Exons (141849-141851 in AE003605.2) zum Abbruch des Leserasters führt. Ohne dieses Exon dient ein im letzten Exon liegendes Basentriplett als Signal für den Translationsstop (142251-142253 in AE003605.2). Die Konsequenz sind zwei mögliche Proteine mit einem völlig verschiedenen C-Terminus. Das eine Protein hätte 849 AS und würde mit einem -VWV-Motiv enden, das andere Protein hätte 889 AS mit dem typischen PDZ-Domänen Bindemotiv -SCV am unmittelbaren C-Terminus. Zusätzlich zu dem Bindemotiv weist das längere Protein im Gegensatz zum kürzeren eine RING- und damit überlappend eine LIM-Domäne auf. Die Struktur des 889 AS langen Proteins, dessen C-

Terminale 506 AS durch die in dem „2-Hybrid“-Interaktionsklon BIC8 vorhandene cDNA codiert werden, ist in der Abb. 30 schematisch wiedergegeben.

Bei einem auf Nukleotid- und Proteinebene durchgeführten Sequenzvergleich mit in Datenbanken vorhandenen Sequenzen konnten keine zu CG18253 homologen Sequenzen gefunden werden. Ähnlichkeiten finden sich nur in dem LIM-Domänenbereich.

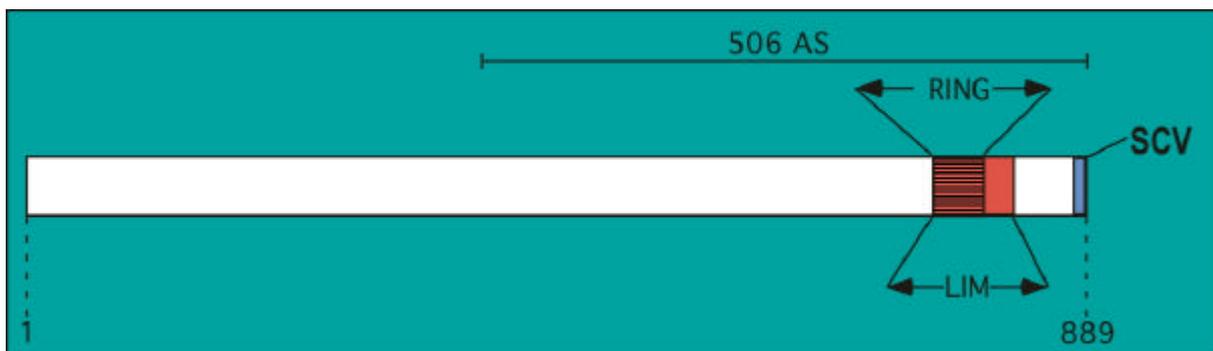


Abb.30: Struktur des LIM- und RING-Domänen Proteins

Schematische Darstellung der Struktur des 889 AS langen Proteins, welches eine Interaktion mit den PDZ-Domänen von BAZ aufweist. Die LIM-Domäne ist rot gekennzeichnet, die damit überlappende RING-Domäne schraffiert dargestellt. Das sich am unmittelbaren C-Terminus befindliche PDZ-Bindemotiv wurde blau hervorgehoben. Durch den oben befindlichen schwarzen Balken sind die letzten 506 AS angegeben, die durch die BIC8 cDNA kodiert werden.

LIM-Domänen sind Zink-bindende Domänen, die z.B. auch in den C.elegans Proteinen Lin-11 (Freyd et al., 1990) und Mec-3 (Way et al., 1991) vorkommen. Sie dienen als Protein-Protein Interaktionsdomänen und enthalten oft noch andere Domänen, wie z.B. Homöo-, Kinase- oder weiteren LIM-Domänen (Übersichtsartikel: Dawid et al., 1998).

Die RING Domäne ist ein spezialisierter Typ eines Protein-Protein Interaktionen vermittelnden Zink-Fingers, der aus 40-60 AS besteht, und an zwei Zink-Atome binden kann. Eine solche Domäne ist charakteristisch für Mitglieder der RING-Klasse von E3 Ubiquitin Protein Ligasen, welche Ubiquitin von einem E2 Enzym auf ein Substratprotein übertragen. Die RING Domäne vermittelt die Interaktion mit dem passenden E2 Enzym (Freemont, 2000; Tyers and Jorgensen, 2000).

3.3.4.2. Das Expressionsmuster von CG18253 ähnelt dem von *crb*, *sdt* und *baz*

Die Expression von CG18235 wurde durch eine *in situ* Hybridisierung mit einer DIG-markierten RNA-Sonde durchgeführt, welche durch eine Transkriptionsreaktion mit der gesamten cDNA aus dem Klon BIC8 erhalten wurde.

CG18235 wird ausschliesslich in Epithelien exprimiert, wo die mRNA eine apikale Lokalisation aufweist (Abb.31A-F). In frühen Stadien ist eine nur schwache Expression zu erkennen, eine maternale Komponente ist nicht oder nur in geringem Umfang vorhanden. Bereits im zellulären Blastoderm befindet sich die mRNA im Epithel auf der apikalen Seite (Abb.31A). In dem durch Invagination entstehenden Hinterdarm ist in früheren Stadien keine Expression von CG18235 zu erkennen, ab ca. Stadium 13 ist die Expression sehr stark und die mRNA wird wie im epidermalen Epithel ausschliesslich zum apikalen Zellcortex hin rekrutiert (Abb. 31D).

Auch im Vorderdarmepithel, in den trachealen Gruben und in den Malpighischen Gefässen wird die mRNA dedektiert, wobei sie auch hier eine apikale Lokalisation aufweist (Abb.31F).

Das Expressionsmuster ähnelt sehr stark dem von *stardust*, *crumbs* und *bazooka*, die ebenfalls epithelial exprimiert werden, und deren mRNA apikal lokalisiert ist (Bachmann et al., 2001; Tepass et al., 1990; Kuchinke et al., 1998).

Im Gegensatz zur *baz*-mRNA Lokalisation in Neuroblasten (Kuchinke et al., 1998) konnte für CG18235 eine solche nicht beobachtet werden. Ein weiterer Unterschied zu *baz* besteht in dem Beginn der Expression im Hinterdarmepithel, bei *baz* findet diese bereits ab Stadium 8 statt.

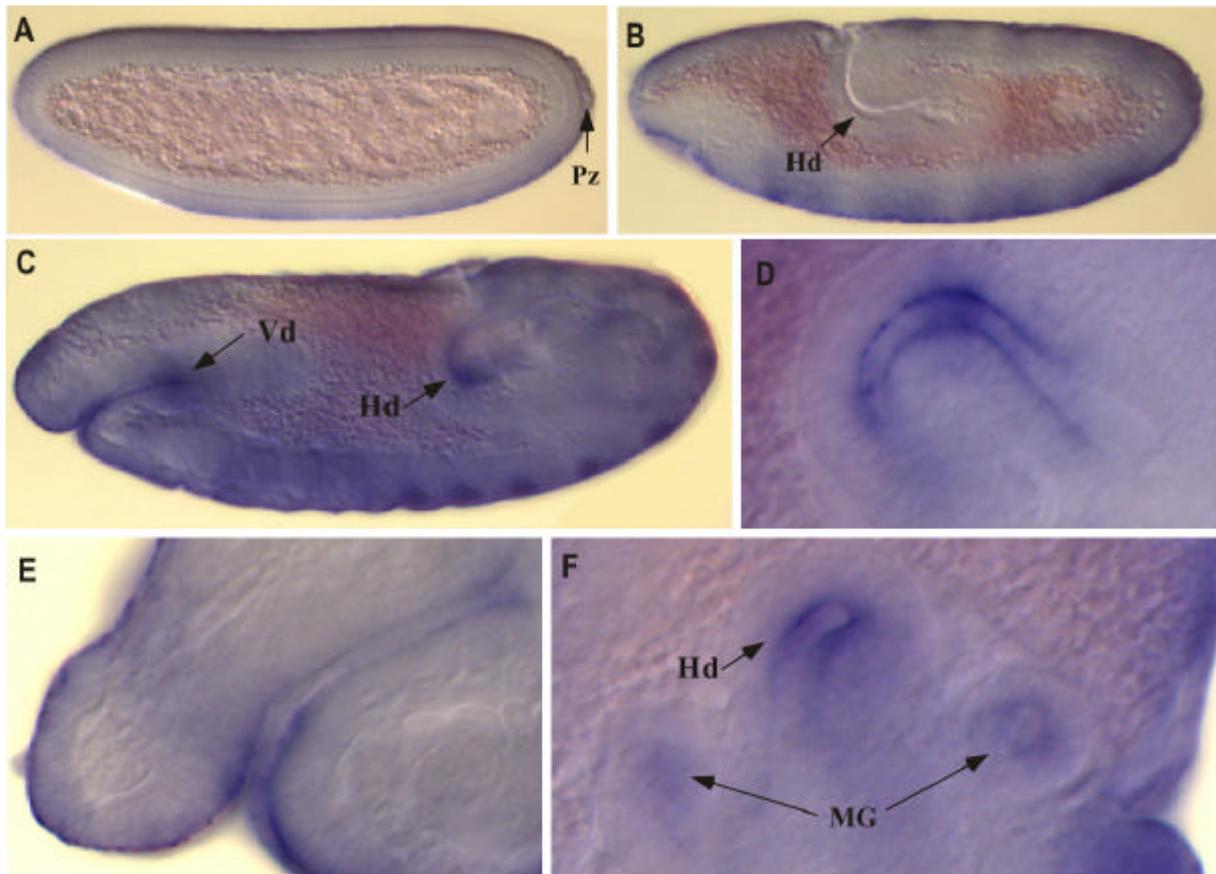


Abb. 31: Untersuchung der RNA-Verteilung von CG18235 in WT-Embryonen.

A-C: laterale Ansicht von whole mount Embryonen, anterior ist links, ventral unten

A: Stadium 5 Embryo mit Polzellen (Pz), B: Stadium 9 Embryo mit beginnender Einstülpung des Hinterdarms (Hd), C: Stadium 14 Embryo, mit vergrößerter Ansicht von Hinterdarm und Vorderdarm (Vd), D: vergrößerte Darstellung des Hd-Bereichs, E: vergrößerte Darstellung des Vd-Bereichs, F: vergrößerte Darstellung des posterioren Bereiches eines Stadium 14 Embryos mit Hd und Malpighischen Gefässen (MG).

Das Expressionsmuster der mRNA und die „2-Hybrid“-Interaktion des CG18235 C-Terminus mit Baz lassen CG18235 als einen sehr vielversprechenden Kandidaten mit einem Einfluss auf die Epithelpolarität erscheinen.

3.4. Test von Kandidaten für Interaktionspartner von BAZ im 2-Hybrid-System

Sowohl bei *C.elegans* (Tabuse et al., 1998) als auch bei Vertebraten (Izumi et al., 1998) wurde eine Interaktion von PAR-3 bzw. Asip mit einer atypischen PKC beschrieben. Auch bei *D. melanogaster* wurde daher nach einer entsprechenden aPKC gesucht, die möglicherweise in analoger Weise an Baz binden kann.

Ein weiterer Kandidat ist PAR-6, ein Protein mit einer PDZ-Domäne, welches bei *C.elegans* zu dem durch PAR-3 gebildeten Komplex gehört (Hung and Kemphues, 1999). Das sehr konservierte PAR6 bindet bei Vertebraten direkt an Asip (Lin et al., 2000). Daher wurde eine *Drosophila*-Form von PAR-6 gesucht, um die mögliche Interaktion zu testen.

Das Multi-PDZ-Domänen Protein Discs Lost enthält 4 PDZ-Domänen und ist Teil des subapikalen Komplexes (SAC) (Bhat et al., 1999; Klebes and Knust, 2000). Wegen der identischen Proteinlokalisierung und dem PDZ-Bindemotiv am Baz C-Terminus schien Dlt als ein möglicher Bindungspartner von BAZ in Frage zu kommen.

3.4.1 Die atypische PKC von *Drosophila melanogaster*

Ein Gen, welches für eine atypische PKC codiert, war bisher noch nicht beschrieben worden. In der BDGP-Datenbank wurde von Andreas Wodarz ein EST-Klon mit der Bezeichnung HL05754 gefunden, dessen inserierte cDNA eine starke Homologie zur aPKC ? von Vertebraten aufweist. Die cDNA in dem EST-Klon wurde durchsequenziert, sie besteht aus einem 4,5kb langen Hybrid zweier verschiedenen cDNAs (Abb.32). Der 3' Bereich der aPKC einschliesslich des Translationsstops ist nicht vorhanden. Dieser Bereich wurde daher durch eine 3'-RACE-Reaktion kloniert. Bei der Auswahl der Primer für die RACE-Reaktion konnte die BDGP-Sequenz genutzt werden, die es durch ein Alignment von bekannten aPKC Sequenzen anderer Organismen ermöglichte, die wahrscheinliche *Drosophila melanogaster* aPKC3'-Sequenz vorherzusagen. Dies ermöglichte es, für die durchzuführende 3'-RACE-Reaktion nicht nur am 5' Ende einen äusseren und inneren Primer auszuwählen, auch am 3' Ende konnte zusätzlich zu dem polydT Primer ein innerer Primer ausgewählt werden (Abb.32 u. 33).

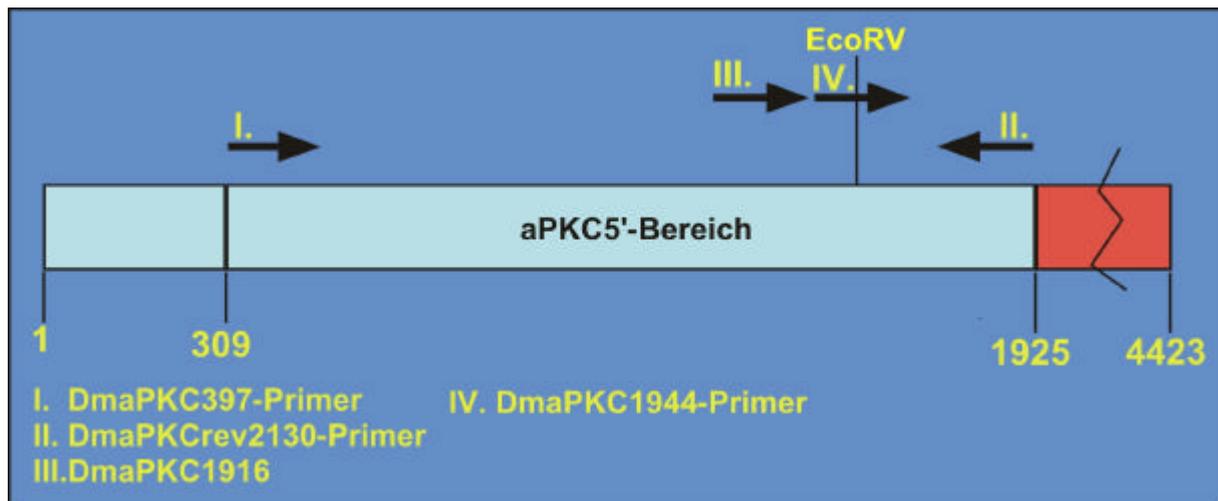


Abb. 32: Überblick über den EST-Klon HL05754

Die Position 1 steht für die erste Base der inserierten cDNA. Die vorhandene codierende Sequenz der aPKC umfasst den Bereich von Position 309 bis 1925. Die cDNA bis einschliesslich der Position 1925 (hellblau) stammt aus der Region 51D7 auf Chromosom 2R, während der Bereich hinter 1925 (rot) aus 52C stammt. Die Primer I. und II. wurden für die Klonierung des in HL05754 vorhandenen aPKC-Teils in pACT2 benutzt, Primer III. und IV. als „nested“ Primer für eine RACE-Reaktion.

3.4.2 3'-RACE zur Amplifikation des fehlenden aPKC Endes

Für die Durchführung der RACE-Reaktion wurde eine von Bernd Kramatschek präparierte mRNA genutzt. Die hieraus synthetisierte cDNA wurde als Matritze in einem ersten PCR-Schritt eingesetzt, bei dem ein Oligo-dT-Ankerprimer und ein Primer DmaPKC1916 verwendet wurden. Letzterer liegt noch vor dem Primer DmaPKC1944 (Lokalisation der Primer in Abb.31). Ein Teil des ersten PCR-Ansatzes wurde dann in einem zweiten PCR-Schritt verwendet, bei dem als innere Primer der DmaPKC1944 und ein mit aPKCrev bezeichneter verwendet wurden. Die Sequenz des letzteren stammt aus dem 3'-Bereich der DaPKC. Einen Überblick über den Ablauf der RACE-Reaktion wird in der Abb. 32 gegeben.

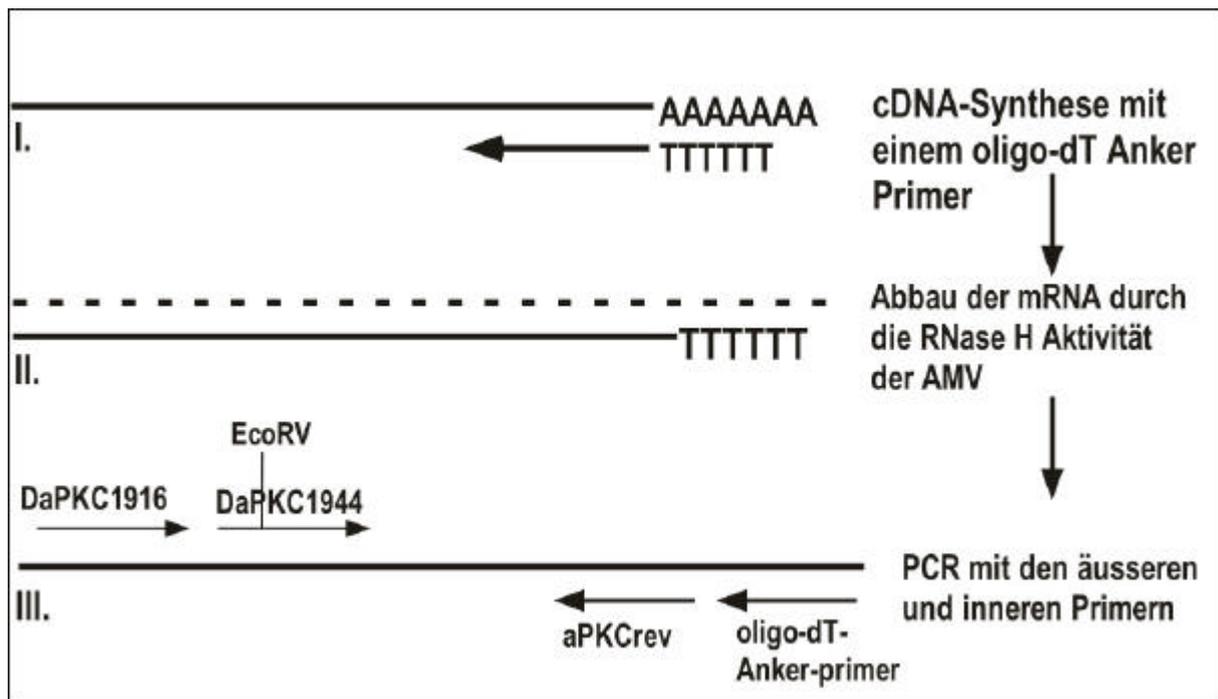


Abb.33: Darstellung der Klonierung des DmaPKC 3'-Bereiches durch eine 3'-RACE-Reaktion

In Schritt I. wird aus poly A+RNA mit einem oligo dT-Primer ein Gemisch von verschiedenen DNA/RNA Hybriden erzeugt, woraufhin in Schritt II. der RNA Anteil abgebaut und ein DNA/DNA Doppelstrang erzeugt wird. In Schritt III. wird dann mit „nested“ Primern ein Teil einer bestimmten cDNA spezifisch amplifiziert, wobei einer der äusseren Primer ein oligo-dT-Primer ist, der an dem poly-A Schwanz der cDNA ansetzt. Der DaPKC1944 Primer enthält eine interne EcoRV Restriktionsschnittstelle, die zum Zusammenfügen des 5'- und des 3'-Bereiches dient.

Die PCR-Reaktion mit den beiden inneren Primern DmaPKC1944 / aPKCrev ergab ein spezifisches Amplifikat. Nach der Klonierung des PCR-Produktes in den pCRTPOPO-Vektor von *Stratagene*, Heidelberg wurde das Insert sequenziert, der Vergleich mit der erwarteten Sequenz zeigte, dass es sich bei der klonierten DNA tatsächlich um den gesuchten aPKC3'-Bereich handelt. Da der bei der RACE-Reaktion verwendete innere Primer DmaPKC1944 eine EcoRV-Rastriktionsschnittstelle beinhaltet, welche innerhalb der DaPKC Sequenz nur einmal vorhanden ist, wurden über diese Schnittstelle der in dem EST-Klon vorhandene aPKC-Teil mit dem durch die RACE-Reaktion erhaltenen 3'-Teil verbunden.

4.1.3 Klonierung des gesamten codierenden Bereiches der aPKC in den pACT2 Vektor

Da vor dem Abschluss der RACE-Klonierung des 3'-Bereiches nur der 5'-Anteil der aPKC zur Verfügung stand, wurde zunächst nur dieser in den 2-Hybridvektor pACT2 kloniert. Hierzu wurde der Bereich, der für die Aminosäuren 6-606 der aPKC codiert, mit den Primern DmaPKC397 und DmaPKC2130 amplifiziert. Unter Verwendung der an die Primer angefügten Schnittstellen EcoRI bzw. BglII wurde das PCR-Fragment zwischen die BamHI und die EcoRI Restriktionsschnittstellen des Hefektors inseriert.

Mit SmaI und EcoRV wurde der aPKC Anteil dann in den pBS KS (+) Vektor (Stratagene) umklont. Der 3' Teil der aPKC wurde mit EcoRV aus dem pCRII-TOPO Vektor ausgeschnitten und hinter den aPKC5'-Teil gesetzt, der sich bereits in dem pBS KS (+) befand. Der sich so ergebende bis auf 15bp vom 5'-Ende vollständige aPKC ORF wurde mit SmaI und XhoI aus dem pBS KS (+) Vektor ausgeschnitten und zwischen die entsprechenden Schnittstellen des pACT2 inseriert.

3.4.1.4 Interaktion von DaPKC mit Proteinen des Baz-Komplexes

Die vorhandenen pGBT9- und pAS2-1-Konstrukte wurden zusammen mit dem aPKC Konstrukt in pACT2 auf eine Interaktion in dem Hefestamm Y190 hin getestet. Dabei zeigte sich eine schwache Interaktion mit den drei PDZ-Domänen von Baz. Zur Eingrenzung des Bereiches der 3 PDZ-Domänen, der für die Interaktion mit DaPKC verantwortlich ist, wurde jede PDZ-Domäne einzeln, die erste zusammen mit der zweiten sowie die zweite mit der dritten zusammen auf die Interaktion hin getestet. Hiernach bindet die aPKC nur, wenn die zweite und die dritte PDZ-Domäne zusammen vorliegen (Tab.14).

	PDZ1	PDZ2	PDZ3	PDZ1-2	PDZ2-3	PDZ1-3	Baz 1-1464	Baz 740-1464
aPKC	-	-	-	-	+	+	-	-
aPKC 525-606	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	-	n.g.	n.g.

Tab.14: Überblick über die im „2-Hybrid“-System getesteten Kombinationen zur Eingrenzung DaPKC Bindungsdomäne in Baz – keine Interaktion, + schwache Interaktion, n.g.: nicht geprüft

DaPKC bindet im „2-Hybrid“-System nicht an die letzten 724 AS von Baz (Baz740-1464). Dies steht im Gegensatz zu der beschriebenen Bindung von Asip an PKC? bei Vertebraten, wo die Kinase an einen Bereich hinter den PDZ-Domänen bindet (vgl. Abb.6). Für das Fusionsprotein aus Gal4AD und den AS 6-606 der DaPKC konnte ebenso wie für ein Gal4AD Fusionsprotein mit den letzten 81AS von DaPKC (aPKC525-606) keine Interaktion mit den PDZ-Domänen von Baz gezeigt werden.

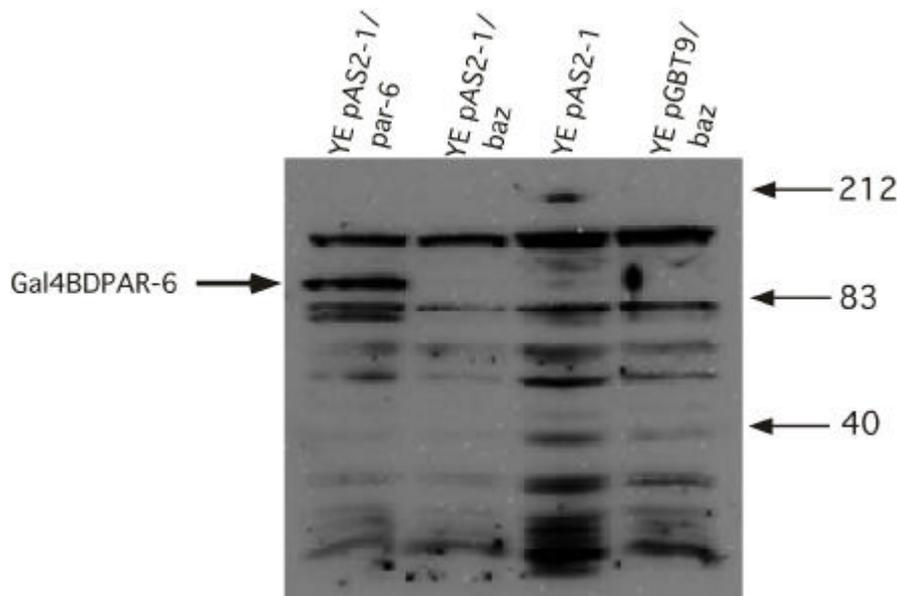
DaPKC konnte im „2-Hybrid“-System nicht an das vollständige Baz-Protein (Baz1-1464) binden. Auch hier beruht dies möglicherweise auf dem schon beschriebenen Vorteil kürzerer Fragmente gegenüber einem vollständigen Protein im „2-Hybrid“-System.

3.4.2 Interaktion von DmPar-6 mit BAZ

Bei DmPar-6 handelt es sich um ein 351 AS langes Protein, welches eine PDZ-Domäne besitzt und genau wie Baz und die aPKC am apikalen Epithel- und NB-Cortex lokalisiert ist.

Während diese Arbeit noch andauerte, wurde durch eine Arbeitsgruppe in Wien die Bindung von DmPar-6 an Baz durch GST-„Pull-down“-Experimente bereits gezeigt (Petronczki and Knoblich, 2001). In dieser Arbeit wurde versucht zu zeigen, dass DmPar-6 auch im „2-Hybrid“-System an Baz binden kann, um dann mit diesem System die Bindedomäne gegebenenfalls eingrenzen zu können. Zunächst wurde der Fall untersucht, ob DmPar-6, fusioniert mit der Gal4BD an Gal4AD-BAZ binden kann. Ein Teil der in Tabelle 14 dargestellten Ergebnisse umfasst diese Untersuchungen.

Die Bildung des Gal4BD-BAZ Fusionsprotein in mit dem pAS2-1/baz transformierten Hefezellen wurde bereits überprüft (Abb.8). Mit einem DmPar-6 spezifischen Antikörper wurde nun auch die Expression des Gal4AD-Par-6 Fusionsprotein bei Verwendung des pAS2-1/par-6 Konstruktes bestätigt (Abb.34).



Kaninchen-?-DmPar-6 Antiserum

Abb. 34: Nachweis der Expression des Gal4BD-PAR-6 Fusionsproteins in der Hefe Von dem Extrakt mit dem leeren Vektor pAS2-1 wurde mehr Protein als in den übrigen Spuren aufgetragen. YE: „Yeastextract“; pAS2-1/par-6: codiert für ein Gal4BD-PAR-6 Fusionsprotein; pAS2-1/baz und pGBT9/baz, die zusammen mit dem leeren Vektor als Negativkontrollen verwendet wurden, codieren beide für ein Gal4BD-BAZ Fusionsprotein; pAS2-1: leerer Vektor

Unter Umkehrung der zuerst getesteten Verhältnisse wurde getestet, ob das mit der Gal4AD fusionierte DmPar-6 an Gal4BD-BAZ oder Gal4BD-PDZ1-3 binden kann (Tab.14).

	pAS2-1/baz	pAS2-1/par-6	pGBT9/PDZ1-3
pACT2/par-6	-	-	-
pACT2/baz	-	-	-

Tab.14: „2-Hybrid“-Interaktionen verschiedener baz u. Dmpar-6 Konstrukte

-: keine Interaktion

Der Test mit dem 2-Hybrid-System zeigte, dass das vollständige DmPar-6 Protein in diesem System unter den getesteten Bedingungen nicht zu einer Dimerisierung führt und keine direkte Bindung an das vollständige Baz-Protein oder an die drei zusammenhängenden PDZ-Domänen stattfindet.

Dies bedeutet jedoch keinesfalls, dass die beiden Proteine nicht aneinander binden, zumal dieses „2-Hybrid“-Ergebnis im Gegensatz zu den Resultaten der GST-„Pull-down“-Experimente von Petronczki et al. stehen.

3.4.3 Test der Interaktion des PDZ-Domänen Proteins DLT mit BAZ

Discs Lost (Dlt) ist ein 871 AS langes Protein mit 4 PDZ-Domänen, welches für die Organisation der kolumnaren, stark polarisierten Form des Blastoderm-Epithels benötigt wird (Bhat et al., 1999). Dlt lokalisiert zusammen mit Crb und Baz an der apikalen ZA (Klebes and Knust, 2000; Kuchinke et al., 1998; Tepass, 1996). Die gemeinsame Lokalisation oberhalb der ZA, die Existenz eines PDZ-Bindemotivs am unmittelbaren C-Terminus von Baz und von mehreren PDZ-Domänen in Dlt deuten daraufhin, dass es möglicherweise eine direkte Interaktion zwischen Baz und Dlt gibt. In der Originalarbeit (Bhat et al., 1999) wurden dem Dlt-Protein nur 800 AS zugeschrieben, daher wurden auch nur diese 800 AS auf die Interaktion hin untersucht. Später wurde die Sequenz berichtigt, wonach sich Dlt aus 871 AS zusammensetzt. Die 4 PDZ-Domänen von Dlt liegen jedoch alle innerhalb des ursprünglich postulierten und hier auch untersuchten Bereiches.

Bei den durchgeführten Experimenten wurde festgestellt, dass ein Fusionsprotein, bestehend aus Dlt und der Gal4BD, auch ohne irgendeinen Interaktionspartner bereits zu einer Reportergenaktivierung führt.

Dies ist bei einem Fusionsprotein aus Dlt und der Gal4AD nicht der Fall, daher konnte dieses zur Untersuchung einer Dlt-Interaktion mit Baz eingesetzt werden. Es ergab sich keine positive Interaktion mit dem vollständigen Baz-Protein und der Gal4BD, auch der Baz C-Terminus, fusioniert an die Gal4BD führte nicht zu einer positiven Interaktion (Daten nicht gezeigt).

3.5 Interaktion von Inscuteable mit anderen Proteinen des Baz-Komplexes

Das Ankyrin-Domänen enthaltende Protein Insc ist ein Bestandteil des apikalen Proteinkomplexes in NB. Baz und Insc können koimmunpräzipitiert werden (Wodarz et al., 1999), binden aber nicht im 2-Hybridsystem aneinander (s.u.). Nachdem einige Bindungspartner von Baz identifiziert worden waren, schien es naheliegend zu testen, ob die Komplexbildung von Baz mit Insc möglicherweise über einen dieser Interaktionspartner vermittelt wird.

Ein Gal4BD-INSC Konstrukt wurde auf eine Interaktion mit verschiedenen Gal4AD Konstrukten hin getestet (Tab.15). Nicht in der Tabelle aufgeführt ist die ebenfalls getestete Interaktion mit pACT2/*insc* und pAS2-1/*baz*. Hierbei wurde keine direkte Interaktion zwischen Insc und Baz festgestellt.

	pACT2/ <i>baz</i>	pACT2/ PDZ1-3	pACT2/ <i>par-6</i>	pACT2/ <i>dlt</i>	pACT2/ aPKCfull
pGBT9/ <i>insc</i>	-	-	-	-	+

Tab.15: Interaktion von Insc mit Proteinen des BAZ-Komplexes

In jedem Vektor ist der vollständige Leseraster an die jeweilige GAL4 Domäne fusioniert, nur in pACT2/PDZ1-3 wird ein Teil eines Leserasters verwendet. -: keine Interaktion +: Interaktion

Insc zeigt im „2-Hybrid“-System eine sehr starke Interaktion mit der DaPKC. Dieses Ergebnis liess sich mehrfach einwandfrei reproduzieren. Die anhand der Geschwindigkeit der Blaufärbung im X-Gal Test eingeschätzte Stärke der beobachteten Interaktion ist eine der grössten, die bei allen in dieser Arbeit durchgeführten Test überhaupt beobachtet wurde.

3.6. Verbesserung des 2-Hybridsystems

Ein grosses Problem bei der Anwendung des Matchmaker-2-Hybridssystem von *Clontech*, Heidelberg mit dem pGBT9-Köderplasmid und dem pACT2-Beuteplasmid ist die Isolierung des auf pACT2 basierenden Plasmides aus einer positiven Hefekolonie. Auch wenn bei der Isolation von Plasmid-DNA aus einer üN-Kultur der Hefe der Selektionsdruck in der Hefekultur nur hinsichtlich des *leu2*-Gens und damit auf dem pACT2-Plasmid besteht, so wird in der Regel nur das pGBT9-Köderplasmid isoliert.

Bei der Suche nach Alternativen kann man sich u.a. die Tatsache zu Nutze machen, dass viele der Gene von *S.cerevisiae* redundant sind und durch fremde Sequenzen ersetzt werden können. Es lag daher nahe, eine solche redundante codierende Sequenz der Hefe durch die Sequenz für ein Fusionsprotein mit der GAL4BD und den 3 PDZ-Domänen zu ersetzen. Die Integration dieser Sequenz in das Genom bietet verschiedene Vorteile. Zum einen sollte bei einer späteren Transformation mit einer Plasmidgenbank und der anschliessenden Isolierung von Plasmid-DNA nur das aus der Genbank stammende Plasmid erhalten werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Haltung des transgenen Stammes vereinfacht wird, da die Notwendigkeit eines selektiven Mediums entfällt. Und schliesslich muss man die nach der Transformation mit der Genbank erhaltenen Transformanden nur noch der Selektion einer AS unterwerfen, wodurch ein besseres Wachstum der Transformanden gewährleistet ist.

3.5.1 Der offene Leseraster *YCR105w* von *S.cerevisiae*

An einen geeigneten Insertionsort im Genom von *S.cerevisiae* sind bestimmte Anforderungen zu stellen, so sollte z.B. gewährleistet sein, dass die integrierte DNA bei einem Wachstum der Hefe auf Minimalmedium stark transkribiert wird. Ausserdem sollte die Hefe durch die Integration der Fremd-DNA nicht in ihrem Wachstum beeinflusst werden.

Bei einer Disruption des offenen Leserasters *YCR105w* vom Chromosom III der Hefe sind diese Bedingungen erfüllt. Während viele Hefegene unter Mangelmediumsbedingungen schwächer oder sogar überhaupt nicht mehr exprimiert werden, wird *YCR105w* hier besonders stark exprimiert (Andreas Ramrath, Diplomarbeit). Es handelt sich bei *YCR105w* um kein essentielles Gen für das Wachstum auf Mangelmedium, da bei einer Disruption des Leserasters keinerlei Wachstumsdefekte beobachtet wurden (persönliche Mitteilung Georg Stein und diese Arbeit). Ein Ersatz der codierenden Sequenz von *YCR105w* durch die codierende Sequenz der Gal4BD zusammen mit den 3 PDZ-Domänen könnte zur Expression des „bait“-Proteins unter der Kontrolle der *YCR105w* Promoterregion führen.

3.5.2 Disruption von *YCR105w* durch Gal4BD/PDZ1-3/TRP

Zur Disruption von *YCR105w* wurde eine Disruptionskassette hergestellt, die in den Hefestamm Y190 transformiert wurde und dort durch Rekombination *YCR105w* durch die Sequenzen für das Gal4BD/PDZ1-3 und das *TRP*-Gen ersetzt (McElver und Weber, 1992; Baudin et al., 1993; Wach et al., 1994). Die Kassette besteht aus der codierenden Sequenz für Gal4BD/PDZ1-3 und das *TRP*-Gen, flankiert von jeweils 25bp, die homolog sind zu den ersten 25bp vor- bzw. hinter dem ORF *YCR105w*. Zur Erstellung der Kassette wurde das pGBT9/PDZ1-3 Konstrukt in einer PCR-Reaktion mit den Primern *YCR105for* und *YCR105rev* als Matrize eingesetzt. Um Verunreinigungen mit dem als Matrize eingesetzten Plasmid zu vermeiden, wurde das PCR-Produkt in einem Gel aufgetrennt, die entsprechende Bande ausgeschnitten und die DNA eluiert. Das so gereinigte PCR-Produkt wurde dann für eine Transformation des Hefestammes Y190 benutzt. Der resultierende transgene Hefestamm wurde im weiteren mit *YCR105w::Gal4BD/PDZ1-3* benannt.

Die Insertion der Disruptionskassette (Abb.35) anstelle des ursprünglichen Leserasters wurde durch mehrere Untersuchungen des transformierten Stammes bestätigt. Zunächst wurde der Bereich, der für die 3 PDZ-Domänen codiert, mit den Primern PDZ2010/PDZ3350 aus dem transformierten Hefestamm heraus amplifiziert. Weiterhin konnte mit *YCR105control*, einem Primer, der in dem Hefegenom vor dem ORF *YCR105w* liegt, und dem PDZ3350-Primer ein

spezifisches Produkt mit der erwarteten Grösse erhalten. Dieses Produkt wurde sequenziert und hierdurch die Insertion exakt an der erwarteten Stelle im Hefegenom bestätigt.

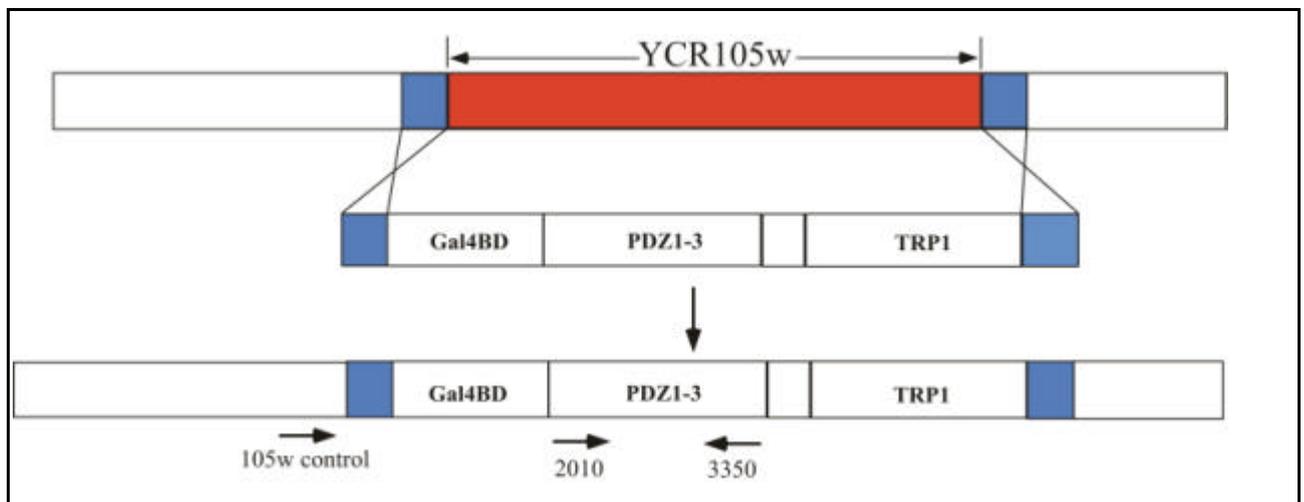


Abb. 34: Ersatz des Hefe-ORFs *YCR105w* durch eine Disruptionscassette

Durch die Rekombination der homologen Bereiche auf der Cassette und dem Hefegenom, in blau dargestellt, findet ein Austausch der dazwischen liegenden Sequenzen statt. Die kleinen Pfeile zeigen die Lokalisation der Primer, die zum Nachweis der Disruption von *YCR105w* verwendet wurden.

3.5.3 Funktionalität des transgenen *YCR105w::Gal4BD/PDZ1-3* Stammes

In dem transgenen Stamm sollte das Fusionsprotein aus Gal4BD und den 3 PDZ-Domänen von Baz gebildet werden und bei einer Transformation mit einem Interaktionspartner für diese PDZ-Domänen diese Interaktion durch die Expression der Reportergene anzeigen. Nach Transformation mit dem Interaktions-Plasmid BIC4 war der transformierte *YCR105w::Gal4BD/PDZ1-3* Stamm in der Lage, auf Histidin freiem Medium in der Gegenwart von 50mM 3-AT zu wachsen und β -Galactosidase zu bilden. Ein quantitativer Vergleich der β -Galactosidase-Aktivität zwischen dem neuen Stamm und dem mit den jeweiligen Plasmiden transformierten Y190 erfolgte nicht.

Bei der Isolation des auf pACT2 basierenden BIC4 Plasmides wurde ausschliesslich dieses erhalten.

Die Etablierung dieses transgenen Stammes erfolgte erst ganz am Ende des experimentellen Teiles dieser Arbeit, zu spät, um ihn für den „Screen“ noch einsetzen zu können.

IV. Diskussion

In dieser Arbeit wurden mehrere neue Komponenten identifiziert, die an das Multi-PDZ-Domänen Protein Bazooka binden können. Hierzu gehören eine Phosphatase (PTEN), eine atypische PKC Form, ein LIM-Domänen-Protein(CG18253), ein TIR-Protein (TOLL-7), ein Protein mit Homologie zu dem Hefeprotein VSM1 und die *Drosophila* Form von PAR-6.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Informationen über die Lokalisation einiger dieser Proteine u/o der entsprechenden mRNA sowie der mögliche funktionelle Zusammenhang der im „2-Hybrid“-System festgestellten direkten Interaktion mit BAZ sollen hier interpretiert werden.

4.1 Bazooka, Toll-7 und das Nervensystem von *D. melanogaster*

Ein spezifisch nur an die erste der drei PDZ-Domänen von Bazooka bindendes Protein ist Toll-7. Dieses bindet, wie bei den meisten beschriebenen PDZ-Domänen Interaktionen (Bezprozvanny and Maximov, 2001; Songyang et al., 1997), mit seinem C-Terminus an Baz. Dieser C-Terminus (-YLV) entspricht der Konsensussequenz für die Bindung an PDZ-Domänen (Bezprozvanny und Maximov, 2001).

Während der gesamten Embryogenese konnte keinerlei Kolokalisation von Baz und Toll-7 festgestellt werden. Zumindest in der Embryogenese scheint die Baz-Toll-7 Interaktion keine funktionelle Bedeutung zu besitzen. Möglicherweise besitzt die im „2-Hybrid“-System gefundene Interaktion jedoch eine *in vivo* Funktion in der Larve. In den optischen Loben der L3-Larve von *Drosophila melanogaster* konnte eine Kolokalisation der beiden Proteine nachgewiesen werden (Andreas Wodarz, persönliche Mitteilung).

Im Zusammenhang hiermit erscheint es auffallend, dass es eine P-Element-Insertionslinie gibt (I(lacZ)H217), die im homozygoten Zustand während der Embryonalentwicklung keinerlei Defekte erkennen lässt, solche jedoch in temperaturabhängiger Weise bei der Organisation der optischen Loben der L3-Larve auftreten. Bei diesem Fliegenstamm verlaufen die Nervenfaserbündel bei der restriktiven Temperatur in ektopischen Regionen, die Wegfindung bei der Axonprojektion scheint hier gestört (Liu und Restifo, 1998). Gerade in dieser Region, während eines Entwicklungsstadiums, in dem eine Kolokalisation von Baz/Toll-7 nachgewiesen werden kann, treten erkennbare Effekte auf.

Die Region 56F1, in der das *toll-7* Gen liegt, zeichnet sich durch eine geringe Zahl an Genloci und das Fehlen von in dieser Region kartierenden Deletionen aus. Es konnten zwei 2 P-Elementinsertionslinien identifiziert werden, I(2)k16210 und I(lacZ)H217, der jeweilige

Insertionsort dieser P-Elemente wurde mit 60kB vor bzw. 15kB hinter dem Gen liegend ermittelt (diese Arbeit). Bei beiden Linien ist Toll-7 durch Antikörperfärbungen weiterhin nachweisbar und nur eine der Linien (I(2)k16210) zeigt eine homozygote Letalität. Letztere ist eine EP-Linie, bei der die Expression des lacZ Reportergens nahezu exakt mit der von Toll-7 übereinstimmt. Das P-Element liegt jedoch mitten in dem einzigen 5SrRNA Cluster von *D.melanogaster*, die Letalität könnte daher auch durch diesen Insertionsort verursacht werden (Spradling et al., 1999). Eine Aussage über die Bedeutung von *toll-7* für das Überleben des Embryos, der Larve u/o der adulten Fliege ist daher noch nicht möglich. Eine Deletion des *toll-7* Genlocus wird derzeit nach der Methode der "male recombination" Technik (Preston und Engels, 1996) durch A.Wodarz durchgeführt.

Die Lokalisation des Toll-7 Proteins im Embryo wurde u.a. in einer vergleichenden Untersuchung analysiert, bei der sowohl eine Immunofärbung von Toll-7, als auch des im gesamten ZNS und PNS exprimierten Proteins Futsch, durchgeführt wurde (Sadler und Shakes, 2000). Toll-7 und Futsch zeigen bei Koimmunofärbungen beide eine Lokalisation in der posterioren Wurzel des ISN im ZNS-Cortex, nach dem Verlassen des Cortex folgen beide Färbungen dem Verlauf des ISN bis zu den Abzweigungen des Pentascolopodialorgans und der Haar-Sensillen. Möglicherweise werden also sowohl Futsch als auch Toll-7 in den gleichen Neuronen exprimiert. Allerdings zeigt die Koimmunofärbung keinen vollkommenen Überlapp der Färbungen, vielmehr scheint die Toll-7-Färbung mit und um die Futsch-Färbung herumzulaufen.

Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass Toll-7 in der den ISN umgebenden Gliazellhülle exprimiert wird. Allerdings werden der ISN und der SN von einer gemeinsamen Hülle umgeben, bevor sie den Cortex des ventralen Nervenstranges verlassen. Innerhalb dieses Cortex wird Toll-7 fast ausschliesslich in der posterioren Wurzel des ISN exprimiert. Wahrscheinlich gehören Futsch und Toll-7 jeweils gemeinsam zu bestimmten Neuronen und der fehlende 100%ige Überlapp bei den durchgeführten Immunfärbungen resultiert aus der jeweiligen zellulären Lokalisation der beiden Proteine. Futsch ist ein intrazelluläres Mikrotubuli-bindendes Protein (Hummel et al., 2000), Toll-7 weist eine Transmembrandomäne auf und ist möglicherweise ein Bestandteil der Membran von bestimmten Neuronen (diese Arbeit). Aufschluss über die Lokalisation von Toll-7 in einer Zelle könnten bspw. elektronenmikroskopische Untersuchungen ergeben.

Wird Toll-7 auch im peripheren Nervensystem exprimiert? Verfolgt man die Toll-7 Färbung in den afferenten Nervenbahnen des ISN, die zu dem dorsalen Chordotonalorgan (Pentasclopidialorgan) führen, so zeigt sich, dass Toll-7 in den Scolopidia selber nicht

exprimiert ist. Vielmehr erfährt die durch Toll-7 markierte Bahn im Bereich des Pentascolopodialorganes einen Knick und endet in einem verbreiteten dicken Punkt. Das gleiche wird für eine andere Abzweigung des ISN beobachtet. Eine Erklärung, für welche Struktur dieser Punkt stehen könnte, konnte auch nach Rücksprache mit Christian Klämbt (Institut für Neurobiologie, Münster) nicht gefunden werden.

Das *toll-7* Gen weist eine sehr hohe Homologie zu *18-wheeler* (*18w*) auf. Letzteres wurde eher zufällig bei der Suche nach vollständigen cDNAs eines anderen Gens gefunden (Eldon et al., 1994a). Die beiden Gene liegen lediglich 280kbp voneinander entfernt und sind aufgrund der Homologie und des geringen physikalischen Abstandes mit grosser Wahrscheinlichkeit das Ergebnis einer Genduplikation.

Das Expressionsmuster von *toll-7* und *18-w* ist jedoch sehr verschieden. Während die *18w*-mRNA bereits kurz vor der Bildung des zellulären Blastoderms auftritt (Eldon et al., 1994b), und dann ein Segmentpolaritätsmuster ausbildet, tritt die *toll-7* mRNA erst ab dem zellulären Blastodermstadium auf. Sie findet sich hier vor allem im zentralen und posterioren Bereich des Embryos (diese Arbeit). Der erste bei *18w* erfassbare Expressionsstreifen wird dagegen anterior gebildet (Eldon et al., 1994b). Während die räumliche Verteilung von *toll-7* mRNA und Protein gut übereinstimmt, besteht jedoch eine zeitliche Differenz zwischen dem frühen Nachweis der mRNA ab Stadium5 und dem des Proteins ab Stadium12. Möglicherweise wird das Protein trotz der früh vorhandenen mRNA erst ab dem Stadium 12 gebildet (translationale Kontrolle der Toll-7 Proteinexpression) oder es werden anfangs nur geringe Proteinmengen produziert, die bei dem für die Detektion benutzten Antiserum unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Eine weitere Möglichkeit ist eine zunächst diffuse Verteilung und ab Stadium12 stattfindende Membranlokalisation von Toll-7.

Zusammen mit Toll, dem IL-1R u.a. bilden Toll-7 und 18w die TIR-Familie, die sich vor allem durch die namensgebende konservierte zytoplasmatische Domäne auszeichnet (Aderem und Ulevitch, 2000; Meyers et al., 1999; Whitham et al., 1994). Zusätzlich besitzen diese Proteine jeweils eine Transmembrandomäne und zahlreichen LRR („Leucin-rich-repeats“) im extrazellulären Bereich. Eine ganze Reihe von TIR-Proteinen weist bei Insekten, Säugern und Pflanzen eine Funktion bei der Immunabwehr auf (Van der Biezen and Jones, 1998; Übersichtsartikel: O'Neill, 2000), es besteht daher eine generelle Tendenz, Proteinen mit der TIR-Domäne eine solche Funktion zuzuordnen, so wurde z.B. für 18w eine Funktion bei der Regulation von antibakteriellen Genen in *Drosophila melanogaster* beschrieben (Williams et

al., 1997). Die hierzu durchgeführten Experimente konnten jedoch nicht reproduziert werden (Tauszig et al., 2000).

Die Toll-artigen Rezeptoren und der IL-1R weisen ähnliche Signalwege auf. Beide bewirken eine Aktivierung von Rel Transkriptionsfaktoren über ein Adapterprotein und eine Proteinkinase (Mitcham et al., 1996). Die *Drosophila* Proteinkinase (Pelle) ist ein Homolog der Vertebraten Kinase IRAK (Il1-R „associated kinase“) (Übersichtsartikel: Means et al., 2000). Während die Aktivierung des Il1-R und verschiedener TIR-Proteine bei Vertebraten schliesslich zur Freisetzung des NF κ B von I κ B führt (Übersichtsartikel: O'Neill und Greene, 1998), werden bei *Drosophila* die NF κ B-artigen Protein Dorsal und Dif („Dorsal-like immunity factor“) vom I κ B-artigen Protein Cactus freigesetzt (Geisler et al., 1992; Kidd, 1992).

Für Erkenntnisse über die Funktion von *toll-7* bei *D.melanogaster* wird die Untersuchung des mutanten Phänotyp zunächst im Vordergrund stehen. Auch die Analyse der subzellulären Lokalisation sowie eine weitergehende Untersuchung der Baz-Toll-7 Lokalisation in Larven und adulten Fliegen werden einerseits zur Aufklärung der Funktion von Toll-7 und andererseits zur Bedeutung der Baz-Toll-7 Interaktion beitragen. Schliesslich kann auch eine mögliche Analogie zu anderen TIR-Signalkaskaden geprüft werden.

4.2 Zusammenhang zwischen *baz* und *pten*

Bei *pten* handelt es sich um ein zuerst beim Menschen entdecktes Tumor-Suppressor Gen, welches bei vielen Krebsarten eine Rolle spielt, besonders bei Gliazell- und Prostatatumoren (Cairns et al., 1997; Li et al., 1997; Rasheed et al., 1997; Tashiro et al., 1997). Keimbahnmutationen von *pten* sind für mindestens drei verschiedene autosomal-dominante Krebs syndrome verantwortlich, dem Cowden-, Bannayan-Zonana- und dem Lhermitte-Duclos-Syndrom. Charakteristisches Merkmal ist hierbei das Auftreten zunächst gutartiger Tumore, sogenannte Hamartome, bei denen es sich um örtlich begrenzte Gewebemissbildungen handelt, die durch das Überwachstum von reifen Zellen und Geweben entstehen, die auch normalerweise in dem betroffenen Gebiet vorkommen (Liaw et al., 1997; Marsh et al., 1998; Nelen et al., 1997). Diese Hamartome können jedoch sehr schnell zu malignen Tumoren entarten.

Pten ist sowohl eine Protein- als auch eine Lipidphosphatase. Als Proteinsubstrat dient die FAK ("focal adhesion kinase"), deren Dephosphorylierung das Wachstum und die Migration

von Zellen und die Ausbildung fokaler Adhäsionen inhibiert (Tamura et al., 1999). Als Lipidsubstrat wurde Phosphatidyl-Inositol,3,4,5-trisphosphat (PIP3) identifiziert (Maehama und Dixon, 1999). Hierbei handelt es sich um ein Membranlipid, an das Proteine mit einer PH (Pleckstrin-, „Homology“-) Domäne binden können und so zur Membran hin lokalisiert werden. Pten dephosphoryliert jedoch auch Inositolphosphate an der 3'-Position, wenn kein Phosphatidylrest gebunden ist (Caffrey et al., 2001).

Die Proteinphosphatasefunktion von Pten wurde zwar zuerst beschrieben, die Tumorsuppressorfunktion scheint jedoch fast ausschliesslich auf der Lipiddephosphorylierung durch Pten zu beruhen, welche daher in vielen Studien charakterisiert wurde (Übersichtsartikel: Bonneau und Longy, 2000; Rasheed et al., 1997; Simpson und Parsons, 2001).

Die Pten-Funktion wirkt als ein direkter Antagonist zur Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K). Der Prototyp einer PI3K ist an eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase gekoppelt und besteht aus einer regulatorischen 85kDa und einer katalytischen 110kDa Untereinheit, wobei die kleinere mehrere SH2-Domänen aufweist (Hiles et al., 1992; Otsu et al., 1991). Eine Autophosphorylierung der Rezeptor-Kinase führt entweder zu einer direkten, oder über ein Adapterprotein vermittelte, Bindung der PI3K an die phosphorylierten Tyrosinreste des Rezeptors. Das nach Aktivierung der PI3K durch Phosphorylierung von Phosphatidyl-Inositol-4,5-bisphosphat (PIP2) gebildete PIP3 führt zur Membranlokalisierung der AKT/PKB-Kinase. Bei AKT/PKB handelt es sich um das zelluläre Homolog von ν -AKT aus dem AKT8 Onkovirus (Bellacosa et al., 1991; Staal, 1987). Die Bindung an das Membranphospholipid PIP3 erfolgt über die PH-Domäne von AKT/PKB, die hierdurch bewirkte Lokalisierung zur Membran hin ermöglicht die Aktivierung von AKT/PKB (Übersichtsartikel: Coffey et al., 1998). AKT/PKB wird in Säugern durch „PI3K-Dependent-Kinase“ (PDK1), in der Fliege wahrscheinlich durch das sequentielle und funktionelle Homolog von PDK1, DSTPK61, phosphoryliert (Alessi et al., 1997; Cho et al., 2001). Auch bei PDK1 handelt es sich um ein PH-Domänen Protein, welches durch die Bindung an PIP3 zur Membran hin lokalisiert wird.

Wenn auch bei *Drosophila melanogaster* die Wirkung von PTEN in einer Hemmung der AKT/PKB-Kinase Aktivierung durch PDK1 besteht, so sollte man erwarten, dass sich eine *pten*-Mutante durch eine bedingte Hemmung von PDK1, beispielsweise über einen Hitzeschockpromoter gesteuerte Expression einer dominant negativen PDK1-Form zumindest teilweise retten lassen. Dies würde ein Hinweis auf eine auch bei *Drosophila* bestehende Interaktion zwischen Pten, PDK1 und AKT/PKB.

Pten bewirkt durch die Dephosphorylierung von PIP3 zu PIP2 eine Hemmung der AKT/PKB-Aktivierung und eine Zunahme an PIP2. PIP2 kann als ein sekundärer Botenstoff dienen, der u.a. in die Modulation der Funktion regulatorischer Proteine des Zytoskelettes involviert ist (Chong et al., 1994; Janmey, 1994; Vemuri und Singh, 2001). PIP2 entsteht auch durch die Wirkung einer Phosphatidylinositol-4-phosphat-5-Kinase (PI4P5-Kinase), welche bei *Drosophila* durch das Produkt des Gens *skittles* (*sktl*) gebildet wird (Hassan et al., 1998; Knirr et al., 1997). Die Expression von *sktl* ist nahezu identisch zu der von *insc*, da *sktl* innerhalb des ersten Introns des *insc* Gens liegt und beide Gene anscheinend auf die gleiche Weise reguliert werden. Die Signifikanz dieser gemeinsamen Regulation zweier Gene, von denen das Produkt des einen (*Insc*) wahrscheinlich einen indirekten Bindungspartner von Baz darstellt und das des anderen (*Sktl*) ein Molekül erzeugt (PIP2), welches auch durch die Funktion eines weiteren Bindungspartners (*Pten*) von Baz erzeugt wird, wurde bisher noch nicht untersucht. Die Bildung von PIP2 durch *Pten* stellt möglicherweise eine eigenständige Funktion dar. Wenn das der Fall ist, so sollte sich der *pten* bzw. *skittles* Phänotyp durch eine Überexpression des jeweiligen anderen PIP2-Produzenten zumindest teilweise retten lassen.

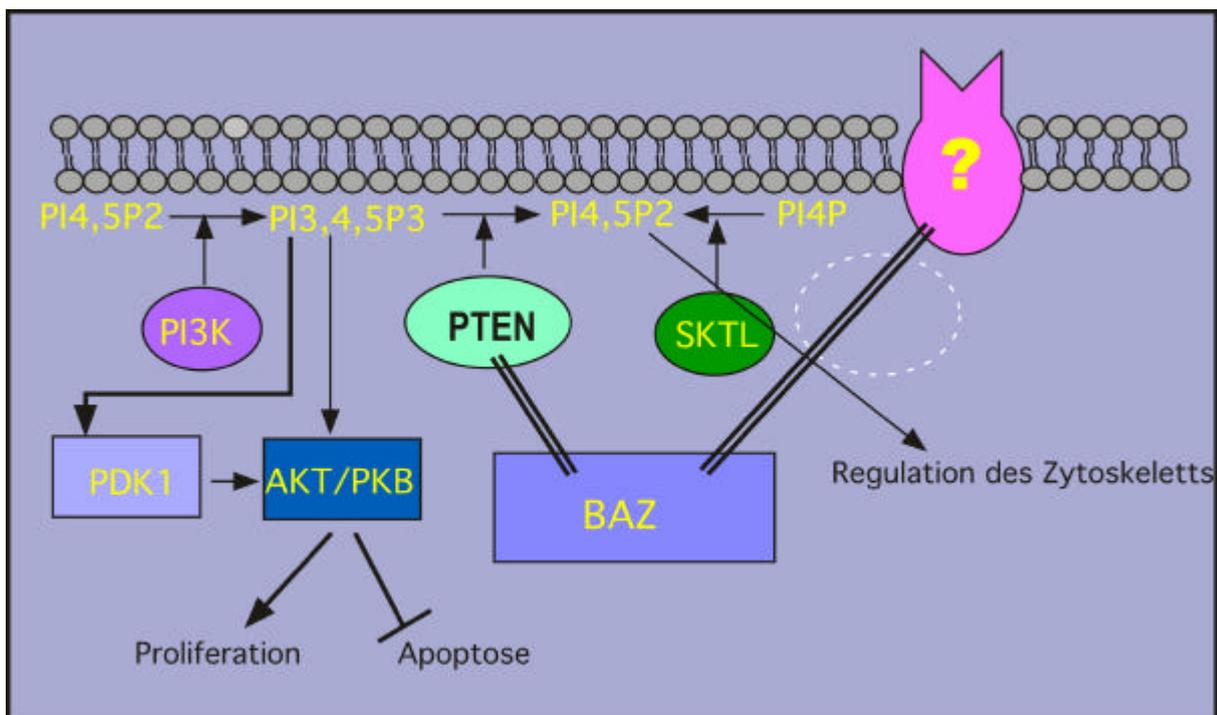


Abb.35 Der Antagonismus zwischen PI3K und PTEN

Die PI3K bildet PI3,4,5P3 (PIP3), die PH-Domänenproteine PDK1 und AKT/PKB können so zur Membran hin gelangen. Dem wirkt das durch BAZ zur Membran hin lokalisierte PTEN entgegen. Das durch PTEN gebildete PI4,5P2 entsteht auch unter Einwirkung von SKITTLES (SKTL). Ein BAZ zur Membran hin lokalisierender Faktor ist noch unbekannt (?). Möglich ist auch eine indirekte Bindung an ein Membranprotein oder an Membranlipide über einen Adapter (gestrichelt dargestellt).

Welche Wirkungen besitzt AKT/PKB und welche Bedeutung hat die Inhibition von AKT/PKB durch Pten?

Es wurden eine ganze Reihe von AKT/PKB-Substraten identifiziert, von denen wegen der Wirkung von AKT/PKB auf Zellwachstum und –proliferation, sowie auf die Apoptose, einige besonders interessant erscheinen. AKT/PKB bewirkt eine Deregulation des Zellzyklus durch die Inaktivierung des Transkriptionsfaktor AFX (atypical fibroxanthoma). Dieser führt sonst zur Bildung eines Inhibitors für die Expression einer CDK ("Cyclin-dependent-kinase") (Medema et al., 2000).

Auch durch die Inaktivierung der Glykogen-Synthase-Kinase3 (GSK3) nimmt AKT/PKB Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus (Alt et al., 2000; Diehl et al., 1998). GSK3 bewirkt sonst den Abbau von Cyclin D1 abgebaut (Diehl et al., 1998).

AKT/PKB wirkt hemmend auf die Einleitung der Apoptose, indem es das proapoptotische Protein Bad phosphoryliert. Dieses wird so an Protein 14-3-3 gebunden und an der Assoziation mit Bcl2 in der Mitochondrienmembran gehindert. Die Bindung von Bad an Bcl2 führt zur Freisetzung von Cytochrom C und so letztendlich zur Apoptose (Datta et al., 1997).

Ein weiteres Ziel von AKT/PKB ist mTOR ("mammalian target of rapamycin") (Nave et al., 1999; Scott et al., 1998). Dies ist insofern interessant, als eines der im 2-Hybridsystem als Bindungspartner für BAZ gefundenen Proteine ein Homolog zu dem FK506 bindenden Protein (FKBP) aus der Hefe ist (W. von Stein, persönliche Mitteilung). Rapamycin bindet ebenso wie FK506 an dieses FKBP. Der Komplex aus Rapamycin und FKBP ist zusammen in der Lage, die Funktion der Protein- und Lipidkinase TOR zu inhibieren (Zhang et al., 2000).

Der durch AKT/PKB ermöglichte Einfluss auf den Zellzyklus könnte eine Rolle bei dem Prozess der asymmetrischen NB-Teilung spielen. Hierbei ist eine Koordination zwischen dem Zellzyklus, der Ausrichtung der Teilungsspindel und der asymmetrischen Lokalisation verschiedener Komponenten, die z.T. noch während der Mitose relokalisiert werden, von grosser Bedeutung (siehe Einleitung). Um diese Prozesse mit dem Zellzyklus zu koordinieren, muss ein Einfluss der Zellzyklusmaschinerie und/oder umgekehrt stattfinden.

Mit dem Nachweis der Bindung eines Drosophila Pten-Homologs (DmPten) an Baz ist hier zum ersten Mal ein Bindungspartner für ein *pten*-Genprodukt in einem Modellorganismus beschrieben worden. Diese im „2-Hybrid“-System gefundene direkte Interaktion der C-Terminalen 224 AS von DmPten mit den Baz PDZ-Domänen besitzt höchstwahrscheinlich auch in der Embryonalentwicklung der Fliege eine Bedeutung und stellt nicht nur eine unter den besonderen Bedingungen des „2-Hybrid“-Systems stattfindende Bindung dar. Diese Annahme wird durch zwei Punkte gestützt. Erstens interagiert die Vertebraten Pten-Form, die genau wie das Drosophila Homolog eine C-Terminale Konsensussequenz für eine Bindung an

PDZ-Domänen besitzt (Bezprozvanny und Maximov, 2001; Songyang et al., 1997), ebenfalls mit einem PDZ-Domänen Protein (Li et al., 1997; Wu et al., 2000), eine Pten-PDZ-Domänen-Protein Interaktion existiert also in verschiedenen Organismen; zweitens führt eine Überexpression von DmPten4 dazu, dass dieses Protein zur apikalen Membran hin rekrutiert wird und dort mit Baz kolokalisiert ist (diese Arbeit).

Bei *D.melanogaster* existieren 4 mögliche Splicevarianten von *pten* (Smith et al., 1999; diese Arbeit). Bei der Pten2-Form, die sich nur durch das Fehlen von 3 AS von Pten4 unterscheidet, ist allerdings nicht ganz klar, wie diese Form entstehen kann. Entsprechende Splicesignale, zur Entfernung der für diese AS codierenden 9 Nukleotide, sind in der BDGP-Sequenz nicht vorhanden. Für die Bindung von Pten4 an die Baz PDZ-Domänen sind die C-terminalen AS – TYL essentiell. Durch die Deletion dieser dem PDZ-Bindemotiv entsprechenden 3 AS (T an der –2 Position, eine hydrophobe AS am unmittelbaren Ende) ist keine „2-Hybrid“-Interaktion mit den PDZ-Domänen mehr nachweisbar (diese Arbeit). Auch die Pten3-Form, deren C-Terminus 5 AS kürzer ist und mit –ESE endet, kann im „2-Hybrid“-System nicht an die Baz PDZ-Domänen binden. Baz bindet hiernach also ganz spezifisch nur an die Pten4 Form.

Zwischen der menschlichen und der *Drosophila*-Form von Pten gibt es verschiedene auffallende Gemeinsamkeiten. Das humane Pten kann das *Drosophila* Pten funktionell ersetzen, beide Formen führen bei einer Überexpression im Auge von *D.melanogaster* zu einer Reduktion oder sogar zum Verschwinden des Auges (Huang et al., 1999).

Die Bindung des Pten4 C-Terminus an die zweite und dritte PDZ-Domäne von Baz ist stärker als an die erste. Ein Homologievergleich der PDZ-Domänen der *Drosophila* und humanen Form von Baz (hAsip) zeigt, dass jeweils die zweite und die dritte PDZ-Domäne eine viel höhere Identität zueinander aufweisen, als dies bei der ersten der Fall ist, 58% und 63% gegenüber nur 31%. Die Ähnlichkeit zu der PDZ-Domäne von MAGI-2, an das die humane Pten-Form bindet, liegt für alle PDZ-Domänen unter 31%.

Die artübergreifende Funktionalität von *pten* und die Ähnlichkeit der Pten bindenden PDZ-Domänen von Baz ist ein schwacher Hinweis auf eine mögliche analoge Interaktion zwischen hAsip und dem humanem Pten. Dieses muss untersucht werden, in dem Modellorganismus *Drosophila melanogaster* besteht jetzt die Möglichkeit, die funktionelle Bedeutung der Bindung von Pten an Baz zu analysieren und die Ergebnisse u.U. auf das Vertebratensystem zu übertragen.

Einige Punkte sprechen dafür, dass Baz an der apikalen Membran für die Lokalisation von Pten verantwortlich ist. Das Baz Protein befindet sich schon während der Oogenese an der

Grenze der Eizelle zu den Nährzellen, wo es bereits mit der aPKC kolokalisierend ist (Cox et al., 2001). Im Embryo wird Baz bereits zu Beginn der Gastrulation an den apikalen Zyto cortex der entstehenden Epithelien von Ektoderm, Vorder-, Mittel- u. Hinterdarm sowie der Malpighischen Gefäße lokalisiert (Kuchinke et al., 1998). Für Baz ist damit eine bereits sehr frühe apikale Lokalisation nachgewiesen, wo es zusammen mit DaPKC für die Lokalisation anderer Proteine verantwortlich ist. Eine lokalisierende Funktion wird man eher einem Protein mit mehreren Protein-Proteininteraktionsdomänen zuschreiben, als einem Protein mit enzymatischer Funktion, wie es Pten4 von *D.melanogaster* wahrscheinlich darstellt.

Zudem kann Baz in WT-Embryonen ohne weiteres in NB und am SAC apikal nachgewiesen werden, während dies bei Pten nur im Überexpressionshintergrund möglich war. Es ist zwar möglich, dass dies durch die Qualität des DmPten-Antikörpers bedingt ist, allerdings ist zumindest die Spezifität dieses Antikörpers und seine Anwendbarkeit in Immunofärbungen nachgewiesen. Hiernach scheint es, als ob Pten in NB und Epithel von WT-Embryonen entweder nicht exprimiert wird, im Zytoplasma diffus verteilt ist oder in mit den verwendeten Antikörpern nicht detektierbaren Mengen vorkommt.

Möglicherweise kann das membranlokalisierte Baz als ein Verankerungspunkt für DmPten dienen. Dieses würde so dorthin rekrutiert, wo das Substrat PIP3 für die Lipidphosphatasefunktion von DmPten zur Verfügung steht. DmPten könnte also über seine Lokalisation reguliert sein.

Ob Baz durch Pten zur Membran hin lokalisiert wird oder genau der umgekehrte Fall gilt, muss jedoch noch gezeigt werden. Zur Beantwortung dieser Frage wird man untersuchen müssen, ob durch die Abwesenheit von Pten die Baz Lokalisation betroffen ist et vice versa. Beide Faktoren besitzen eine starke maternale Komponente (Kuchinke et al., 1998; diese Arbeit), zudem muss Pten überexprimiert werden, um eine Membranlokalisation mit den vorhandenen Antikörpern nachweisen zu können. Zusammen mit den sehr frühen starken Effekten in *pten* Keimbahnklonen (diese Arbeit) wird hierdurch die Analyse der Lokalisation des einen Faktors in Abhängigkeit vom anderen erschwert.

Diese Schwierigkeiten lassen sich aber u.U. umgehen, indem beispielsweise die PTEN Funktion spezifisch erst ab oder in einem bestimmten Entwicklungsstadium ausgeschaltet wird. Hierzu bieten sich mehrere Möglichkeiten an: 1. die Expression einer wildtypischen *pten*-Kopie in *pten*^{DJ189}-Keimbahnklonen, wobei die WT-Kopie unter der Kontrolle der regulatorischen Elemente eines Gens steht, welches erst ab einem bestimmten Zeitpunkt

während der Embryogenese nicht mehr exprimiert wird, wie z.B. *bicoid* (Berleth et al., 1988; Frigerio et al., 1986); 2. die Insertion eines Moduls, dessen induzierbare Expression zur Bildung einer doppelsträngigen RNA ab dem Induktionszeitpunkt und damit zu einem RNAi-Effekt führen würde (Kalidas und Smith, 2002).

Mit der ersten Methode könnten Keimbahnklone erzeugt werden, die in der Oocyte und bis zum zellulären Blastodermstadium *pten*-mRNA erzeugen. Schwierigkeiten bei dieser Methode könnten durch die Überexpression von *pten* auftretende Effekte sein.

Welche Konsequenzen besitzen Mutationen in *bazooka* auf DmPten Effekte?

Bei einer von Baz abhängigen Lokalisation und dadurch erfolgenden Regulation von DmPten wird man in Baz Mutanten, bei denen spezifisch nur die Bindung von Pten an Baz gestört ist, einen *pten*⁻ Phänotyp erwarten. Da an Baz noch verschiedene andere Proteine binden, wäre es für die unmittelbar auf die Pten-Baz Interaktion abzielende Analyse wünschenswert, Mutanten zu untersuchen, bei denen in erster Linie die Bindung von Pten an BAZ verhindert wird. Hierzu ist zunächst eine Funktionsanalyse der einzelnen PDZ-Domänen von Baz durchzuführen, um dann durch die gezielte Deletion einzelner Baz-Domänen eine mögliche Störung der Pten Lokalisation zu untersuchen.

4.3 Die atypische PKC und DmPAR-6

Zu dem für *C.elegans* beschriebenen, durch das Gerüstprotein PAR-3 am anterioren Zellcortex der Zygote zusammengehaltenen Proteinkomplex gehört eine atypische Proteinkinase C (PKC-3)(Hung und Kemphues, 1999a). Für eine stabile periphere Lokalisation von PAR-3 wird bei *C.elegans* die PKC-3 benötigt (Tabuse et al., 1998) und in *pkc-3*(RNAi) Embryonen und Mutanten von *par-6* ist die normale Lokalisation von PAR-3 gestört (Hung und Kemphues, 1999b).

Auch in Vertebraten existiert eine solche Interaktion, ein GST-Fusionsprotein der humanem PAR-6-Form bindet an in vitro translatierte und rekombinante aPKC[?] (Joberty et al., 2000). Ausserdem können PAR-6 und PKC[?] aus verschiedenen Zelllinien von verschiedenen Organismen koimmunpräzipitiert werden. Die Bindung erfolgt über die jeweiligen N-Termini der beiden Proteine (Qiu et al., 2000).

Die Klonierung der *D.melanogaster* aPKC (DaPKC) und die nachfolgenden Untersuchungen zur Lokalisation und Bindung an Baz und DmPar-6 haben gezeigt, dass auch hier eine aPKC

Teil des PAR3/BAZ Komplexes ist, in dem DmPar-6 und DaPKC direkt aneinander und jeweils auch direkt an Baz binden können (diese Arbeit; Petronczki und Knoblich, 2001; D.Egger, persönliche Mitteilung). Wie ein Sequenzvergleich mit der vom BDGP veröffentlichten Genomsequenz zeigt, handelt es sich bei der in dieser Arbeit beschriebenen DaPKC um die einzige aPKC Isoform von *Drosophila melanogaster*. Die hohe Homologie zur Maus- und *C.elegans*-Form sowie die Bindung an das PAR-3- und Asip-Ortholog Baz zeigt, dass es sich bei *DaPKC*, *PKC?* und der *C.elegans PKC-3* um orthologe Gene handelt.

Während die bei Mäusen untersuchte Bindung der PKC? an Asip an eine im C-Terminus hinter den PDZ-Domänen gelegene Region erfolgt, sind an der Interaktion zwischen DaPKC und Baz spezifisch die beiden letzten PDZ-Domänen von Baz beteiligt (diese Arbeit; Izumi et al., 1998). Möglicherweise beruht die unterschiedliche Bestimmung der aPKC-Bindungsstelle in Asip und Baz auf dem jeweils unterschiedlich gewählten methodischen Ansatz. Während die Bindungsstelle in Asip durch einen "Blot-Overlay-Assay" untersucht wurde (Izumi et al., 1998), fand die Eingrenzung der Bindedomäne in Baz durch „2-Hybrid“-Interaktionen statt. Möglich wäre es auch, dass innerhalb von Baz und Asip zwei Bindedomänen für die Interaktion mit DaPKC bzw. aPKC? existieren, allerdings konnte an den hinter den PDZ-Domänen von Baz gelegenen Teil keine Bindung der DaPKC nachgewiesen werden (diese Arbeit). Die Bindung der aPKC? an die PDZ-Domänen von Asip ist noch nicht getestet worden.

Der Bereich der Maus aPKC?? der an Asip bindet, beinhaltet die Kinase Domäne (Izumi et al., 1998). Eine Analyse der DaPKC Sequenz mit dem SMART-Programm auf der WWW-Seite des europäischen Laboratoriums für Molekularbiologie (EMBL) zeigt, dass die Kinase Domäne der DaPKC den Bereich von AS 264-532 umfasst. Zur Bindung an die Baz PDZ-Domänen sind weder die ersten 539 noch die letzten 81 AS alleine ausreichend (diese Arbeit). Die Baz Bindedomäne könnte also den Bereich um die AS 539 herum beinhalten. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die gesamte Bindedomäne innerhalb der ersten 539 oder letzten 81 AS liegt, das Fehlen des übrigen Proteinanteils aber die Konformation und damit die Bindungseigenschaften von DaPKC beeinflusst.

Bei PAR-6 handelt es sich um ein PDZ Protein, welches in Wurm, Fliege und Maus sehr stark konserviert ist. Besonders konservierte Bereiche sind die PDZ- und, zum N-Terminus des Proteins gelegen, eine CRIB-Domäne, welche eine Bindedomäne für RAC1 und CDC42 darstellt (Burbelo et al., 1995).

Im Mäuse ZNS weisen die entsprechenden Formen von PAR-3 und PAR-6 eine ähnliche zelluläre und subzelluläre Verteilung auf. Hier konnte eine direkte Bindung der beiden Proteine, welche auf einer PDZ-PDZ-Interaktion beruht, gezeigt werden (Lin et al., 2000). In Analogie zu den Bedingungen in *C.elegans* und Mäusen existiert auch bei *Drosophila melanogaster* eine Kolo-kalisation mit und eine direkte Bindung an Baz. Baz weist an seinem unmittelbaren C-Terminus mit den drei Aminosäuren Ser-Lys-Val ein PDZ-Bindemotiv auf (Bezprozvanny und Maximov, 2001; Cowburn, 1997). Die Bindung von Baz an DmPar-6 könnte sowohl über den BAZ C-Terminus als auch wie bei Mäusen durch eine PDZ-PDZ Interaktion erfolgen. Die direkte Bindung von DmPar-6 an das vollständige Baz-Protein bzw. die drei PDZ-Domänen wurde im 2-Hybrid-System untersucht. Dabei wurden zum einen die beiden GAL4BD-Konstrukte (pAS2-1/baz und pGBT9/PDZ1-3) auf eine Interaktion mit einem GAL4AD-Konstrukt (pACT2/par-6) hin untersucht; zum anderen wurde ein Gal4BD-PAR-6- zusammen mit einem GAL4AD-BAZ-Konstrukt eingesetzt. In keinem Fall konnte eine direkte Interaktion zwischen BAZ und DPAR-6 gezeigt werden. Dieses Ergebnis steht jedoch im Gegensatz zu den Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe. Diese zeigten die indirekte Interaktion durch eine Präzipitation von DmPar-6 aus Embryoextrakten unter Verwendung eines Fusionsproteins, bestehend aus dem Maltosebindungsprotein und Baz (MBP-BAZ); die direkte Bindung wurde durch Präzipitation von *in vitro* translatiertem ³⁵S-DmPar-6 mit MBP-BAZ nachgewiesen (Petronczki und Knoblich, 2001).

Die gegensätzlichen Ergebnisse beruhen wahrscheinlich darauf, dass sehr lange Fusionsproteine, die mit dem 2-Hybrid-System getestet werden, oft wesentlich schwächer als nur die jeweils aneinander bindenden Domänen miteinander reagieren, oder sogar überhaupt nicht. Dieser Effekt, dass das gesamte Protein schwächer als nur die Bindungsdomäne im „2-Hybrid“-System reagiert, wurde auch bei der Interaktion der DaPKC mit den PDZ-Domänen von Baz beobachtet. Während die aPKC eine zwar nur sehr schwache, aber doch deutliche Interaktion mit den drei zusammenhängenden oder nur den letzten beiden PDZ-Domänen von BAZ aufweist, kann eine solche Interaktion mit dem vollständigen BAZ Protein im „2-Hybrid“-System nicht nachgewiesen werden.

Die Bindung von Baz an DmPar-6 erfolgt nicht über den Baz C-Terminus, sondern über eine Interaktion einer oder mehrerer der drei Baz PDZ-Domänen mit der von DmPar-6, wie bei einem „2-Hybrid“-Test mit der singulären PDZ-Domäne von DmPar-6 als GAL4AD-Fusionsprotein gezeigt werden konnte (Diane Egger, persönliche Mitteilung).

Die Überexpression von humanem PAR-6 in Affennierenzellen (COS Zellen) verstärkt die Kinaseaktivität der atypischen PKC β (Qiu et al., 2000). Diese Verstärkung ist CDC42

abhängig. RAC1 und CDC42 führen bei konstitutiver Aktivierung zur Zelltransformation, wobei die transformierende Aktivität von RAC1 direkt mit der Bindung an die GTP-Form von CDC42 abhängt, je stärker die Assoziation der beiden Proteine, desto stärker ist auch die transformierende Wirkung. Wird die endogene PKC ζ durch eine dominant negative Form beeinflusst, so wird das Transformationspotential von RAC1-PAR-6 unterdrückt, bei zusätzlicher Überexpression von Wildtyp PKC ζ dagegen verstärkt (Khosravi-Far et al., 1995; Qiu et al., 1997; Qiu et al., 1995).

Die Regulation der PKC ζ Aktivität könnte auf einer Lokalisierungsfunktion von PAR-6 basieren, indem PAR-6-aPKC ζ zum Zellcortex gebracht werden, wo die PKC ζ mit einem Aktivator interagieren kann. Die Bindung von aktiviertem CDC42 oder RAC1 an PAR-6 ist möglicherweise notwendig für die Initiierung oder Aufrechterhaltung dieses Prozesses. Einer der Aktivator Kandidaten ist PDK1, da bei Vertebraten die PDK1 eine *in vivo* Assoziation mit PKC ζ über die katalytischen Domänen aufweist. Für PDK1 spricht auch, dass sowohl die PI3K als auch PDK1 die PKC ζ Aktivität stimulieren können (Belham et al., 1999; Chou et al., 1998; Le Good et al., 1998). PDK1 wird durch die PIP3-Bildung der PI3K zur Membran hin lokalisiert.

Die PI3K spielt bei der Zelltransformation über Ras und Rac1 eine Rolle und an der Membran lokalisierte PKC ζ ist konstitutiv aktiv (Chou et al., 1998; Han et al., 1998; Rodriguez-Viciana et al., 1997).

Wen oder was phosphoryliert DaPKC und was wird durch diese Phosphorylierung erreicht? Die Maus aPKC ζ kann ASIP *in vitro* und *in vivo* an einem bestimmten Serin-Rest phosphorylieren (Y. Nagai-Tamai et al., unveröffentlichte Ergebnisse), wodurch der aPKC-Asip Komplex instabilisiert wird.

Wenn die Kollokalisierung von Baz und DaPKC von dieser Phosphorylierung abhängt, sollte eine dominant negative Form der DaPKC zu einer Störung dieser Lokalisation führen. Solche Untersuchungen mit einer Kinase, deren enzymatische Aktivität durch eine Punktmutation in der ATP-Bindungsdomäne ausgeschaltet ist, wurden für das Vertebraten System bereits an Madine-Darby-Canine-Kidney (MDCK) Zellen durchgeführt. Hier führte die Überexpression der inaktiven Kinaseform (aPKC-kn) zu einer Fehllokalisierung der sich normalerweise an den Tight Junctions befindlichen Proteine Asip und PAR-6. Zusätzlich wurden auch die Tight Junction Proteine ZO1, Occludin und Claudin-1 falsch lokalisiert und die Barrierenfunktion der Tight Junctions war betroffen, während die Zell-Zell Kontakte noch existierten (Suzuki et al., 2001).

Die aPKC-kn Form verursacht diese Effekte jedoch nur in Zellen, in denen sich die Polarität erst noch entwickelt, bei einer Expression in voll polarisierten Zellen wurde keine Fehlverteilung von asymmetrischen Komponenten beobachtet. Die Ergebnisse dieser Studie lassen also auf eine Funktion der enzymatischen Aktivität der aPKC auf die Entstehung und nicht bei der Aufrechterhaltung der Epithelpolarität schliessen (Suzuki et al., 2001).

Diese Ergebnisse wurden bisher jedoch nur an Zellkulturen gewonnen, die gut untersuchte Entwicklung der Epithelpolarität bei *Drosophila* bietet sich für eine Übertragung dieser an Zellkulturen gewonnenen Ergebnisse an. Es gilt also zu untersuchen, ob Baz durch DaPKC phosphoryliert wird, eventuelle Phosphorylierungsstellen in Baz zu identifizieren und die Abhängigkeit der Lokalisation der Proteine und den Einfluss der Phosphorylierung auf die Epithelentwicklung zu analysieren.

Die DaPKC bindet im „2-Hybrid“-System nicht nur an Baz und DmPar-6, sondern auch an Insc (diese Arbeit). Die indirekte Bindung von Baz an Insc wurde bereits beschrieben (Wodarz et al., 1999), mit der DaPKC wurde nunmehr ein Protein identifiziert, welches die Kopplung von Insc an Baz ermöglicht. Die für Insc beschriebenen Funktionen bei der Ausrichtung der Zellteilungsspindel und der asymmetrischen Verteilung von Zellschicksalskomponenten hängen daher wahrscheinlich von der Bindung an die aPKC und damit von der Lokalisierung durch diese ab (Wodarz et al., 2000).

4.4 Die Komponenten der apikalen Proteinkomplexe im NB und polarisierten Epithel

Der durch Delamination aus dem Epithelzellverband der ventralen neurogenen Region entstehende NB enthält in seiner apikalen Membrandomäne Komponenten, die bereits in der vorhergehenden Epithelzelle Teil des subapikalen Komplexes (SAC) waren. Bei diesen sowohl in Epithel als auch NB asymmetrisch verteilten Komponenten handelt es sich um Baz, DaPKC, DmPar-6 und möglicherweise Pten4, die alle zusammen einen Proteinkomplex bilden.

Im NB treten weitere Proteine zu diesem Komplex hinzu. Insc und Pins werden erst in NB exprimiert (Schober et al., 1999; Wodarz et al., 1999; Yu et al., 2000) und binden über die DaPKC-Insc Interaktion an den apikalen Komplex. In frühen Interphase-NB binden Mir und Stau an Insc, an Pins bindet die β -Untereinheit eines G-Proteins (Matsuzaki et al., 1998; Schaefer et al., 2000).

Während für die in dieser Arbeit gefundenen Baz-Interaktionspartner DaPKC und Pten4 eine Kolokalisation mit Baz bereits gezeigt werden konnte, wird dieser Nachweis für die anderen mit dem „2-Hybrid“-System gefundenen Interaktionspartner noch geführt werden müssen.

Das vorhergesagte LIM-RING-Domänen Protein CG18253 zeigt auf mRNA-Ebene ein Expressionsmuster, das sehr grosse Ähnlichkeit mit dem von *baz* und *sdt* aufweist.

Die Lokalisation der mRNA auf der apikalen Seite von Epithelien und die direkte Bindung des Proteins an Baz im „2-Hybrid“-System deuten auf eine Funktion dieses bisher unbekanntes Proteins bei der Epithelentwicklung u/o des Zusammenhaltes epithelialer Zellen hin. Die beiden Splicevarianten dieses Gens ermöglichen neben der Bildung des LIM-RING-Domänenproteins eine kürzere Variante ohne diese Domänen und mit verändertem C-Terminus. Die Anwendung von Antisera, die jeweils spezifisch für nur eine dieser Proteinformen sind, wird Aufschluss über die Lokalisation und mögliche gewebespezifische Expression der alternativen Proteinformen geben.

Das im Hefe-„2-Hybrid“-System als Interaktionspartner für Baz gefundene, durch CG4420 codierte hypothetische Protein, weist eine 38%ige Identität zum Vsm1p/Ddi1p aus *Saccharomyces cerevisiae* auf. Vsm1p wird als ein SNARE-Master Protein beschrieben, welches im „2-Hybrid“-System an bestimmte v-SNAREs binden kann (Lustgarten und Gerst, 1999).

SNARE ("soluble N-Ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein (SNAP) receptor")-Proteine bilden Familien membranassoziierter Rezeptoren, die zu der Vesikel Andockungs- und Verschmelzungsmechanik eukaryontischer Zellen gehören (Söllner et al., 1993). Die auf sekretorischen Vesikeln sitzenden SNAREs (v-SNAREs) interagieren mit spezifischen membrangebundenen SNAREs am Zielort (t-SNAREs) und formen so einen vorläufigen Komplex, der vor einer Membranverschmelzung gebildet wird. Die v- und t-SNARE Kopplung stellt eine minimale Voraussetzung für eine Assoziation und Verschmelzung zweier Membranen dar (Weber et al., 1998).

Die Bildung eines v-SNARE/t-SNARE Komplexes ist über Regulatorproteine gesteuert, die mit v-SNARE u/o t-SNARE Proteinen assoziiert sind. Diese Regulatorproteine werden als "SNARE-Master" Proteine bezeichnet. Die Inaktivierung solcher Regulatorproteine oder ihre Dissoziation von den SNAREs stellt eine Voraussetzung für die Assemblierung und das Verschmelzen zweier Membranen dar (Gerst, 1999).

In einer durch die asymmetrische Verteilung von Strukturkomponenten polarisierten Zelle trägt die selektive Verteilung der über das Golgi-System transportierten Faktoren zum Erhalt dieser Polarität bei, d.h. Vesikel, die Komponenten für die apikale Domäne enthalten, werden

zu dieser hin gerichtet. Das gleiche gilt für Vesikel mit Komponenten für die basale Zelldomäne. Proteine wie Vsm1p, die den Vesikeltransport regulieren, können somit einen Einfluss auf Membranpolarität ausüben.

Eine Deletion von *vsm1* führt bei der Hefe zu einer gesteigerten Sekretion von Proteinen, eine Überexpression hat dagegen die Akkumulation sekretorischer Vesikel an Knospungsspitzen zur Folge.

Vsm1p kann genau wie Rad23p den Phänotyp einer Mutation in *pds1* unterdrücken (Clarke et al., 2001). Bei Pds1p handelt es sich um einen Anaphase-Inhibitor, der zunächst synthetisiert und dann wieder abgebaut werden muss, damit die Mitose effizient stattfinden kann (Yamamoto et al., 1996).

Sowohl Vsm1p als auch Rad23p weisen an ihrem C-Terminus genau wie das Vsm1p homologe CG4420-Protein eine Ubiquitin-Assoziations-Domäne (UBA) auf. Die UBA-Domäne kann direkt an Ubiquitin binden und ist für die Unterdrückung des *pds1*-Phänotyps essentiell. Ausserdem besitzt die UBA-Domäne eine Funktion bei der Homodimerbildung von Rad23p und Heterodimerbildung zwischen Rad23p und Vsm1p (Bertolaet et al., 2001).

Drosophila melanogaster verfügt zwar nicht über ein *pds1* Homolog, jedoch existiert ein solches für *rad23*, welches neben einer UBQ-Domäne noch 2 UBA-Domänen aufweist, wovon eine am C-Terminus liegt. Es gibt keine mutanten Allele des *rad23* Gens von *Drosophila melanogaster*.

Reguliert das CG4420-Protein möglicherweise den gerichteten Transport sekretorischer Vesikel und trägt damit zum Aufbau oder Erhaltung von Epithelpolarität bei?

Wenn das CG4420-Protein wie das Vsm1p eine membranassoziierte Lokalisierung aufweist, und einen Einfluss auf die Zellpolarität ausübt, so könnte man evtl. eine asymmetrische Verteilung des Proteins, oder bei einer Expression an der gesamten Zellmembran, eine entsprechende asymmetrische Aktivierung des Proteins nur in der apikalen Domäne erwarten. Die Untersuchung der Proteinlokalisierung wird zur Zeit mit einem gegen das durch CG4420 codierte Protein gerichteten Antiserum von W. von Stein untersucht.

Oder besitzt CG4420 über seine UBA-Domäne alleine oder zusammen mit dem Rad23 Homolog einen Einfluss auf den Zellzyklus?

Ob ein Einfluss von CG4420 auf den Zellzyklus besteht, könnte durch eine Expression des Gens im Auge untersucht werden. Anhand der Zellgrösse und der Anzahl der Zellen im Auge lässt sich hier ein Effekt auf den Zellzyklus gut untersuchen.

Hinweise auf die Effekte von CG4420-Mutanten können durch die Untersuchung von Defizienzlinien gefunden werden, bei denen CG4420 deletiert ist. In der Region 14C6 des X

Chromosoms von *Drosophila melanogaster* wurden drei Defizienzen beschrieben, die möglicherweise auch CG4420 entfernen, dies sind Df(1)D34, Dp(1;4)8111g und Dp(1;4)82b10w.

Ein PDZ-Domänen enthaltendes Protein, an welches das PDZ-Bindemotiv am unmittelbaren C-Terminus von BAZ bindet, wurde bisher nicht identifiziert. Zu den potentiellen Kandidaten gehören u.a. die Produkte von "*discs lost*" (*dlt*) und des kürzlich klonierten Gens *stardust* (*sdt*). Bei Dlt handelt es sich um ein Protein mit 4 PDZ-Domänen (Bhat et al., 1999), bei Sdt um ein MAGUK (membrane associated guanylate kinase)-Protein; Bachmann, 2001 #85; Hong, 2001 #86]. *stardust* Mutanten weisen einen ähnlichen Phänotyp wie *baz* Mutanten auf und das Sdt-Protein bindet im 2-Hybrid-System über seine PDZ-Domäne an den C-Terminus des Adherens Junction Proteins Crb ("Crumbs"). Zumindest im „2-Hybrid“-System konnte jedoch keine Interaktion der Stardust PDZ-Domäne mit dem Baz C-Terminus gefunden werden. Auch die Interaktion von Dlt mit dem vollständigen Baz-Protein wurde getestet. Obwohl dieser Interaktionstest ein negatives Ergebnis lieferte, kann wegen der oben beschriebenen Schwierigkeiten bei der Verwendung längerer Proteine nicht eindeutig ausgeschlossen werden, dass diese Proteine aneinander binden. Diese Interaktion sollte daher mit einem Baz-Fragment getestet werden, welches nur einen Teil des Baz C-Terminus enthält.

Das *Drosophila melanogaster* Homolog zu ZO-1 ist das Gen *polychaetoid/tamou* (*pyd/tam*) (Wei und Ellis, 2001). ZO-1, ZO-2, ZO-3 und PYD bilden eine Unterfamilie von MAGUK-Proteinen mit 3 aminoterminalen PDZ-Domänen, einer SH3 Domäne, einer GUK-Domäne und, mit Ausnahme von ZO3, mit einer prolinreichen C-Terminalen Domäne, wobei die ZO-Proteine Bestandteil der Tight Junctions in Vertebraten Epithelien sind (Beatch et al., 1996; Haskins et al., 1998; Itoh et al., 1993; Jesaitis und Goodenough, 1994; Willott et al., 1993).

In *Drosophila melanogaster* wurde zwar für Pyd eine Kolokalisation mit dem Adherens Junction Protein Arm beschrieben (Wei and Ellis, 2001), die Kolokalisation mit Proteinen des SAC wurde jedoch noch nicht untersucht. Adherens Junctions und subapikale Zone liegen bei *Drosophila* sehr nahe aneinander, daher erscheint es möglich, dass die Pyd-Expression sich bis in die subapikale Zone erstreckt.

pyd hat eine starke Homologie zu *dlg* und einem durch das BDGP vorhergesagten Gen CG6509. Während von Dlg bekannt ist, dass es an Septate Junctions lokalisiert ist (Woods und Bryant, 1991), weiss man über CG6509 noch nichts näheres. Bei CG6509 finden sich in der vorhergesagten Proteinsequenz 4 PDZ-, eine SH3- und eine GUK-Domäne. Aufgrund der enormen Vielzahl von Proteinen mit PDZ-Domänen im apikalen Bereich von Epithelien mit Adherens Junctions und subapikaler Zone erscheint es möglich, dass auch das vorhergesagte

Protein von CG6509 im apikalen Bereich des Epithels lokalisiert. Die Suche nach Sequenzen in der BDGP-Datenbank, die Homologie zu irgendeiner der PDZ Domänen von Baz besitzen zeigt, dass es noch mindesten 52 weitere Proteine mit PDZ-Domänen bei *Drosophila melanogaster* gibt, wovon viele membranassoziiert sind (Daten nicht gezeigt).

Für das in Vertebraten beschriebene Baz Homolog Asip wurde kürzlich ein Transmembranprotein beschrieben, welches an die erste PDZ-Domäne von Asip bindet, und möglicherweise für dessen Membranlokalisierung verantwortlich ist (Ebnet et al., 2001). In *Drosophila melanogaster* existiert kein Sequenzhomolog zu diesem mit Jam1 beschriebenen Protein. In Analogie zu der spezifischen Jam1 Bindung an die erste PDZ-Domäne von Asip bindet auch bei *Drosophila melanogaster* ein Transmembranprotein spezifisch nur an die erste PDZ-Domäne von Baz. Dieses Protein, Toll-7 wird jedoch während der Embryogenese nicht in den gleichen Geweben wie Baz exprimiert, und kann daher zumindest in dieser Entwicklungsphase nicht für die Membranlokalisierung von Baz verantwortlich sein.

Für den N-Terminus von Baz wurden durch einen „2-Hybrid-Screen“ eine Reihe weiterer Interaktionspartner identifiziert, die jedoch noch nicht näher charakterisiert sind (D.Egger, persönliche Mitteilung). Zudem existieren mit hoher Wahrscheinlichkeit noch weitere Interaktionspartner, die an den C-terminalen Bereich entweder über eine SH3-Domäne an die prolinreiche Region oder mit einer PDZ-Domäne an das unmittelbar am C-Terminus gelegene PDZ-Bindemotiv binden.

Der Mechanismus der Baz Lokalisierung zur Zellmembran hin ist also noch nicht geklärt, in dem Schema der Abb.35 wird Baz daher nur spekulativ durch ein putatives Membranprotein zur Membran hin rekrutiert.

4.5 Schlussbemerkungen

Für das Verständnis des der asymmetrischen Zellteilung zugrundeliegenden Mechanismus ist es zunächst einmal erforderlich, möglichst viele der daran beteiligten Faktoren zu kennen. In dieser Arbeit wurden mehrere Proteine identifiziert, für die eine Beteiligung an dem Mechanismus bereits gezeigt ist (DaPKC) oder eine solche Beteiligung möglich ist (PTEN). Über den Mechanismus selber wurden dabei ebenfalls Erkenntnisse gewonnen, so übernimmt ein entstehender NB seine Polarität von einem Teil der sich ursprünglich im subapikalen Komplex der Epithelzellen befindenden Proteine BAZ/DaPKC/DPAR-6 (Wodarz et al., 1999). Die korrekte Lokalisation dieser Faktoren in Epithelzellen besitzt bereits einen Einfluss auf die Polarität von daraus entstehenden NB.

Auch für die übrigen, noch nicht näher charakterisierten „2-Hybrid“-Interaktionspartner, erscheint eine in vivo Funktion dieser Interaktion durchaus möglich. Für die Etablierung und Aufrechterhaltung einer Zellpolarität wird ein gerichteter Proteintransport benötigt. Proteine wie VSM1, die den gerichteten Transport kontrollieren, können sicherlich eine wichtige Rolle bei der Zellpolarität spielen. Damit kann das durch CG4420 codierte VSM1-Homolog in die beschriebenen Prozesse eingeordnet werden.

Für die Beteiligung des LIM-RING Domänen Proteins spricht die auf der apikalen Seite von Epithelien beschränkte mRNA Lokalisation. Eine solche mRNA Lokalisation ist auch von anderen Proteinen, wie beispielsweise Baz, die zur Polarisierung einer Zelle beitragen, bekannt.

Mit der Identifizierung von Interaktionspartnern für die PDZ-Domänen von BAZ sind die Möglichkeiten zum Einsatz von BAZ bei der Aufklärung des asymmetrischen Teilungsmechanismus noch längst nicht ausgeschöpft. Die C-Terminale Konsensussequenz für die Bindung an PDZ-Domänen und die Prolinreiche Domäne, an die Proteine mit SH3 Domänen binden können, bietet sich für die weitere Suche nach Komponenten der apikalen Proteinkomplexe an. Hierbei könnte auch das in dieser Arbeit verbesserte „2-Hybrid“-System eingesetzt werden.

V. Literatur

- Adams, A. E., Johnson, D. I., Longnecker, R. M., Sloat, B. F. and Pringle, J. R.** (1990). CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **111**, 131-42.
- Adams, A. E. and Pringle, J. R.** (1984). Relationship of actin and tubulin distribution to bud growth in wild- type and morphogenetic-mutant *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **98**, 934-45.
- Aderem, A. and Ulevitch, R. J.** (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**, 782-7.
- Ago, T., Takeya, R., Hiroaki, H., Kuribayashi, F., Ito, T., Kohda, D. and Sumimoto, H.** (2001). The PX domain as a novel phosphoinositide- binding module. *Biochem Biophys Res Commun* **287**, 733-8.
- Alessi, D. R., Deak, M., Casamayor, A., Caudwell, F. B., Morrice, N., Norman, D. G., Gaffney, P., Reese, C. B., MacDougall, C. N., Harbison, D. et al.** (1997). 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Curr Biol* **7**, 776-89.
- Alt, J. R., Cleveland, J. L., Hannink, M. and Diehl, J. A.** (2000). Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation. *Genes Dev* **14**, 3102-14.
- 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**, 638-643.
- Baudin, A., Ozier,-Kalogeropoulos, O., Denouel, A., Lacroute, F. und Cullin, C.** (1993) *Nucleic Acids Res.* **21**, 3329-3330
- Bayer, C. A., Holley, B. and Fristrom, J. W.** (1996). A switch in broad-complex zinc-finger isoform expression is regulated posttranscriptionally during the metamorphosis of *Drosophila* imaginal discs. *Dev Biol* **177**, 1-14.
- Beatch, M., Jesaitis, L. A., Gallin, W. J., Goodenough, D. A. and Stevenson, B. R.** (1996). The tight junction protein ZO-2 contains three PDZ (PSD-95/Discs- Large/ZO-1) domains and an alternatively spliced region. *J Biol Chem* **271**, 25723-6.
- Belham, C., Wu, S. and Avruch, J.** (1999). Intracellular signalling: PDK1--a kinase at the hub of things. *Curr Biol* **9**, R93-6.

- Bellacosa, A., Testa, J. R., Staal, S. P. and Tschlis, P. N.** (1991). A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* **254**, 274-7.
- Bellaiche, Y. and Schweisguth, F.** (2001). Lineage diversity in the Drosophila nervous system. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 418-23.
- Berleth, T., Burri, M., Thoma, G., Bopp, D., Richstein, S., Frigerio, G., Noll, M and Nusslein-Volhard, C.** (1988). The role of localization of bicoid RNA in organizing the anterior pattern of the Drosophila embryo. *Embo J* **7**, 1749-56.
- Bertolaet, B. L., Clarke, D. J., Wolff, M., Watson, M. H., Henze, M., Divita, G. and Reed, S. I.** (2001). UBA domains of DNA damage-inducible proteins interact with ubiquitin. *Nat Struct Biol* **8**, 417-22.
- Bezprozvanny, I. and Maximov, A.** (2001). Classification of PDZ domains. *FEBS Lett* **509**, 457-62.
- Bhat, M. A., Izaddoost, S., Lu, Y., Cho, K. O., Choi, K. W. and Bellen, H. J.** (1999). Discs Lost, a novel multi-PDZ domain protein, establishes and maintains epithelial polarity. *Cell* **96**, 833-45.
- Bonneau, D. and Longy, M.** (2000). Mutations of the human PTEN gene. *Hum Mutat* **16**, 109-22.
- Bose, I., Irazoqui, J. E., Moskow, J. J., Bardes, E. S., Zyla, T. R. and Lew, D. J.** (2001). Assembly of scaffold-mediated complexes containing Cdc42p, the exchange factor Cdc24p, and the effector Cla4p required for cell cycle-regulated phosphorylation of Cdc24p. *J Biol Chem* **276**, 7176-86.
- 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.
- Burbelo, P. D., Drechsel, D. and Hall, A.** (1995). A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for both Cdc42 and Rac GTPases. *J Biol Chem* **270**, 29071-4.
- Caffrey, J. J., Darden, T., Wenk, M. R. and Shears, S. B.** (2001). Expanding coincident signaling by PTEN through its inositol 1,3,4,5,6- pentakisphosphate 3-phosphatase activity. *FEBS Lett* **499**, 6-10.
- Cairns, P., Okami, K., Halachmi, S., Halachmi, N., Esteller, M., Herman, J. G., Jen, J., Isaacs, W. B., Bova, G. S. and Sidransky, D.** (1997). Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. *Cancer Res* **57**, 4997-5000.
- Campos-Ortega, J. A. and Hartenstein, V.** (1997). The Embryonic Development of Drosophila melanogaster. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*.

- Cereijido, M., Valdes, J., Shoshani, L. and Contreras, R. G.** (1998). Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity. *Annu Rev Physiol* **60**, 161-77.
- Chant, J. and Pringle, J. R.** (1991). Budding and cell polarity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Genet Dev* **1**, 342-50.
- Chant, J. and Pringle, J. R.** (1995). Patterns of bud-site selection in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **129**, 751-65.
- Chen, W., Lim, H. H. and Lim, L.** (1993). The CDC42 homologue from *Caenorhabditis elegans*. Complementation of yeast mutation. *J Biol Chem* **268**, 13280-5.
- Cheng, N. N., Kirby, C. M. and Kemphues, 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.
- Cho, K. O., Hunt, C. A. and Kennedy, M. B.** (1992). The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *Neuron* **9**, 929-42.
- Cho, K. S., Lee, J. H., Kim, S., Kim, D., Koh, H., Lee, J., Kim, C., Kim, J. and Chung, J.** (2001). *Drosophila* phosphoinositide-dependent kinase-1 regulates apoptosis and growth via the phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6144-9.
- Chong, L. D., Traynor-Kaplan, A., Bokoch, G. M. and Schwartz, M. A.** (1994). The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells. *Cell* **79**, 507-13.
- Chou, M. M., Hou, W., Johnson, J., Graham, L. K., Lee, M. H., Chen, C. S., Newton, A. C., Schaffhausen, B. S. and Toker, A.** (1998). Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr Biol* **8**, 1069-77.
- Clarke, D. J., Mondesert, G., Segal, M., Bertolaet, B. L., Jensen, S., Wolff, M., Henze, M. and Reed, S. I.** (2001). Dosage suppressors of *pds1* implicate ubiquitin-associated domains in checkpoint control. *Mol Cell Biol* **21**, 1997-2007.
- Coffer, P. J., Jin, J. and Woodgett, J. R.** (1998). Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J* **335**, 1-13.
- Cowburn, D.** (1997). Peptide recognition by PTB and PDZ domains. *Curr Opin Struct Biol* **7**, 835-8.
- Cox, D. N., Seyfried, S. A., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (2001). Bazooka and atypical protein kinase C are required to regulate oocyte differentiation in the *Drosophila* ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14475-80.

- Daniels, D. L., Cohen, A. R., Anderson, J. M. and Brunger, A. T.** (1998). Crystal structure of the hCASK PDZ domain reveals the structural basis of class II PDZ domain target recognition. *Nat Struct Biol* **5**, 317-25.
- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. and Greenberg, M. E.** (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell- intrinsic death machinery. *Cell* **91**, 231-41.
- Dawid, I. B., Breen, J. J. and Toyama, R.** (1998). LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends Genet* **14**, 156-62.
- Deppe, U., Schierenberg, E., Cole, T., Krieg, C., Schmitt, D., Yoder, B. and von Ehrenstein, G.** (1978). Cell lineages of the embryo of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 376-80.
- Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F. and Sherr, C. J.** (1998). Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* **12**, 3499-511.
- DiNardo, S., Sher, E., Heemskerk, J. J., Kassis, J. A. and O'Farrell, P. H.** (1988). Two-tiered regulation of spatially patterned engrailed gene expression during *Drosophila* embryogenesis. *Nature* **332**, 604-9.
- Doyle, D. A., Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M. and MacKinnon, R.** (1996). Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein- binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* **85**, 1067-76.
- 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.
- Eldon, E., Kooyer, S., D'Evelyn, D., Duman, M., Lawinger, P., Botas, J. and Bellen, H.** (1994a). The *Drosophila* 18 wheeler is required for morphogenesis and has striking similarities to Toll. *Development* **120**, 885-99.
- Eldon, E., Kooyer, S., D'Evelyn, D., Duman, M., Lawinger, P., Botas, J. and Bellen, H.** (1994b). The *Drosophila* 18 wheeler is required for morphogenesis and has striking similarities to Toll. *Development* **120**, 885-99.
- Etemad-Moghadam, B., Guo, S. and Kemphues, K. J.** (1995a). Asymmetrically distributed PAR-3 protein contributes to cell polarity and spindle alignment in early *C. elegans* embryos. *Cell* **83**, 743-52.
- Etemad-Moghadam, B., Guo, S. and Kemphues, K. J.** (1995b). Asymmetrically distributed PAR-3 protein contributes to cell polarity and spindle alignment in early *C. elegans* embryos. *Cell* **83**, 743-52.

- Freemont, P. S.** (2000). RING for destruction? *Curr Biol* **10**, R84-7.
- Freyd, G., Kim, S. K. and Horvitz, H. R.** (1990). Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-11*. *Nature* **344**, 876-9.
- Frigerio, G., Burri, M., Bopp, D., Baumgartner, S. and Noll, M.** (1986). Structure of the segmentation gene *paired* and the *Drosophila* *PRD* gene set as part of a gene network. *Cell* **47**, 735-46.
- Fuerstenberg, S., Broadus, J. and Doe, C. Q.** (1998a). Asymmetry and cell fate in the *Drosophila* embryonic CNS. *Int J Dev Biol* **42**(3), 379-83.
- Fuerstenberg, S., Broadus, J. and Doe, C. Q.** (1998b). Asymmetry and cell fate in the *Drosophila* embryonic CNS. *Int J Dev Biol* **42**, 379-83.
- Gay, N. J., Packman, L. C., Weldon, M. A. and Barna, J. C.** (1991). A leucine-rich repeat peptide derived from the *Drosophila* Toll receptor forms extended filaments with a beta-sheet structure. *FEBS Lett* **291**, 87-91.
- Geisler, R., Bergmann, A., Hiromi, Y. and Nusslein-Volhard, C.** (1992). *cactus*, a gene involved in dorsoventral pattern formation of *Drosophila*, is related to the I kappa B gene family of vertebrates. *Cell* **71**, 613-21.
- Gerst, J. E.** (1999). SNAREs and SNARE regulators in membrane fusion and exocytosis. *Cell Mol Life Sci* **55**, 707-34.
- Goldstein, B. and Hird, S. N.** (1996). Specification of the anteroposterior axis in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **122**, 1467-74.
- Gotta, M., Abraham, M. C. and Ahringer, J.** (2001). CDC-42 controls early cell polarity and spindle orientation in *C. elegans*. *Curr Biol* **11**, 482-8.
- Grill, S. W., Gonczy, P., Stelzer, E. H. and Hyman, A. A.** (2001). Polarity controls forces governing asymmetric spindle positioning in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Nature* **409**, 630-3.
- 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.
- Guo, S. and Kemphues, K. J.** (1996a). Molecular genetics of asymmetric cleavage in the early *Caenorhabditis elegans* embryo. *Curr Opin Genet Dev* **6**, 408-15.
- Guo, S. and Kemphues, K. J.** (1996b). A non-muscle myosin required for embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **382**, 455-8.

- Han, J., Luby-Phelps, K., Das, B., Shu, X., Xia, Y., Mosteller, R. D., Krishna, U. M., Falck, J. R., White, M. A. and Broek, D.** (1998). Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science* **279**, 558-60.
- Harrison, S. C.** (1996). Peptide-surface association: the case of PDZ and PTB domains. *Cell* **86**, 341-3.
- Hashimoto, C., Hudson, K. L. and Anderson, K. V.** (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* **52**, 269-79.
- Haskins, J., Gu, L., Wittchen, E. S., Hibbard, J. and Stevenson, B. R.** (1998). ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol* **141**, 199-208.
- Hassan, B. A., Prokopenko, S. N., Breuer, S., Zhang, B., Paululat, A. and Bellen, H. J.** (1998). skittles, a *Drosophila* phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase, is required for cell viability, germline development and bristle morphology, but not for neurotransmitter release. *Genetics* **150**, 1527-37.
- Hiles, I. D., Otsu, M., Volinia, S., Fry, M. J., Gout, I., Dhand, R., Panayotou, G., Ruiz-Larrea, F., Thompson, A., Totty, N. F. et al.** (1992). Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. *Cell* **70**, 419-29.
- Hillier, B. J., Christopherson, K. S., Prehoda, K. E., Bretz, D. S. and Lim, W. A.** (1999). Unexpected modes of PDZ domain scaffolding revealed by structure of nNOS-syntrophin complex. *Science* **284**, 812-5.
- Hirata, J., Nakagoshi, H., Nabeshima, Y. and Matsuzaki, F.** (1995). Asymmetric segregation of the homeodomain protein Prospero during *Drosophila* development. *Nature* **377**, 627-30.
- Hird, S. N. and White, J. G.** (1993). Cortical and cytoplasmic flow polarity in early embryonic cells of *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* **121**, 1343-55.
- Huang, H., Potter, C. J., Tao, W., Li, D. M., Brogiolo, W., Hafen, E., Sun, H. and Xu, T.** (1999). PTEN affects cell size, cell proliferation and apoptosis during *Drosophila* eye development. *Development* **126**, 5365-72.
- Hummel, T., Krukkert, K., Roos, J., Davis, G. and Klambt, C.** (2000). *Drosophila* Futsch/22C10 is a MAP1B-like protein required for dendritic and axonal development. *Neuron* **26**, 357-70.

- Hung, T. J. and Kemphues, K. J.** (1999a). PAR-6 is a conserved PDZ domain-containing protein that colocalizes with PAR-3 in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development* **126**, 127-35.
- Hung, T. J. and Kemphues, K. J.** (1999b). PAR-6 is a conserved PDZ domain-containing protein that colocalizes with PAR-3 in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development* **126**, 127-35.
- Hyman, A. A. and White, J. G.** (1987). Determination of cell division axes in the early embryogenesis of *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* **105**, 2123-35.
- Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Kitani-Yasuda, T. and Tsukita, S.** (1993). The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy. *J Cell Biol* **121**, 491-502.
- Itoh, M., Sasaki, H., Furuse, M., Ozaki, H., Kita, T. and Tsukita, S.** (2001). Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *J Cell Biol* **154**, 491-7.
- Izawa I., Nishizawa M., Tomono Y., Ohtakara K., Takahashi T., Inagaki M.** (2002). ERBIN associates with p0071, an armadillo protein, at cell-cell junctions of epithelial cells. *Genes Cells* **7**, 475-85
- Izumi, Y., Hirose, T., Tamai, Y., Hirai, S., Nagashima, Y., Fujimoto, T., Tabuse, Y., Kemphues, 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 [In Process Citation]. *J Cell Biol* **143**, 95-106.
- Jan, Y. N. and Jan, L. Y.** (2000). Polarity in cell division: what frames thy fearful asymmetry? *Cell* **100**, 599-602.
- Janmey, P. A.** (1994). Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly. *Annu Rev Physiol* **56**, 169-91.
- Jesaitis, L. A. and Goodenough, D. A.** (1994). Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *J Cell Biol* **124**, 949-61.
- 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**, 531-539.
- Kaech, S. M., Whitfield, C. W. and Kim, S. K.** (1998). The LIN-2/LIN-7/LIN-10 complex mediates basolateral membrane localization of the *C. elegans* EGF receptor LET-23 in vulval epithelial cells. *Cell* **94**, 761-71.

- Kalidas, S. and Smith, D. P.** (2002). Novel genomic cDNA hybrids produce effective RNA interference in adult *Drosophila*. *Neuron* **33**, 177-84.
- Kaltschmidt, J. A., Davidson, C. M., Brown, N. H. and Brand, A. H.** (2000). Rotation and asymmetry of the mitotic spindle direct asymmetric cell division in the developing central nervous system. *Nat Cell Biol* **2**, 7-12.
- Kausalya P.J., Reichert M., Hunziker W.** (2001). Connexin45 directly binds to ZO-1 and localizes to the tight junction region in epithelial MDCK cells. *FEBS Lett* **505**, 92-6 .
- Kay, A. J. and Hunter, C. P.** (2001). CDC-42 regulates PAR protein localization and function to control cellular and embryonic polarity in *C. elegans*. *Curr Biol* **11**, 474-81.
- Kemphues, 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.
- Khosravi-Far, R., Solski, P. A., Clark, G. J., Kinch, M. S. and Der, C. J.** (1995). Activation of Rac1, RhoA, and mitogen-activated protein kinases is required for Ras transformation. *Mol Cell Biol* **15**, 6443-53.
- Kidd, S.** (1992). Characterization of the *Drosophila* cactus locus and analysis of interactions between cactus and dorsal proteins. *Cell* **71**, 623-35.
- Kim, S. H., Li, Z. and Sacks, D. B.** (2000). E-cadherin-mediated cell-cell attachment activates Cdc42. *J Biol Chem* **275**, 36999-7005.
- Klamt, C. and Goodman, C. S.** (1991). The diversity and pattern of glia during axon pathway formation in the *Drosophila* embryo. *Glia* **4**, 205-13.
- Klebes, A. and Knust, E.** (2000). A conserved motif in Crumbs is required for E-cadherin localisation and zonula adherens formation in *Drosophila*. *Curr Biol* **10**, 76-85.
- Knirr, S., Breuer, S., Paululat, A. and Renkawitz-Pohl, R.** (1997). Somatic mesoderm differentiation and the development of a subset of pericardial cells depend on the not enough muscles (*nem*) locus, which contains the *inscuteable* gene and the intron located gene, *skittles*. *Mech Dev* **67**, 69-81.
- Knoblich, J. A., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1995). Asymmetric segregation of Numb and Prospero during cell division. *Nature* **377**, 624-7.
- 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.

- Le Good, J. A., Ziegler, W. H., Parekh, D. B., Alessi, D. R., Cohen, P. and Parker, P. J.** (1998). Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* **281**, 2042-5.
- Levine, R. B., Morton, D. B. and Restifo, L. L.** (1995). Remodeling of the insect nervous system. *Curr Opin Neurobiol* **5**, 28-35.
- Levitan, D. J., Boyd, L., Mello, C. C., Kempfues, K. J. and Stinchcomb, D. T.** (1994). par-2, a gene required for blastomere asymmetry in *Caenorhabditis elegans*, encodes zinc-finger and ATP-binding motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 6108-12.
- Li, D. M. and Sun, H.** (1997). TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res* **57**, 2124-9.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S. I., Puc, J., Miliareis, C., Rodgers, L., McCombie, R. et al.** (1997a). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* **275**, 1943-7.
- Li, P., Yang, X., Wasser, M., Cai, Y. and Chia, W.** (1997b). Inscuteable and Staufan mediate asymmetric localization and segregation of prospero RNA during *Drosophila* neuroblast cell divisions. *Cell* **90**, 437-47.
- Liaw, D., Marsh, D. J., Li, J., Dahia, P. L., Wang, S. I., Zheng, Z., Bose, S., Call, K. M., Tsou, H. C., Peacocke, M. et al.** (1997). Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet* **16**, 64-7.
- Lin, D., Edwards, A. S., Fawcett, J. P., Mbamalu, G., Scott, J. D. and Pawson, T.** (2000a). A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat Cell Biol* **2**, 540-7.
- Lin, D., Edwards, A. S., Fawcett, J. P., Mbamalu, G., Scott, J. D. and Pawson, T.** (2000b). A mammalian Par-3-Par-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat. Cell Biol.* **2**, 540-547.
- Liu, E. and Restifo, L. L.** (1998). Identification of a broad complex-regulated enhancer in the developing visual system of *Drosophila*. *J Neurobiol* **34**, 253-70.
- Liu, Y., Dai, H. and Xiao, W.** (1997). UAS(MAG1), a yeast cis-acting element that regulates the expression of MAG1, is located within the protein coding region of DDI1. *Mol Gen Genet* **255**, 533-42.
- Lu, B., Rothenberg, M., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1998). Partner of Numb colocalizes with Numb during mitosis and directs Numb asymmetric localization in *Drosophila* neural and muscle progenitors. *Cell* **95**, 225-35.

- Lustgarten, V. and Gerst, J. E.** (1999). Yeast VSM1 encodes a vSNARE binding protein that may act as a negative regulator of constitutive exocytosis. *Mol Cell Biol* **19**, 4480-94.
- Maehama, T. und Dixon, J. E.** (1999). PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *Trends Cell Biol* **9**, 125-8.
- Marsh, D. J., Coulon, V., Lunetta, K. L., Rocca-Serra, P., Dahia, P. L., Zheng, Z., Liaw, D., Caron, S., Duboue, B., Lin, A. Y. et al.** (1998). Mutation spectrum and genotype-phenotype analyses in Cowden disease and Bannayan-Zonana syndrome, two hamartoma syndromes with germline PTEN mutation. *Hum Mol Genet* **7**, 507-15.
- Matsuzaki, F.** (2000). Asymmetric division of Drosophila neural stem cells: a basis for neural diversity. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 38-44.
- Matsuzaki, F., Ohshiro, T., Ikeshima-Kataoka, H. und Izumi, H.** (1998). miranda localizes stau6 and prospero asymmetrically in mitotic neuroblasts and epithelial cells in early Drosophila embryogenesis. *Development* **125**, 4089-98.
- McElvers, J. und Weber, S.** (1992). *Yeast* **8**, 627.
- Means, T. K., Golenbock, D. T. und Fenton, M. J.** (2000). The biology of Toll-like receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* **11**, 219-32.
- Medema, R. H., Kops, G. J., Bos, J. L. und Burgering, B. M.** (2000). AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* **404**, 782-7.
- Meyers, B. C., Dickerman, A. W., Michelmore, R. W., Sivaramakrishnan, S., Sobral, B. W. and Young, N. D.** (1999). Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant J* **20**, 317-32.
- Mitcham, J. L., Parnet, P., Bonnert, T. P., Garka, K. E., Gerhart, M. J., Slack, J. L., Gayle, M. A., Dower, S. K. und Sims, J. E.** (1996). T1/ST2 signaling establishes it as a member of an expanding interleukin- 1 receptor family. *J Biol Chem* **271**, 5777-83.
- Mitic, L. L. und Anderson, J. M.** (1998). Molecular architecture of tight junctions. *Annu Rev Physiol* **60**, 121-42.
- Morais Cabral, J. H., Petosa, C., Sutcliffe, M. J., Raza, S., Byron, O., Poy, F., Marfatia, S. M., Chishti, A. H. und Liddington, R. C.** (1996). Crystal structure of a PDZ domain. *Nature* **382**, 649-52.
- Morton, D. G., Roos, J. M. und Kemphues, K. J.** (1992). par-4, a gene required for cytoplasmic localization and determination of specific cell types in Caenorhabditis elegans embryogenesis. *Genetics* **130**, 771-90.

- Morton, D. G., Shakes, D. C., Nugent, S., Dichoso, D., Wang, W., Golden, A. und Kempfues, K. J.** (2002). The *Caenorhabditis elegans* par-5 Gene Encodes a 14-3-3 Protein Required for Cellular Asymmetry in the Early Embryo. *Dev Biol* **241**, 47-58.
- Müller, H. A. J.** (2000). Genetic control of epithelial cell polarity: lessons from *Drosophila*. *Dev Dyn* **218**, 52-67.
- Nave, B. T., Ouwens, M., Withers, D. J., Alessi, D. R. und Shepherd, P. R.** (1999). Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem J* **344 Pt 2**, 427-31.
- Nelen, M. R., van Staveren, W. C., Peeters, E. A., Hassel, M. B., Gorlin, R. J., Hamm, H., Lindboe, C. F., Fryns, J. P., Sijmons, R. H., Woods, D. G. et al.** (1997). Germline mutations in the PTEN/MMAC1 gene in patients with Cowden disease. *Hum Mol Genet* **6**, 1383-7.
- Nern, A. and Arkowitz, R. A.** (1999). A Cdc24p-Far1p-Gbetagamma protein complex required for yeast orientation during mating. *J Cell Biol* **144**, 1187-202.
- O'Connell, K. F., Maxwell, K. N. and White, J. G.** (2000). The *spd-2* gene is required for polarization of the anteroposterior axis and formation of the sperm asters in the *Caenorhabditis elegans* zygote. *Dev Biol* **222**, 55-70.
- O'Neill, L. A.** (2000). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* **2000**, RE1.
- O'Neill, L. A. and Greene, C.** (1998). Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J Leukoc Biol* **63**, 650-7.
- Otsu, M., Hiles, I., Gout, I., Fry, M. J., Ruiz-Larrea, F., Panayotou, G., Thompson, A., Dhand, R., Hsuan, J., Totty, N. et al.** (1991). Characterization of two 85 kd proteins that associate with receptor tyrosine kinases, middle-T/pp60c-src complexes, and PI3-kinase. *Cell* **65**, 91-104.
- Petronczki, M. and Knoblich, J. A.** (2001). DmPAR-6 directs epithelial polarity and asymmetric cell division of neuroblasts in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* **3**, 43-49.
- Ponting, C. P., Phillips, C., Davies, K. E. and Blake, D. J.** (1997). PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites. *Bioessays* **19**, 469-79.
- Preston, C. R. and Engels, W. R.** (1996). P-element-induced male recombination and gene conversion in *Drosophila*. *Genetics* **144**, 1611-22.

- Pringle, J. R., Bi, E., Harkins, H. A., Zahner, J. E., De Virgilio, C., Chant, J., Corrado, K. and Fares, H.** (1995). Establishment of cell polarity in yeast. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **60**, 729-44.
- Pruyne, D. and Bretscher, A.** (2000). Polarization of cell growth in yeast. *J Cell Sci* **113**, 571-85.
- Qiu, R. G., Abo, A. and Martin, G. S.** (2000). A human homolog of the C. elegans polarity determinant par-6 links rac and cdc42 to PKCzeta signaling and cell transformation [In Process Citation]. *Curr Biol* **10**, 697-707.
- Qiu, R. G., Abo, A., McCormick, F. and Symons, M.** (1997). Cdc42 regulates anchorage-independent growth and is necessary for Ras transformation. *Mol Cell Biol* **17**, 3449-58.
- Qiu, R. G., Chen, J., Kirn, D., McCormick, F. and Symons, M.** (1995). An essential role for Rac in Ras transformation. *Nature* **374**, 457-9.
- Rasheed, B. K., Stenzel, T. T., McLendon, R. E., Parsons, R., Friedman, A. H., Friedman, H. S., Bigner, D. D. and Bigner, S. H.** (1997). PTEN gene mutations are seen in high-grade but not in low-grade gliomas. *Cancer Res* **57**, 4187-90.
- Restifo, L. L. and White, K.** (1991). Mutations in a steroid hormone-regulated gene disrupt the metamorphosis of the central nervous system in Drosophila. *Dev Biol* **148**, 174-94.
- Rodriguez-Viciana, P., Warne, P. H., Khwaja, A., Marte, B. M., Pappin, D., Das, P., Waterfield, M. D., Ridley, A. and Downward, J.** (1997). Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell* **89**, 457-67.
- Rose, L. S. and Kempfues, K. J.** (1998). Early patterning of the C. elegans embryo. *Annu Rev Genet* **32**, 521-45.
- Sabry, J., O'Connor, T. P. and Kirschner, M. W.** (1995). Axonal transport of tubulin in T11 pioneer neurons in situ. *Neuron* **14**, 1247-56.
- Sadler, P. L. and Shakes, D. C.** (2000). Anucleate Caenorhabditis elegans sperm can crawl, fertilize oocytes and direct anterior-posterior polarization of the 1-cell embryo. *Development* **127**, 355-66.
- 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 [see comments]. *Curr Biol* **10**, 353-62.
- Schneider, I.** (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of Drosophila melanogaster. *J Embryol Exp Morphol* **27**, 353-65.
- Schneider S., Buchert M., Georgiev O., Catimel B., Halford M., Stacker S.A., Baechi T., Moelling K. und Hovens C.M.** (1999). Mutagenesis and selection of PDZ domains that bind new protein targets. *Nat Biotechnol* **17**, 170-175

- Schober, M., Schaefer, M. and Knoblich, J. A.** (1999). Bazooka recruits Inscuteable to orient asymmetric cell divisions in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* **402**, 548-51.
- Scott, P. H., Brunn, G. J., Kohn, A. D., Roth, R. A. and Lawrence, J. C., Jr.** (1998). Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7772-7.
- Shen, C. P., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1997a). Miranda is required for the asymmetric localization of Prospero during mitosis in *Drosophila*. *Cell* **90**, 449-58.
- Shen, C. P., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1997b). Miranda is required for the asymmetric localization of Prospero during mitosis in *Drosophila*. *Cell* **90**, 449-58.
- 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 Staufen and Prospero during asymmetric cell division in *Drosophila*. *Genes Dev* **12**, 1837-46.
- Simpson, L. and Parsons, R.** (2001). PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res* **264**, 29-41.
- Simske, J. S., Kaech, S. M., Harp, S. A. and Kim, S. K.** (1996). LET-23 receptor localization by the cell junction protein LIN-7 during *C. elegans* vulval induction. *Cell* **85**, 195-204.
- Smith, A., Alrubaie, S., Coehlo, C., Leervers, S. J. and Ashworth, A.** (1999a). Alternative splicing of the *Drosophila* PTEN gene. *Biochim Biophys Acta* **1447**, 313-7.
- Smith, A., Smith, A., Alrubaie, S., Coehlo, C., Leervers, S. J. and Ashworth, A.** (1999b). Alternative splicing of the *Drosophila* PTEN gene. *Biochim Biophys Acta* **1447**, 313-7.
- Söllner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. and Rothman, J. E.** (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* **362**, 318-24.
- Songyang, Z., Fanning, A. S., Fu, C., Xu, J., Marfatia, S. M., Chishti, A. H., Crompton, A., Chan, A. C., Anderson, J. M. and Cantley, L. C.** (1997). Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* **275**, 73-7.
- Spana, E. P. and Doe, C. Q.** (1995). The prospero transcription factor is asymmetrically localized to the cell cortex during neuroblast mitosis in *Drosophila*. *Development* **121**, 3187-95.
- Spradling, A. C., Stern, D., Beaton, A., Rhem, E. J., Laverty, T., Mozden, N., Misra, S. and Rubin, G. M.** (1999). The Berkeley *Drosophila* Genome Project gene disruption project: Single P-element insertions mutating 25% of vital *Drosophila* genes. *Genetics* **153**, 135-77.

- Staal, S. P.** (1987). Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 5034-7.
- Steck, P. A., Pershouse, M. A., Jasser, S. A., Yung, W. K., Lin, H., Ligon, A. H., Langford, L. A., Baumgard, M. L., Hattier, T., Davis, T. et al.** (1997). Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* **15**, 356-62.
- Sulston, J. E.** (1983). Neuronal cell lineages in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **48**, 443-52.
- Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G. and Thomson, J. N.** (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **100**, 64-119.
- 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.
- Tamura, M., Gu, J., Tran, H. and Yamada, K. M.** (1999). PTEN gene and integrin signaling in cancer. *J Natl Cancer Inst* **91**, 1820-8.
- Tashiro, H., Blazes, M. S., Wu, R., Cho, K. R., Bose, S., Wang, S. I., Li, J., Parsons, R. and Ellenson, L. H.** (1997). Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *Cancer Res* **57**, 3935-40.
- Tauszig, S., Jouanguy, E., Hoffmann, J. A. and Imler, J. L.** (2000). Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10520-5.
- Tepass, U.** (1996). Crumbs, a component of the apical membrane, is required for zonula adherens formation in primary epithelia of *Drosophila*. *Dev Biol* **177**, 217-25.
- Tepass, U.** (1997). Epithelial differentiation in *Drosophila*. *Bioessays* **19**, 673-82.
- Tepass, U., Theres, C. and Knust, E.** (1990). crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of *Drosophila* epithelial cells and required for organization of epithelia. *Cell* **61**, 787-99.

- Tochio, H., Zhang, Q., Mandal, P., Li, M. and Zhang, M.** (1999). Solution structure of the extended neuronal nitric oxide synthase PDZ domain complexed with an associated peptide. *Nat Struct Biol* **6**, 417-21.
- Tsunoda, S., Sierralta, J., Sun, Y., Bodner, R., Suzuki, E., Becker, A., Socolich, M. and Zuker, C. S.** (1997). A multivalent PDZ-domain protein assembles signalling complexes in a G- protein-coupled cascade. *Nature* **388**, 243-9.
- Tyers, M. und Jorgensen, P.** (2000). Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Curr Opin Genet Dev* **10**, 54-64.
- Van der Biezen, E. A. und Jones, J. D.** (1998). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci* **23**, 454-6.
- Vemuri, B. und Singh, S. S.** (2001). Protein kinase C isozyme-specific phosphorylation of profilin. *Cell Signal* **13**, 433-9.
- Wach,A., Brachat, A., Pöhlmann, R. und Phillipsen, P.** (1994). *Yeast* **10**, 1793-1808
- Wallenfang, M. R. und Seydoux, G.** (2000). Polarization of the anterior-posterior axis of *C. elegans* is a microtubule-directed process. *Nature* **408**, 89-92.
- Watts, J. L., Etemad-Moghadam, B., Guo, S., Boyd, L., Draper, B. W., Mello, C. C., Priess, J. R. und Kemphues, K. J.** (1996a). *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., Etemad-Moghadam, B., Guo, S., Boyd, L., Draper, B. W., Mello, C. C., Priess, J. R. und Kemphues, K. J.** (1996b). *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. und Kemphues, K. J.** (2000). The *C. elegans par-4* gene encodes a putative serine-threonine kinase required for establishing embryonic asymmetry. *Development* **127**, 1467-75.
- Way, J. C., Wang, L., Run, J. Q. und Wang, A.** (1991). The *mec-3* gene contains cis-acting elements mediating positive and negative regulation in cells produced by asymmetric cell division in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* **5**, 2199-2111.
- Weber, T., Zemelman, B. V., McNew, J. A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Sollner, T. H. und Rothman, J. E.** (1998). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* **92**, 759-72.
- Wei, X. und Ellis, H. M.** (2001). Localization of the *Drosophila* MAGUK protein Polychaetoid is controlled by alternative splicing. *Mech Dev* **100**, 217-31.

- Whitham, S., Dinesh-Kumar, S. P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C. und Baker, B.** (1994). The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* **78**, 1101-15.
- Williams, M. J., Rodriguez, A., Kimbrell, D. A. und Eldon, E. D.** (1997). The 18-wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in *Drosophila* host defense. *Embo J* **16**, 6120-30.
- Willott, E., Balda, M. S., Fanning, A. S., Jameson, B., Van Itallie, C. und Anderson, J. M.** (1993). The tight junction protein ZO-1 is homologous to the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein of septate junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7834-8.
- Wodarz, A.** (2002). Establishing cell polarity in development. *Nat Cell Biol* **4**, E39-44.
- Wodarz, A., Ramrath, A., Grimm, A. und Knust, E.** (2000). *Drosophila* atypical protein kinase C associates with Bazooka and controls polarity of epithelia and neuroblasts. *J Cell Biol* **150**, 1361-74.
- Wodarz, A., Ramrath, A., Kuchinke, U. und Knust, E.** (1999). Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* **402**, 544-7.
- Woods, D. F. und Bryant, P. J.** (1991). The discs-large tumor suppressor gene of *Drosophila* encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. *Cell* **66**, 451-64.
- Woods, D. F. und Bryant, P. J.** (1993). ZO-1, DlgA and PSD-95/SAP90: homologous proteins in tight, septate and synaptic cell junctions. *Mech Dev* **44**, 85-9.
- Woods, D. F., Hough, C., Peel, D., Callaini, G. und Bryant, P. J.** (1996). Dlg protein is required for junction structure, cell polarity, and proliferation control in *Drosophila* epithelia. *J Cell Biol* **134**, 1469-82.
- Wu, S. L., Staudinger, J., Olson, E. N. und Rubin, C. S.** (1998). Structure, expression, and properties of an atypical protein kinase C (PKC3) from *Caenorhabditis elegans*. PKC3 is required for the normal progression of embryogenesis and viability of the organism. *J Biol Chem* **273**, 1130-43.
- Wu, Y., Dowbenko, D., Spencer, S., Laura, R., Lee, J., Gu, Q. und Lasky, L. A.** (2000). Interaction of the tumor suppressor PTEN/MMAC with a PDZ domain of MAGI3, a novel membrane-associated guanylate kinase. *J Biol Chem* **275**, 21477-85.
- Yamamoto, A., Guacci, V. und Koshland, D.** (1996). Pds1p, an inhibitor of anaphase in budding yeast, plays a critical role in the APC and checkpoint pathway(s). *J Cell Biol* **133**, 99-110.
- Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Suzuki, A., Sugiyama, Y., Kitamura, K., Maniwa, R., Nagai, Y., Yamashita, A., Hirose, T., Ishikawa, H. et al.** (2001). PAR-6 regulates aPKC

activity in a novel way and mediates cell-cell contact-induced formation of the epithelial junctional complex. *Genes Cells* **6**, 721-31.

Yap, A. S., Briher, W. M. and Gumbiner, B. M. (1997). Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 119-46.

Yu, F., Morin, X., Cai, Y., Yang, X. and Chia, W. (2000). Analysis of partner of inscuteable, a novel player of *Drosophila* asymmetric divisions, reveals two distinct steps in inscuteable apical localization. *Cell* **100**, 399-409.

Zahner, J. E., Harkins, H. A. and Pringle, J. R. (1996). Genetic analysis of the bipolar pattern of bud site selection in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **16**, 1857-70.

Zhang, H., Stallock, J. P., Ng, J. C., Reinhard, C. and Neufeld, T. P. (2000). Regulation of cellular growth by the *Drosophila* target of rapamycin dTOR. *Genes Dev* **14**, 2712-24.

Ziman, M., Preuss, D., Mulholland, J., O'Brien, J. M., Botstein, D. and Johnson, D. I. (1993). Subcellular localization of Cdc42p, a *Saccharomyces cerevisiae* GTP-binding protein involved in the control of cell polarity. *Mol Biol Cell* **4**, 1307-16.

VI. Abkürzungen und Anhang

2	A	Adenin
3	Amp	Ampicillin
4	AP	alkalische Phosphatase
5	APS	Ammoniumpersulfat
6	ARM	Armadillo
7	bp	Basenpaare
8	BDGP	Berkeley Drosophila Genome Project
9	C	Cytosin
10	cm	Centimeter
11	DAB	Diaminobenzidin
12	CRB	Crumbs
13	dATP	Desoxy-Adenosin-5'-triphosphat
14	dCTP	Desoxy-Cytidin-5'-triphosphat
15	dGTP	Desoxy-Guanosin-5'-triphosphat
16	DNA	Desoxyribonucleinsäure
17	DTT	Dithiothreitol
18	dTTP	Desoxy-Thymidin-5'-triphosphat
19	EDTA	Ethylendiamintetra-acetat
20	EtBr	Ethidium Bromid
21	EtOH	Ethanol
22	g	Gramm
23	G	Guanin
2	HRP	Meerrettich Peroxidase
3	ISN	Intersegmentalnerv
4	kb	Kilo-Basenpaare
5	kDa	Kilo-Dalton
6	LB	LB-Medium
7	Lsg.	Lösung
8	M	Mol
9	MeOH	Methanol
10	µg	Mikrogramm: 10 ⁻⁶ Gramm
11	µl	Mikroliter: 10 ⁻⁶ Liter
12	µm	Mikrometer: 10 ⁻⁶ Meter
13	ml	Milliliter?
14	mM	Milli-Mol
15	MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfon Säure
16	N	Normal
17	NaCl	Natrium Chlorid
18	ng	nanogramm
19	°C	Grad Celsius
20	OD	optische Dichte
21	PAA	Polyacrylamid
22	Phe	Phenylalanin
23	PX	Phox
-	RNA	Ribonucleinsäure
-	RNAse	Ribonuklease
-	RT	Raumtemperatur
-	s.	siehe
-	Ser	Serin
-	SH2	Src-Homology-Domain 2

- SH3 Src-Homology-Domain 3
- SN Segmentalnerv
- T Thymin
- TEMED Tetramethyl-Ethyldiamin
- Thr Threonin
- RT Raumtemperatur
- U Units
- u.a. unter anderem
- üN über Nacht
- u.U. unter Umständen
- Upm Umdrehungen proMinute
- UV-Licht ultraviolettes Licht
- V Volt
- Val Valin
- vgl. vergleiche
- ZA Zonula Adherens
- z.T. zum Teil

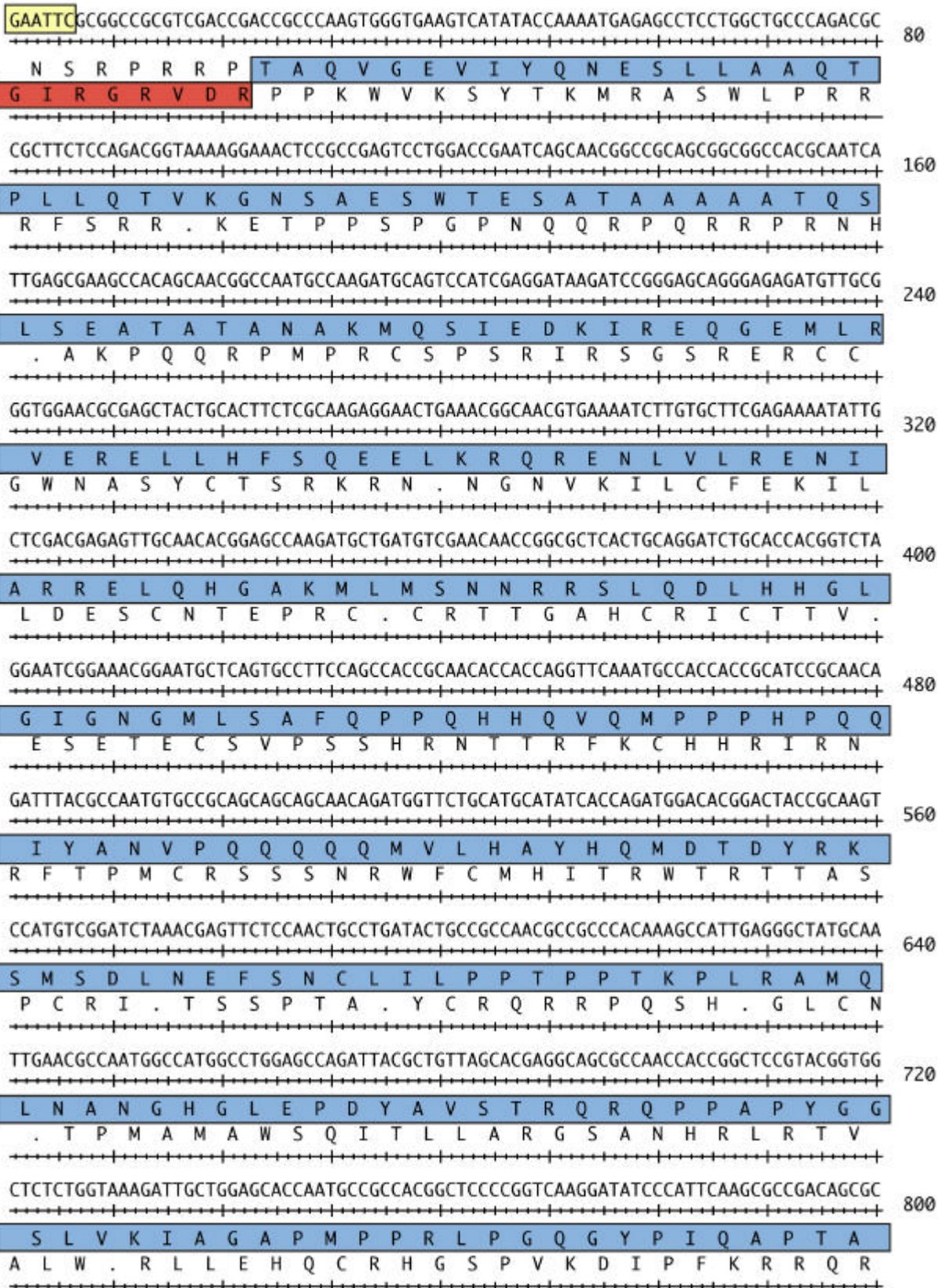
BIC7(PTEN) 5' Sequenz ab der gelb hervorgehobenen EcoRI Schnittstelle von pACT2: die zu PTEN4 gehörigen AS sind farbig hervorgehoben

GAATTCGCGGCCGCGTCGACCATAAAGACAGTGAACATAAAAGATTTTCAGAAGAATTCAAGATTTCAATCGTTTTTGAG 80
 R I R G R V D H **K D S E H K R F S E E F K I S I V F E**
 GCAGAGAATTTTAGCAATGATGTTCAAGCTGAAGCGTCCGAAAAAGAGAGAAACGAAAATGTTTTAAATTCGAAAGATC 160
A E N F S N D V Q A E A S E K E R N E N V L N F E R S
 AGACTATGACAGTTTGTCTCCAAACTGCTATGCCGAAAAAAAAGTCTTAACTGCGATCGTCAATGATAATACAACGAAAA 240
D Y D S L S P N C Y A E K K V L T A I V N D N T T K
 GTCAACAATAGAAACGTTGGATCATAAGGATATAGTTACTAAAATTCAATACGACACATCAACCAATTCAAAAAACT 320
S Q T I E T L D H K D I V T K I Q Y D T S T N S K N T
 TCGACTGCGTGCAAACGCAAACAGCCTAATAGCAAAACTCTTTTACCAAGCTTGAATGATTCCACAAAAGAGGAAATAAA 400
S T A C K R K Q P N S K T L L P S L N D S T K E E I K
 ACGAAATCATATATTTAATCAACCGTCCATTAAGAAAAGTATTAATCAAATGGCAGAATAGTGAAGTTCATATCACCT 480
R N H I F N Q P S I K K T D L I K W Q N S E V H I T
 CTGACACTCGAAGTATAAACGAAAATAAGAACATCAATTAC 521
S D T R S I N E N K N I N Y

BIC7(PTEN) 3' Sequenz bis zu der XhoI Schnittstelle von pACT2, die Schnittstelle ist gelb hervorgehoben, die zu PTEN gehörigen AS in rot.

ACTCGAAGTATAAACGAAAATAAGAACATCAATTACAATTCATACATCACATGTAACAATCCTCTCCAAAATTCAACTG 80
T R S I N E N K N I N Y N S Y I T C K Q S S P K F N C
 TGGTACCGAAGATGGCGAGGAAGATTGGGAATCCGGTGAATCAACATACCTGTAATCAATGCTTATTACGGACTTATAAT 160
G T E D G E E D W E S G E S T Y L . S M L I T D L .
 TCTTGGTGATTTAGCAAAGTAATTAATAAATTGCTAAGTAATTGGCTAATCTATTCTGAATTTGTAATATACTGTATGATAT 240
 F L V I . Q S N . N C . V I G . S I R I C K Y T V . Y
 TTATTTAAGTAGTTTTAACAAATTATTTAAATAAACTCATGTACATTTTGTATTGTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAC 320
 L F K . F . Q L F . I N S C T F C I V K K K K K K K T
TCGAG 325
 R

BIC8(LIM/RING-Protein) Sequenz. Dargestellt ist der Bereich ab der gelb hervorgehobenen EcoRI Schnittstelle aus der MCS von pACT2. Die Leserasterverschiebung ist durch den Übergang von Rot nach Blau markiert



CAGCATACCATCACCAGTCGGCCAAAACCTTAAGCAATATGTCCAGAAACACATTGCTCGCTTTGAGTGCCACCCCAAA 880
 P A Y H H Q S A Q N L S N M S R N T L L A L S A T P K
 Q H T I T S R P K T . A I C P E T H C S L . V P P P N

CCAAAATACGCGGACGGATGGGTGCAGGTGCAGCAGCGGAAGATTATGACAGCCAACAGACCAGCGATGCGGCTTGGCT 960
 P K Y A D G W V Q V Q Q R K S Y D S Q Q T S D A A W L
 Q N T R T D G C R C S S G R V M T A N R P A M R L G

GGCCGCTCAGCAGCAAAAGCGCAAATCCATGCCTGACTACGGCGGAGCACTCTACAATAACAACCACTGGCTACTGCAGG 1040
 A A Q Q Q K R K S M P D Y G G A L Y N N N H W L L Q
 W P L S S K S A N P C L T T A E H S T I T T T G Y C R

AGGCGGAGCAGCGACGCATCGAGCAACTTAATCGGCGATCTATACCAGCCAGCAAGTCGATGGGCAAACCGCTGCCCGAT 1120
 E A E Q R R I E Q L N R R S I P A S K S M G K P L P D
 R R S S D A S S N L I G D L Y Q P A S R W A N R C P I

TCCATCATACAAACCTTACGGAGCGGGTCCAGAGCAAAGGAATCGGCGATCGAAAGCGCTTCGATAGCAACGGGAACTA 1200
 S I I Q T L T E R V Q S K G I G D R K R F D S N G N Y
 P S Y K L L R S G S R A K E S A I E S A S I A T G T

TAGCCAGGTAATGGCAACAACATCTACCAGCAGCAACAGCAGCAGAAGAATGTGACGAATGGCAGCAGCATCAATGGCA 1280
 S Q V N G N N I Y Q Q Q Q Q Q K N V T N G S S I N G
 I A R . M A T T S T S S N S S R R M . R M A A A S M A

ACAGCAGCCAGGGCAGGAGAAGGTGCTCAGCGTTAGTGGCAAGAAGAAGTGCTCCCATTGCGGCGACGAATTAGGTCCG 1360
 N S S Q G Q E K V L S V S G K K K C S H C G D E L G R
 T A A R G R R R C S A L V A R R S A P I A A T N . V A

GCGCTGCCATGATCATCGAATCGCTTCTGCTGTCTACCACATCAACTGCTTCAAGTGTTGCGTCTGCCACGTCAGCT 1440
 G A A M I I E S L L L F Y H I N C F K C C V C H V Q L
 A L P . S S N R F C C S T T S T A S S V A S A T S S

GGGAGATGGCCTCAATGGAACCGATGTCCGGGTGCGAAACCACAAGCTGCATTGCCAAAACCTGCTACTCCAGCGATGACG 1520
 G D G L N G T D V R V R N H K L H C Q N C Y S S D D
 W E M A S M E P M S G C E T T S C I A K T A T P A M T

GCATTAAGTTCAGCTGCGTCTAACTGAGCCCTCGCCATGGAAACGGAAGTGATTATTGAATAGAACTGGGGTTGTTGCT 1600
 G I K F S C V . L S P R H G N G S G L L N R T G V V A
 A L S S A A S N . A L A M E T E V D Y . I E L G L L L

Insertsequenz von pACT2/aPKCfull ab der gelb hervorgehobenen Smal Schnittstelle von pACT2, die zur aPKC gehörenden AS sind farbig markiert

CCCCGGGGATCTCCTCGCAAATTCTGAACGACGGCAGCAGCGTCACGTTGAGTAGCGCCAGTATGAACATGGCCAATACGC 80
 P G I S S Q I L N D G S S V T L S S A S M N M A N T

CCAATAGTATAACGGTAAAGACCGCCTACAATGGCCAGATTATCATTACCACCATCAACAAGAATATCTCATACGAGGAG 160
P N S I T V K T A Y N G Q I I I T T I N K N I S Y E E

CTGTGCTACGAGATTCGCAACATTTGTCGATTTCTCTGGATCAGCCATTTACCATCAAATGGGTAGATGAGGAAAACGA 240
L C Y E I R N I C R F P L D Q P F T I K W V D E E N D

TCCCTGCACCATATCAACGAAAATGGAATTGGACGAGGCCATACGACTTTACGAAATGAACTTCGATTCCCAGTTAGTCA 320
P C T I S T K M E L D E A I R L Y E M N F D S Q L V

TTCATGTATTTCCCAATGTTCTCAAGCGCCGGGATTGTCTTGCGATGGCGAAGATCGCAGCATCTATCGACGCGGTGCT 400
I H V F P N V P Q A P G L S C D G E D R S I Y R R G A

CGACGCTGGCGCAAGTTGTATCGCGTCAACGGACACATCTTCCAGGCCAAGCGTTTCAACCGGCGTGCTTTCTGTGCCTA 480
R R W R K L Y R V N G H I F Q A K R F N R R A F C A Y

CTGCCAGGATCGAATCTGGGGTTTGGGACGTGAGGGTTTCAAGTGCATCCAGTGCAAGCTGTTGGTGCACAAGAAGTGCC 560
C Q D R I W G L G R Q G F K C I Q C K L L V H K K C

ATAAGCTTGTGCAGAAGCACTGCACCGACCAGCCGGAGCCGCTGGTCAAGGAGCGGGCGGAGGAGTCCAGTGACCCTATA 640
H K L V Q K H C T D Q P E P L V K E R A E E S S D P I

CCGGTGCCTTTGCCGCCACTTCCCTACGAAGCGATGAGCGGGGAGCCGAAGCCTGCGAGACGCACGACCATGCGCACAT 720
P V P L P P L P Y E A M S G G A E A C E T H D H A H I

AGTGGCGCCACC GCCACCGGAGGATCCATTGGAGCCGGGCACTCAGCGCCAGTATTCGCTGAACGACTTCGAGCTGATAC 800
V A P P P P E D P L E P G T Q R Q Y S L N D F E L I

GGGTCATCGGACGCGGCAGCTATGCCAAGGTGCTAATGGTGGAGCTACGACGCACACGGCGCATCTACGCCATGAAGGTG 880
R V I G R G S Y A K V L M V E L R R T R R I Y A M K V

ATCAAGAAGGCGCTGGTCACCGACGACGAGGACATCGACTGGGTGCAAACGGAGAAGCATGTGTTTCGAGACGGCCTCGAA 960
I K K A L V T D D E D I D W V Q T E K H V F E T A S N

CCACCCGTTCTGGTCCGATTGCACTCGTGCTTCCAGACGCCCTCGCGGCTCTTCTTTGTCATCGAGTTTGTGCGCGGTG 1040
H P F L V G L H S C F Q T P S R L F F V I E F V R G

GCGATTTGATGTACCATGCAGCGGCAACGGCGGCTGCCCCGAGGAGCACGCCGTTTCTATGCAGCCGAGATCAGTTTG 1120
 G D L M Y H M Q R Q R R L P E E H A R F Y A A E I S L

GCGCTGAATTTCTTCACGAGAAGGGCATCATTTATCGCGATCTGAAGCTGGACAACGTGCTGCTGGATCACGAGGGCCA 1200
 A L N F L H E K G I I Y R D L K L D N V L L D H E G H

CATCAAGCTAACGGATTACGGCATGTGTAAGGAGGGCATTTCGACCTGGAGACACCACCTCCACATTCTGCGGTACACCCA 1280
 I K L T D Y G M C K E G I R P G D T T S T F C G T P

ATTACATTGCCCTGAGATACTGAGGGGCGAGGACTATGGCTTCTCGGTGGACTGGTGGGCACTAGGCGTCTTGCTCTAT 1360
 N Y I A P E I L R G E D Y G F S V D W W A L G V L L Y

GAGATGTTGGCCGGCGTAGTCCGTTTGATCTGGCAGGAGCCTCAGAGAATCCCGATCAGAACACTGAGGACTATCTGTT 1440
 E M L A G R S P F D L A G A S E N P D Q N T E D Y L F

CCAAGTGATCCTGGAGAAGACGATTCTGATACCACGCTCGCTGAGCGTTCGTGCGGCCTCTGTCTTAAAAGTTTCTCA 1520
 Q V I L E K T I R I P R S L S V R A A S V L K G F L

ACAAGAATCCCGCTGACCGTTTGGGCTGCCATCGGGAGTCCGCGTTCATGGATATCGTCAGCCATCCCTTCTTTAAGAAT 1600
 N K N P A D R L G C H R E S A F M D I V S H P F F K N

ATGGATTGGGAATTGCTTGAGCGCAAACAGGTCACGCCACCATTCAAGCCACGCTTAGACTCAGATCGCGACTGGCCAA 1680
 M D W E L L E R K Q V T P P F K P R L D S D R D L A N

TTTCCCGCCCGAGTTCACCGGCGAGGCCGTACAGTTGACCCCGGATGATGATCATGTCATTGACAATATCGATCAATCCG 1760
 F P P E F T G E A V Q L T P D D D H V I D N I D Q S

AGTTCGAGGGCTTTGAGTATGTAACCCCTTGCTGATGTCTCTGGAGGACTGCGTCTGACACCAGAAAGTGTGCGACTTA 1840
 E F E G F E Y V N P L L M S L E D C V . H H E V C D L

CATCCGTATAACATGCGGCTCTATGGCGAGGATTCCAGTGATTACGATTCCGTGGCTGACGATTTGAGTCTCCTGCATT 1920
 H P Y N M R L Y G E D S S D Y D S V A D D L S L L H L

VII. Zusammenfassung

Das Multi-PDZ-Domänen-Protein Bazooka (Baz) von *Drosophila melanogaster* besitzt sowohl bei der Aufrechterhaltung der Epithelpolarität, als auch bei der asymmetrischen Teilung der Neuroblasten (NB) eine Funktion. Im Epithel ist es Teil der oberhalb der Adhärenz Junctions liegenden subapikalen Zone. In dem durch Delamination einer Zelle aus dem Epithelverband entstehenden NB behält Baz seine apikale Lokalisation bei und stellt so einen der Faktoren dar, die dem sich im weiteren stammzellartig teilenden NB seine apiko-basale Polarität verleihen.

In dieser Arbeit wurden durch die Anwendung der "2-Hybrid"-Technik Interaktionspartner für die PDZ-Domänen von Baz identifiziert.

Ein Interaktionspartner ist die atypische Proteinkinase C von *D.melanogaster*. Der codierende Bereich des Gens wurde kloniert und die Interaktion mit Baz und verschiedenen anderen Komponenten eines durch Baz gebildeten Proteinkomplexes getestet. Die DaPKC zeigte eine direkte Interaktion mit den beiden C-Terminal gelegenen PDZ-Domänen von Baz. Eine sehr starke Interaktion wurde mit dem Ankyrin-Domänen enthaltenden Protein Inscuteable beobachtet.

Das DaPKC-Protein ist bereits während der Oocytenreifung mit Baz kolokalisierend und behält dies auch in Epithel und NB bei. In NB sind Baz, DaPKC und Insc Teil eines Proteinkomplexes, in dem Insc über DaPKC an Baz gebunden wird. Zu diesem Proteinkomplex gehört auch DmPar6, das sowohl an DaPKC, als auch an Baz binden kann.

Die *D.melanogaster* Form des Tumorsuppressorproteins Pten bindet im "2-Hybrid"-System an jede der 3 PDZ-Domänen von Baz. Diese Bindung ist abhängig vom PDZ-Bindemotiv am DPten C-Terminus. In WT-Embryonen von *Drosophila* konnte keine spezifische Lokalisation von DPten beobachtet werden, im Überexpressionshintergrund wird DPten jedoch in Epithel und NB zum apikalen Cytokortex hin lokalisiert und ist dort kolokalisierend mit Baz.

Die starke maternale Komponente führt zur nahezu wildtypischen Embryogenese, in Keimbahnklonen treten dagegen bereits sehr frühe Defekte auf und der Embryo kommt nicht über das Stadium des zellulären Blastoderms hinaus.

Ein weiterer "2-Hybrid"-Interaktionspartner von Baz ist Toll-7. Während die mRNA von *toll-7* bereits ab dem Stadium 5 der Embryogenese nachweisbar ist, wurde das Protein erst ab Stadium 12 detektiert. Das mRNA Verteilungsmuster und die Proteinexpression zeigen eine

starke Ähnlichkeit, vor allem in den Neuromeren der Segmente treten beide Formen auf. Während der Embryogenese wird das Toll-7 Protein im ZNS sehr stark exprimiert, ist aber in den beiden Nervensträngen, die in jedem Segment das Bauchmark verlassen, nur in jeweils einem, dem Intersegmentalnerv, vorhanden.

Eine Kolo-kalisation von Baz und Toll-7 gibt es während der Embryogenese eindeutig nicht. Es wurden jedoch deutliche Hinweise gefunden, die auf eine mögliche Funktion einer Baz-Toll-7 Interaktion spätestens ab dem 3. Larvalstadium hindeuten.

Es existieren keine Defizienzen, die den Bereich mit dem *toll-7* Gen deletieren, jedoch konnten P-Elementinsertionslinien in der Genregion gefunden und deren Insertionsort genau bestimmt werden. Mit diesen Linien werden sich Mutanten von *toll-7* erzeugen lassen.

Einer der gefundenen Interaktionspartner weist ein mRNA Expressionsmuster auf, welches sehr dem von *crumbs*, *stardust* und *bazooka* ähnelt. Es handelt sich hierbei um das Produkt des vom Berkeley Drosophila Genome Projekt vorhergesagten Gens CG18253. Die Intron-Exon Struktur des Gens wurde ermittelt. Die vorhandenen cDNAs zeigen, dass 2 verschiedene Splicevarianten gebildet werden. Eine davon führt zu einem Protein mit jeweils einer RING- und LIM-Domäne. Dieses Protein, mit einem C-Terminalem PDZ-Bindemotiv, kann an Baz binden. Die Proteinlokalisierung wurde noch nicht untersucht.

Der letzte der identifizierten Baz Bindungspartner stellt ein Homolog zum v-SNARE-Master-1 Protein aus der Hefe dar. Untersuchungen zur mRNA- und Proteinlokalisierung wurden bisher nicht durchgeführt, die Funktion des Hefehomologs lässt jedoch auf eine mögliche Rolle bei dem Aufbau und Erhalt von Epithelpolarität schließen.

Danksagung

Diese Arbeit wurde unter Anleitung von PD Andreas Wodarz am Institut für Genetik der Heinrich-Heine-Universität zu Düsseldorf angefertigt.

Ihm gilt mein ganz besonderer Dank für seine stetige Ansprechbereitschaft und dem stets wertvollen Rat, gepaart mit jeder Menge Tips und Hinweisen.

Der Leiterin des Instituts Frau Prof. Dr. Elisabeth Knust danke ich für vieles. Festgeklebt und konzentriert an ihren Arbeitsplatz, konnte man sie trotzdem jederzeit nach ihrer Meinung und um Rat befragen. Ihr gilt mein höchster Respekt.

Herrn Prof. Christian Klämbt und seinem Assistenten Jan Pielage danke ich für die Unterstützung bei der Interpretation der TOLL-7 Färbungen im Nervensystem von *Drosophila melanogaster*.

Andre Bachmann ist der, mittlerweile auch zum Doktor mutierte, letzte der "Kölner"-Doktorandenbande, der noch am genetischen Institut tätig ist, wo ich meine Arbeit begann. Sehr, sehr vielen Dank an meinen "Bruder im Geiste". Auch dem Rest der Bande (Ansgar, Thilo, und Ute) gilt mein Dank.

Alex möchte ich für die angenehme Laboratmosphäre danken, sie ist nicht nur eine sehr gute TA geworden, sondern auch ein geschätztes Mitglied bei den "Fussballern". Nur schade, dass ich ihren Musikhorizont nicht erweitern konnte. Auch mit den anderen Mitglieder des "A-Team"-Lab (Walter, Tanja, Sabine und Soja) würde ich jederzeit wieder mit Begeisterung zusammenarbeiten.

Desweiteren möchte ich mich bei Afroditi, Arno, Carin, Daniela, Diane, Eva, Elke, Ferdi, Gisela, Gudrun, Isa, Karin, Kati, Kevin, Marion, Meike, Mirjana, Nanette, Nicola, Özlem, Sabine, Sandra, Soya, Susann, Tanja, Thomas, Wiebke, Frau Daniels, Frau Harding und Frau Peydal für stetige Hilfsbereitschaft und eine gute Arbeitsatmosphäre bedanken.