

**Die Funktion des *Drosophila* Gens *bazooka* bei der
Morphogenese epithelialer Gewebe**

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

vorgelegt von
Isabel Wasserscheid
aus Krefeld

Düsseldorf, 2005

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

Tag der mündlichen Prüfung:

4. Mai 2005

Berichtersteller:

Prof. Dr. E. Knust

Prof. Dr. J. F. Ernst

1	Einleitung	2
1.1	<i>Epithelien sind funktionelle Einheiten</i>	2
1.1.1	Die Polarität epithelialer Zellen äußert sich in mehreren Eigenschaften	2
1.1.2	Zellkontakte erfüllen diverse Aufgaben	2
1.2	<i>Epithelentwicklung in Drosophila</i>	2
1.2.1	<i>Drosophila</i> besitzt primäre und sekundäre Epithelien	2
1.2.2	Zellkontakt-Strukturen und Membrandomänen in <i>Drosophila</i>	2
1.2.3	Etablierung und Aufrechterhaltung von epithelialer Polarität	2
1.2.4	Die Funktion von Baz bei Etablierung von Membranpolarität	2
1.3	<i>Die Etablierung von Gewebepolarität in Drosophila</i>	2
1.3.1	Flügel werden in <i>Drosophila</i> aus Imaginalscheiben gebildet	2
1.3.2	Das Gen <i>frizzled</i> hat bei der Ausbildung von PCP zwei Funktionen	2
1.3.3	Fz wird für die Ausbildung und die Interpretation des Signal zur Gewebepolarisierung benötigt	2
1.3.4	Die Höhe der Fz-Aktivität wird im Gewebe durch Zell-Zell-Kommunikation übermittelt	2
1.3.5	Die asymmetrische subzelluläre Lokalisation von Fz, Dsh, Fmi, Stbm, Pk und Dgo dient dem Aufbau eines intrazellulären Fz-Gradienten	2
1.3.6	Zwischen apikobasaler und planarer Polarität besteht ein funktioneller Zusammenhang	2
1.4	<i>Die Malpighischen Gefäße und ihre Entwicklung</i>	2
1.5	<i>Aufgabenstellung</i>	2
2	Material und Methoden	2
2.1	<i>Chemikalien und sonstige Materialien</i>	2
2.1.1	Bakterienstämme	2
2.1.2	Vektoren	2
2.2	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	2
2.2.1	Herstellung elektrokompenter Bakterien	2
2.2.2	Transformation elektrokompenter Zellen	2
2.2.3	Isolierung von DNA	2
2.3	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	2
2.3.1	Herstellung von Proteinlysate	2
2.3.2	<i>In vitro</i> Transkriptions-/Translationsreaktion	2
2.3.3	Herstellung eines GST-Fusionsproteins	2
2.3.4	SDS-PAGE-Gelelektrophorese und Western-blotting	2
2.3.5	GST-Pull-down	2
2.4	<i>Genetische Methoden</i>	2
2.4.1	Fliegenzucht	2
2.4.2	Fliegenstämme, Chromosomen und Allele	2
2.4.3	Das GAL4/UAS-System	2
2.5	<i>Histologische Methoden</i>	2
2.5.1	Verwendete Antikörper	2
2.5.2	Antikörperfärbung an Embryonen	2
2.5.3	Antikörperfärbungen an larvalen und pupalen Flügeln	2
2.5.4	X-Gal-Färbung an Adulten Flügeln	2
2.5.5	Präparation embryonaler Kutikula	2
2.6	<i>Mikromanipulation von Drosophila melanogaster</i>	2
2.6.1	Keimbahntransformation	2
2.6.2	RNAi (RNA-Interferenz)	2

3	Ergebnisse	2
3.1	<i>..Die Delokalisation von Bazooka ist mit Fehlern bei der konvergenten Extension der Malpighischen GefäÙe assoziiert.....</i>	2
3.1.1	Der Funktionsverlust von <i>leo</i> führt zur Delokalisation von Baz in den MG, andere Aspekte von Zellpolarität bleiben erhalten.....	2
3.1.2	In den MG von <i>leo</i> ⁻ -mutanten Embryonen sind Komponenten der ZA delokalisiert.....	2
3.1.3	Der Verlust von <i>leo</i> führt zu Morphogenesedefekten der Malpighischen GefäÙe	2
3.1.4	Zusammenfassung.....	2
3.2	<i>Unterdrückung der baz-Funktion durch RNA-Interferenz (RNAi).....</i>	2
3.2.1	In Embryonen wird durch induzierbare RNAi nur eine schwache Proteinreduktion von Baz erreicht	2
3.2.2	Die Expression von UAS <i>baz</i> ri ist in weniger als 20% der untersuchten Tiere embryonal letal und erzeugt Defekte in der späten Embryogenese.....	2
3.2.3	Durch die Reduktion von Baz mittels RNAi entstehen Defekten im adulten Flügel	2
3.2.4	Zusammenfassung	2
3.3	<i>Untersuchungen zur Funktion von Baz bei der Ausbildung von planarer Polarität.....</i>	2
3.3.1	Die Überexpression von <i>baz</i> führt zur Störung der planaren Polarität im Flügelepithel	2
3.3.2	Die Überexpression von <i>baz</i> stört die apikobasale Zellpolarität im Epithel der Flügelimaginalscheibe nicht.....	2
3.3.3	Die Überexpression von <i>baz</i> bewirkt die Delokalisierung von Flamingo in pupalen Flügeln	2
3.3.4	Baz bindet an eine Isoform von Fmi, die ein putatives PDZ-Bindemotiv besitzt.	2
3.3.5	Die Reduktion der Genfunktion verschiedener Gene führt zur Unterdrückung der durch die Überexpression von <i>baz</i> hervorgerufenen Störungen der PCP.....	2
3.3.6	Die Überexpression von <i>baz</i> führt zur Verkürzung des Flügelblatts und zu Venendefekten	2
3.3.7	Zusammenfassung.....	2
4	Diskussion.....	2
4.1	<i>Die Überexpression von baz erzeugt Störungen auf verschiedenen Ebenen der Etablierung von PCP im Flügelepithel</i>	2
4.1.1	Die Überexpression von <i>baz</i> kann Störungen in der Weiterleitung des nicht-zellautonomen Fz-Signals bewirken	2
4.1.2	Durch die Überexpression von <i>baz</i> kann der Aufbau des intrazellulären Fz-Signals gestört werden	2
4.1.3	Die Überexpression von <i>baz</i> erzeugt <i>dachsous</i> ⁻ -ähnliche Phänotypen in Morphologie und PCP ...	2
4.2	<i>Die Unterdrückung des baz-Überexpressionsphänotyps erfolgt auf verschiedenen Ebenen</i>	2
4.2.2	PCP-Komponenten steuern verschiedene morphogenetische Prozesse in <i>Drosophila</i>	2
4.3	<i>.. Die Reduktion der baz Funktion im Flügelepithel erzeugt nur leichte Defekte in der Morphogenese des Flügels</i>	2
5	Zusammenfassung	2
6	Literatur	2
7	Anhang	2

1 Einleitung

Die Entstehung komplexer Organismen erfordert die Organisation von Einzelzellen zu Gewebeverbänden. Eine Form der Gewebeorganisation ist das polar aufgebaute Epithel. Prozesse, die während der Entstehung und Aufrechterhaltung von epithelialer Zellpolarität und Zelladhäsion ablaufen, und Prozesse, die während der Morphogenese zur Umorganisation epithelialer Gewebe führen, werden intensiv an Epithelien von *Drosophila* untersucht.

1.1 Epithelien sind funktionelle Einheiten

Epithelien sind Abschlussgewebe, die sowohl äußere, als auch innere Oberflächen eines Organismus ausbilden können. Sie stellen Diffusionsbarrieren für Makromoleküle und Ionen dar und ermöglichen die Trennung von Kompartimenten, in denen unterschiedliche physiologische Bedingungen bestehen. Am basalen Pol sind Epithelien meist über Zell-Matrix-Haftverbindungen mit einer Basallamina verbunden, die Teil der extrazellulären Matrix (ECM) ist. Die apikale Oberfläche ist dem Lumen oder der Außenwelt zugewandt.

Epitheliale Gewebe weisen meist eine starke Spezialisierung in ihrer Funktion und eine darauf ausgerichtete Morphologie auf. So dient die Epidermis der Haut dem Schutz, das Darmepithel der Resorption, Drüsenepithelien dienen der Sekretion und Sinnesepithelien der Reizaufnahme.

Zwei Eigenschaften sind für die Funktion und Integrität aller Epithelien von besonderer Bedeutung. Zum einen ist die ausgeprägte apiko-basale Polarität der Einzelzellen charakteristisch. Sie spiegelt sich u. a. in der Ausbildung unterschiedlicher Membrandomänen und im polaren Aufbau des Zytoskeletts wieder. Zum anderen sichert eine Vielzahl von Zell-Zell-Kontakten die epitheliale Struktur. Die Zellkontakte dienen der Ausbildung von Diffusionsbarrieren, indem sie den Interzellularraum selektiv verschließen, und sorgen durch die enge Verbindung der Zellen für mechanische Festigkeit des Gewebes. Zwischen beiden Eigenschaften besteht bei der Etablierung und Aufrechterhaltung von epithelialer Polarität eine enge funktionelle Beziehung (Drubin and Nelson, 1996; Rodriguez-Boulan and Nelson, 1989)

1.1.1 Die Polarität epithelialer Zellen äußert sich in mehreren Eigenschaften

Die Polarität jeder einzelnen Zelle eines epithelialen Gewebeverbandes wird an verschiedenen Charakteristika des Zellaufbaus besonders deutlich. Die Plasmamembran ist in eine apikale und in eine basolaterale Membrandomäne unterteilt, die sich in ihrer Funktion und in ihrer Lipid- und Proteinzusammensetzung unterscheiden. Die apikale Membrandomäne ist nach außen oder in ein Lumen gerichtet, die basolaterale steht im Kontakt zu den benachbarten Zellen und den darunter liegenden Geweben. In Vertebraten werden diese beiden Membrandomänen durch *tight junctions* (TJ) voneinander getrennt, was die Diffusion von Membranbestandteilen zwischen apikaler und basolateraler Plasmamembran-Domäne verhindert (Matter, 2000). Die polare Verteilung von Membranproteinen in Epithelzellen wird durch den gerichteten Transport der neusynthetisierten Proteine zur entsprechenden Membrandomäne aufrechterhalten und verstärkt. Die zentrale Rolle spielt hierbei das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN). Hier werden Membranproteine und sekretierte Proteine mit Hilfe von Sortier-Signalen auf Vesikel mit apikalem oder basolateralem Zielort aufgeteilt (Matter, 2000). Die Vesikel werden entlang der polaren Mikrotubuli mit Hilfe von Motorproteinen transportiert und erreichen ihr Ziel an der Membran durch das Erkennen spezifischer Signale (Drubin and Nelson, 1996; Mays et al., 1995).

Das Zytoskelett ist in epithelialen Zellen ebenfalls polarisiert. Mikrotubuli sind in Epithelzellen apiko-basal ausgerichtet, ihre Plusenden liegen am basalen Zellpol. (Eaton and Simons, 1995; Mays et al., 1994). Sie sind nicht nur für den gerichteten Transport von Membranproteinen, sondern auch für die asymmetrische Verteilung von zytoplasmatischen Komponenten wichtig. Die Aktinfilamente sind polar organisiert und finden sich vor allem im apikalen Bereich der Zelle. Dort sind Aktinfilamentbündel mit der *zonula adherens* (ZA), einer Region verdichteter Zellkontakte, assoziiert.

Manche in Zellkontakten lokalisierte Proteine stellen Verbindung zum Aktinzytoskelett her, so z. B. in *Drosophila* das in den *adherens junctions* (AJ) lokalisierte β -Catenin Homolog Armadillo und das in den *septate junctions* (SJ) lokalisierte Protein Coracle, ein Band 4.1-Protein (Cox et al., 1996; Lamb et al., 1998). So wird zwischen Zellpolarität und Zelladhäsion eine enge funktionelle Beziehung hergestellt.

1.1.2 Zellkontakte erfüllen diverse Aufgaben

Neben ihrer Polarität ist für Epithelzellen die Ausbildung zahlreicher Zellkontakt-Strukturen charakteristisch. Einige der Zell-Zell-Kontakte vermitteln Adhäsion, andere ermöglichen Stoffaustausch oder sind an Signaltransduktionsprozessen beteiligt, die Differenzierung, Wachstum und Bewegung kontrollieren (Lopez-Schier, 2003; Tepass et al., 2002). Die Zell-Matrixkontakte stellen den Kontakt zur extrazellulären Matrix her. Die verschiedenen Zell-Zell- und Zell-Matrixkontakte der Epithelzelle können in verschiedene Klassen unterteilt werden: undurchlässige Verbindungen (*tight junctions* oder *zonula occludens*), Haftverbindungen (z.B. *zonula adherens* und Desmosomen) und kommunizierende Verbindungen (z. B. *gap junctions*).

Bei den *tight junctions* (TJ) handelt es sich um undurchlässige Verschlusskontakte, die in einem Gürtel angeordnet am Übergang zwischen apikaler und basolateraler Membrandomäne vorliegen. Die Plasmamembranen benachbarter Zellen sind in TJ eng miteinander verbunden, was die Diffusion von Membranproteinen verhindert und die Trennung von apikaler und basolateraler Membrandomäne ermöglicht. TJ verschließen den Interzellularraum selektiv für Wasser, Ionen und Makromoleküle und machen Epithelien zu Kompartimentsgrenzen (Eaton and Simons, 1995; Gumbiner, 1996).

In Haftverbindungen sind Zytoskelett-Bestandteile einer Zelle mit denen der Nachbarzelle oder mit der Extrazellulären Matrix verbunden. Zu ihnen gehören die Zell-Zell-Adhäsionskontakte, *adherens junctions* (AJ), die in Epithelien im apikalen Bereich in einem durchgehenden Gürtel unterhalb der TJ angeordnet sind und *zonula adherens* (ZA) genannt werden. Die Adhäsion benachbarter Zellen wird in AJ durch die homophile, Ca^{2+} -abhängige Interaktion von Cadherinen erreicht. Verschiedene Adaptermoleküle wie α -, β - und γ -Catenin stellen intrazellulär den Kontakt zum Aktinnetzwerk her (Aberle et al., 1996; Gumbiner, 1996). In Desmosomen, ebenfalls Haftverbindungen, vermitteln Desmogleine und Desmocolline, Mitglieder der Cadherin-Superfamilie, die Adhäsion zwischen benachbarten Zellen und stehen über Intermediärfilamente mit dem Zytoskelett der Zellen in Kontakt (Gumbiner, 1996). Der Kontakt zur ECM über Zell-Substrat-Kontakte an der basalen Plasmamembran wird über Integrine, heterodimere Transmembranrezeptoren, die in verschiedener Weise mit dem Zytoskelett in Verbindung stehen können, erreicht (Hynes, 1992). Sie können in *hemi adherens junctions* über aktinbindende Proteine wie Talin oder α -Actinin mit dem Aktinzytoskelett verbunden sein oder in Hemi-Desmosomen über

Adaptermoleküle mit den Intermediärfilamenten (Hynes, 1992). Extrazellulär sind in Desmosomen Komponenten der ECM wie Fibronektin, Vitronektin, Laminin oder Kollagen gebunden.

gap junctions (GJ) sind kommunizierende Verbindungen, die in fast allen Geweben vorkommen. Sie ermöglichen den Transport von Ionen und kleinen Molekülen von Zelle zu Zelle, was zu einer elektrophysiologischen Kopplung der verbundenen Zellen führt.

1.2 Epithelentwicklung in *Drosophila*

1.2.1 *Drosophila* besitzt primäre und sekundäre Epithelien

Das erste Epithel, das während der Embryonalentwicklung von *Drosophila* gebildet wird, ist das zelluläre Blastoderm, das durch die Zellularisierung aus dem syncycialen Blastoderm hervor geht. Als primäre Epithelien werden diejenigen bezeichnet, die ihre polare Organisation vom zellulären Blastoderm übernehmen und beibehalten. Zu ihnen zählen: die Epidermis, das tracheale System, Vorder- und Hinterdarm, die Speicheldrüsen, die Malpighischen Gefäße und die Amnioserosa. Als sekundäre Epithelien werden jene bezeichnet, die während der Entwicklung ihren epithelialen Charakter vorübergehend verloren hatten und zu einem späteren Zeitpunkt wiedererlangt haben, wie z.B. der Mitteldarm (Tepass, 1997; Tepass and Hartenstein, 1994). Sekundäre Epithelien werden aus nicht polarisierten, mesenchymalen Geweben neu gebildet.

1.2.2 Zellkontakt-Strukturen und Membrandomänen in *Drosophila*

Drosophila besitzt wie die Vertebraten GJ und AJ, Desmosomen und TJ fehlen (Abb. 1.1). Das Fehlen der Desmosomen kann durch die Abwesenheit von Intermediärfilamenten erklärt werden (Müller, 2000; Tepass, 1997). Für den Verschluss des Interzellularraumes sorgen in Arthropoden die *septate junctions* (SJ), die unterhalb der ZA in größeren Bereichen der lateralen Membran angeordnet sind (Skaer et al., 1987). GJ werden früh, ab Stadium 6 der Embryonalentwicklung, ausgebildet. Die ZA wird aus den so genannten *spot adherens junctions* (SAJ) gebildet, die schon ab Stadium 5 an der lateralen Membran zu finden sind. Die SAJ lagern sich in Stadium 6/7 an der apikalen Grenze der lateralen Membran zusammen

und werden schließlich in Stadium 11 zur ZA umgeformt. In einigen Epithelien entwickeln sich ab Stadium 14/15 über weite Bereiche der lateralen Membran die *septate junctions* (SJ). Etwa zur selben Zeit werden die ersten Zell-Substratkontakte ausgebildet (Tepass and Hartenstein, 1994).

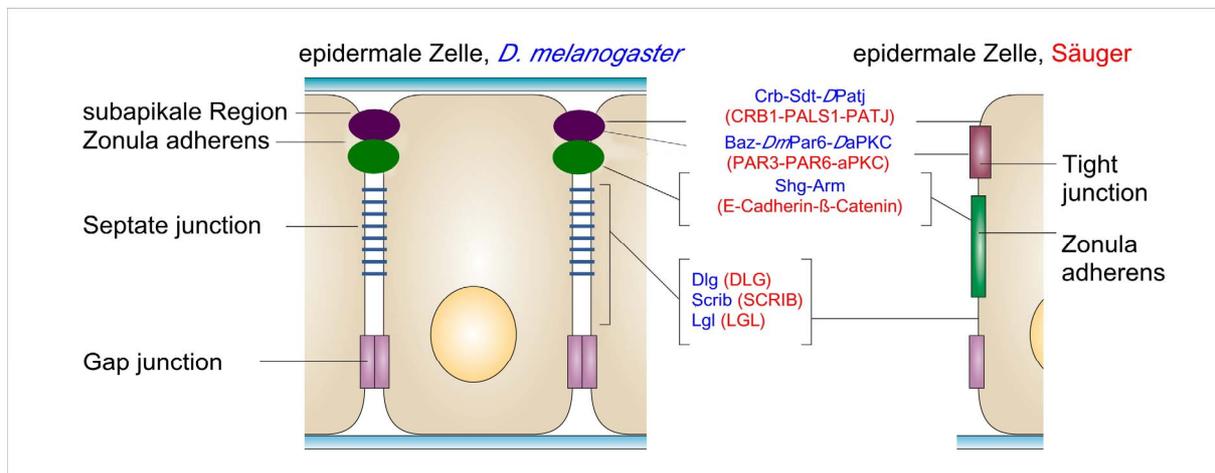


Abb. 1.1: Vergleichende schematische Darstellung einer epidermalen Zelle von *D. melanogaster* und der eines Säugers. Die eingezeichneten Proteinkomplexe sind in ihrer Zusammensetzung konserviert. Die Art der mit den Proteinkomplexen assoziierten Kontaktstrukturen ist teilweise verschieden. Verwendete Abkürzungen für die in Blau gekennzeichneten *Drosophila*-Proteine: Crb, Crumbs; Sdt, Stardust; DPatj, *Drosophila* PATJ-Homolog; Baz, Bazooka; DmPar6, *Drosophila* Par6-Homolog, DaPKC, *Drosophila*-Homolog der atypischen Proteinkinase Kinase C; Shg, Shotgun; Arm, Armadillo; Dlg, Discs large; Scrib, Scribble; Lgl, Lethal giant larvae. Die Säugerhomologe sind in Rot geschrieben. Abb. modifiziert nach (Macara, 2004b).

Die Plasmamembran epithelialer Zellen von *Drosophila* lässt sich in drei Bereiche unterteilen: die apikale Membrandomäne, die sich ihrerseits in einen apikalen und einen subapikalen Bereich, die sogenannte subapikale Region (SAR), unterteilen lässt, die Region der ZA und die basal zu ZA gelegene laterale Membrandomäne (Abb. 1.1). Jeder dieser Membranbereiche zeichnet sich durch die Präsenz bestimmter Proteinkomplexe aus (Macara, 2004a; Müller, 2000; Wodarz, 2002). In der subapikalen Region sind der Crb-Komplex und der Baz-Komplex zu finden. Im Crb-Komplex sind das Transmembranprotein Crumbs und die zytoplasmatischen Proteine Stardust (Sdt) und DPatj lokalisiert (Bachmann et al., 2001; Hong et al., 2001; Tepass and Knust, 1993; Tepass et al., 1990). Im Baz-Komplex sind neben dem Par-3-Homolog Bazooka drei weitere zytoplasmatische Proteine lokalisiert: DaPKC, CDC42 und DmPar-6, welche Homologe zu den mit den TJ in Vertebraten assoziierten Proteinen repräsentieren (Kuchinke et al., 1998; Petronczki and Knoblich, 2001; Wodarz et al., 2000). Dieser Proteinkomplex zeigt partielle Kolokalisation mit Bereichen der ZA. Im Bereich der ZA sind die Proteine DE-Cadherin (Shotgun, Shg) (Tepass et al., 1996) ,

Armadillo (Arm, β -Catenin-Homolog) (Müller and Wieschaus, 1996) und β -Heavy-Spectrin (Thomas and Kiehart, 1994) lokalisiert, des weiteren sind phosphorylierte Tyrosinreste besonders stark in der ZA angereichert. An der lateralen Membrandomäne sind neben anderen für diese Region spezifischen Proteinen die Mitglieder des Scrib-Komplex, die zytoplasmatischen Proteine Scribble (Scrib), Discs large (Dlg) und Lgl (Lethal giant larvae) lokalisiert (Bilder and Perrimon, 2000; Jacob et al., 1987; Woods and Bryant, 1991).

1.2.3 Etablierung und Aufrechterhaltung von epithelialer Polarität

Im *Drosophila* Embryo bilden sich nach Beendigung der Zellularisierung in Stadium 5 zunächst sog. *spot adherens junctions* (SAJ) entlang der lateralen Membran aus, die den Cadherin-Catenen-Komplex aus DE-Cadherin (Shotgun, Shg), D α -Catenin und D β -Catenin (Armadillo, Arm) enthalten (Grawe et al., 1996; Müller and Wieschaus, 1996; Tepass et al., 1996). Während der Gastrulation, in Stadium 6/7, lagern sich die SAJ's in Epithelien ektodermalen Ursprungs an der apikalen Grenze der lateralen Membran zusammen und werden ab Stadium 11, der Zeitpunkt ist gewebeabhängig, zur durchgehenden ZA transformiert. Für die Ausbildung der ZA ist die Unterteilung der lateralen Membran in drei Domänen Voraussetzung (Bilder and Perrimon, 2000; Tanentzapf and Tepass, 2003).

In der Region zwischen apikaler Domäne, hier lokalisieren der Baz-Komplex und der Crb-Komplex, und der durch die Lokalisation des Dlg-Komplexes gekennzeichneten lateralen Membran bildet sich die ZA aus. Der Baz-Komplex wird früh, während der Entstehung des zellulären Blastoderms, lokalisiert und initiiert die Identität der apikalen Membrandomäne. Die apikale Identität wird entlang der lateralen Membran durch den Scrib-Komplex unterdrückt. Der Crb-Komplex wird durch den Baz-Komplex ebenfalls nach apikal rekrutiert und wirkt dort reprimierend auf die Funktion des Scrib-Komplexes. Durch die Wechselwirkungen der drei Proteinkomplexe werden die apikale und die basolaterale Membrandomäne voneinander getrennt und in dem Bereich zwischen ihnen die ZA ausgebildet.

Nach diesem Modell liegt die Hauptfunktion von Baz in der anfänglichen Polarisierung des embryonalen Epithels, während seine Funktion bei der Aufrechterhaltung epithelialer Polarität stark redundant zu der von Crb und Sdt ist. So ist die Baz-Funktion in Abwesenheit von Crb und Lgl ausreichend, um die Ausbildung von Zellpolarität zu bewirken.

1.2.4 Die Funktion von Baz bei Etablierung von Membranpolarität

Das Gen *bazooka* (*baz*) ist an der Etablierung und Aufrechterhaltung epithelialer Zellpolarität und an der Ausbildung der ZA im *Drosophila* Embryo beteiligt (Harris and Peifer, 2004; Müller and Wieschaus, 1996; Tanentzapf and Tepass, 2003). Sein Funktionsverlust führt zum Zusammenbruch der Integrität der meisten embryonalen Epithelien. *baz* kodiert für ein Protein mit 1464 Aminosäuren und besitzt drei PDZ Domänen (Post synaptic density protein/Discs large/Zonula occludens protein), die der Protein-Protein-Interaktion dienen (Kuchinke et al., 1998).

Das Baz-Homolog Par-3 hat zusammen mit anderen sog. PAR-Proteinen eine Funktion bei der Etablierung distinkter kortikaler Domänen in der Zygote von *C.elegans*. Ihr Funktionsverlust führt zu Defekten bei der ersten asymmetrischen Zellteilung (partitioning defective) der Zygote (Kemphues et al., 1988). Homologe der PAR-Proteine sind in verschiedenen Organismen an Prozessen beteiligt, die zur Polarisierung von Zellen und Geweben führen, z.B. an der Polarisierung der Oozyte und der Neuroblasten in *Drosophila* oder an der Etablierung von epithelialer Polarität in Säugern (Benton and Johnston, 2003; Hurd et al., 2003; Macara, 2004a; Wodarz, 2002).

Die initialen Signale für die Segregation der PAR-Proteine sind unbekannt. Über die Rekrutierung und den Ausschluss von Proteinen zu bzw. von bestimmten Membrandomänen bewirken die PAR-Proteine in Interaktion miteinander die Etablierung polarisierter Membrandomänen. Nach einem Modell von Macara, das auf Erkenntnissen aus Versuchen an *Drosophila*, *C. elegans*, *Saccharomyces cerevisiae* und Säugerepithelzellen in Zellkultur beruht, wird zunächst der Par-3-Komplex über GTP-gebundenes Cdc42 an die apikale Membran rekrutiert. Er besteht aus zwei dimerisierten Par-3 Molekülen, Par-6 und aPKC. Nach Phosphorylierung durch die aPKC diffundiert der Komplex nach lateral. Par-3 wird an der lateralen Membran durch die Kinase Par-1 phosphoryliert, wodurch zwei Bindestellen für Par-5 geschaffen werden. Die Bindung des zur Familie der 14-3-3-Proteine gehörenden Proteins führt zur Auflösung der Dimerstruktur von Par-3, was die Lösung des Komplexes von der lateralen Membran bewirkt. Par-1 kann ebenfalls phosphoryliert werden und dann an 14-3-3 binden. Das dient möglicherweise dazu, die Lokalisation von Par-1 an der apikalen Membran zu verhindern, damit es dort nicht zu der Phosphorylierung von Par-3 kommt (Macara, 2004a). Die Notwendigkeit der ausschließlich apikalen Lokalisation des Par-3-Homologs Baz für die Etablierung von Zellpolarität konnte bereits für verschiedene Zelltypen

in *Drosophila* gezeigt werden. So zeigen *par-1*- und *leonardo*- (*leo*, Par-5) Mutanten in *Drosophila* eine fehlende Polarisierung der Oozyte und des anliegenden Follikelepithels, was auf dem Verlust der Zellpolarität beruht, der durch die fehlende apikale Restriktion von Baz, hervorgerufen wird (Benton and Johnston, 2003; Benton and St Johnston, 2003).

1.3 Die Etablierung von Gewebepolarität in *Drosophila*

Viele Epithelien, in Vertebraten und Invertebraten, sind entlang ihrer proximal-distal-Achse, die senkrecht zur apikal-basal-Achse verläuft, polarisiert (Adler, 2002; Keller, 2002; Strutt, 2003). Diese auch als planare Zellpolarität (PCP/engl.: planar cell polarity) bezeichnete Gewebepolarität drückt sich in *Drosophila* u. a. in der distalen Orientierung der Flügelhaare, der posterioren Orientierung der Körperborsten und der regelmäßigen Anordnung der Ommatidien im Komplexauge aus (Adler, 2002; Mlodzik, 2002; Strutt, 2003).

1.3.1 Flügel werden in *Drosophila* aus Imaginalscheiben gebildet

In *Drosophila* werden zahlreiche adulte Strukturen, so auch die Körperanhänge wie z. B. Beine, Flügel und Antennen, bereits im Embryo in Form von Imaginalscheiben angelegt. Die Flügelanlage entsteht aus ca. 20 Zellen, die in Stadium 11 spezifiziert und aus der Epidermis ausgegliedert werden. Die Zellen kommen als sackartige Einstülpung in Form der Imaginalscheibe unter der Epidermis zu liegen und proliferieren während der larvalen Entwicklung. In der pupalen Entwicklung differenzieren die Zellen und bilden schließlich den adulten Flügel aus (Abb. 1.2, a).

1.3.2 Das Gen *frizzled* hat bei der Ausbildung von PCP zwei Funktionen

Als Schlüsselgen für die Ausbildung von Gewebepolarität gilt das Gen *frizzled* (*fz*). Im Wildtyp bildet jede Zelle des pupalen Flügelepithels ein Haar an der apikalen Oberfläche aus, das an der distalen Zellgrenze entspringt und nach distal gerichtet ist. Der Verlust der *fz*-Funktion führt dazu, dass die Flügelhaare in der Mitte der apikalen Oberfläche entspringen und ihre Ausrichtung entlang der proximal-distal-Achse des Flügels nicht erfolgt.

Es wird angenommen, dass der von *fz* kodierte Rezeptor an aufeinander folgenden Prozessen, die der Gewebe- und der Zellpolarisierung dienen, beteiligt ist (Ma et al., 2003; Strutt and Strutt, 2002). Die durch den Fz-Rezeptor vermittelte Signaltransduktion verläuft bei der Ausbildung von PCP über den sog. „non-canonical“-Signalweg, in dem im Gegensatz zum „canonical“-Signalweg die Signaltransduktion nicht über β -Catenin verläuft. Der Ligand des Fz-Rezeptors konnte für diesen Signalweg in *Drosophila* bisher nicht identifiziert werden.

1.3.3 Fz wird für die Ausbildung und die Interpretation des Signal zur Gewebepolarisierung benötigt

Die Polarisierung des gesamten Epithels erfolgt durch einen Morphogengradienten oder ein anderes weitreichendes Signal (Adler et al., 1997; Ma et al., 2003; Strutt and Strutt, 2002). Die Natur dieses Signals ist bisher unbekannt, aber man weiß, dass an seiner Ausbildung neben *fz* die Gene *ft*, *ds* und *fj* beteiligt (Fanto and McNeill, 2004; Ma et al., 2003; Strutt and Strutt, 2002). Man nimmt an, dass es zwischen den atypischen Cadherinen Fat (Ft) und Dachous (Ds) an den Zellgrenzen der pupalen Flügelepithelzellen zur Ausbildung von Heterodimeren kommt, die von FJ reguliert wird (Ma et al., 2003). Ein von proximal nach distal verlaufender FJ-Gradient und ein von proximal nach distal verlaufender Ds-Gradient beeinflussen zusammen die Lokalisation von Ft. Es wird vermutet, dass Ft auf zellulärer Ebene an der Vermittlung des globalen Polarisierungssignals beteiligt ist (Ma et al., 2003). Das Polarisierungssignal wird durch den Fz-Rezeptor interpretiert. Die Stärke des Signals wird in jeder Zelle durch die Fz-Aktivität ausgedrückt (Adler et al., 1997). Das führt dazu, dass die Fz-Aktivität in den proximalsten Zellen des Flügelepithels am höchsten ist, von Zelle zu Zelle abnimmt und in den distalsten Zellen am niedrigsten ist. Die Ausrichtung der Flügelhaare erfolgt nun in Richtung der Zellen, die eine niedrigere Fz-Aktivität besitzen, also nach distal (Adler et al., 1997).

Ds und Ft sind in den Zellen des pupalen Flügelepithels apikal zur ZA lokalisiert, jedoch nicht asymmetrisch verteilt. Ft, Ds und Fj haben eine weitere Funktion, die in früheren Stadien der Flügelentwicklung das Flügelwachstum kontrolliert. Die Beziehung zwischen dieser Funktion und der bei der Koordination von Gewebepolarität ist unklar (Fanto and McNeill, 2004).

1.3.4 Die Höhe der Fz-Aktivität wird im Gewebe durch Zell-Zell-Kommunikation übermittelt

Die Information über die Höhe der Aktivität des Fz-Rezeptors wird über Zell-Zell-Kommunikation im Gewebe übermittelt. Der Verlust der *fz*-Funktion führt deshalb zu nicht-autonomen Defekten der PCP (Adler et al., 1997; Vinson and Adler, 1987). So beeinflussen *fz*-mutante Zellklone nicht nur die Ausrichtung der Haare in wildtypischen Zellen, die direkt an den Klon angrenzen. Die Ausrichtung der Flügelhaare zum Klon, also zur niedrigen Fz-Aktivität hin, erfolgt auf der distalen Seite des Klons auch noch 4-5 Zellen in den wildtypischen Bereich hinein (Gubb and Garcia-Bellido, 1982; Vinson and Adler, 1987).

Dieser nicht-zellautonome Effekt bei Verlust der *fz*-Funktion entsteht nicht bei gleichzeitigem Funktionsverlust von *flamingo* (*fmi*, auch bezeichnet als *starry night*, *stan*), das für einen Transmembranrezeptor kodiert (Chae et al., 1999). Es wird daher angenommen, dass *Fmi* für die Zell-Zell-Kommunikation, die der Übermittlung der Information über die Höhe der intrazellulären Fz-Aktivität zwischen den Zellen des Gewebes dient, benötigt wird. (Lu et al., 1999; Strutt and Strutt, 2002; Usui et al., 1999). Die Kommunikation erfolgt durch die Ausbildung von *Fmi*-Homodimeren zwischen den distalen und proximalen Zellgrenzen benachbarter Zellen. Die Unterschiede in der Fz-Aktivität der aneinander grenzenden Zellen fördern die Ausbildung der Homodimere an den Zellkontaktstellen (Usui et al., 1999). Bei Verlust der Genfunktion von *prickle* (*pk*) und *stbm* (*stbm*, auch bezeichnet als *Van Gogh*, *Vang*) können ebenfalls nicht-zellautonome Defekte beobachtet werden, weshalb angenommen wird, dass auch diese Gene an Gewebepolarisierung durch Zellkommunikation beteiligt sind (Adler et al., 2000; Gubb and Garcia-Bellido, 1982; Gubb et al., 1999; Taylor et al., 1998)

1.3.5 Die asymmetrische subzelluläre Lokalisation von Fz, Dsh, Fmi, Stbm, Pk und Dgo dient dem Aufbau eines intrazellulären Fz-Gradienten

Die als Hauptkomponenten für PCP bezeichneten Proteinen interagieren bei der Polarisierung der einzelnen Zellen des Flügelepithels (Strutt, 2003). Zu ihnen zählen neben Fz die Transmembranproteine Strabismus (*Stbm*) und Flamingo (*Fmi*) und die zyttoplasmatischen Proteinen Prickle (*Pk*), Dishevelled (*Dsh*) und Diego (*Dgo*). Diese Proteine sind in

Multiproteinkomplexen organisiert und werden während der pupalen Flügelentwicklung subzellulär asymmetrisch lokalisiert (Abb. 1.2, b). Fmi und Dgo akkumulieren sowohl an den distalen als auch an den proximalen Zellgrenzen. Stbm und Pk werden an der proximalen Membran, Fz und Dsh an der distalen Membran lokalisiert (Axelrod, 2001; Bastock et al., 2003; Das et al., 2002; Feiguin et al., 2001; Rawls and Wolff, 2003; Shimada et al., 2001; Strutt et al., 2002; Strutt, 2001; Tree et al., 2002; Usui et al., 1999). Der Funktionsverlust jedes einzelnen der Gene *dsh*, *stbm*, *fmi*, *pk* und *dgo* führt zu ähnlichen Defekten der planaren Polarität (Wong and Adler, 1993).

Die asymmetrische Lokalisation der Hauptkomponenten ist die Voraussetzung für die distale Lokalisation des Fz-Rezeptors und für die Ausbildung eines intrazellulären Fz-Gradienten (Strutt, 2001). Am distalen Kortex, dem Ort der höchsten Fz-Aktivität, fördert die Signaltransduktion über Fz die Aktinakkumulation und initiiert die Ausbildung des Flügelhaares (Krasnow and Adler, 1994; Wong and Adler, 1993). Am Aufbau des intrazellulären Fz-Gradienten spielt neben einem durch Dsh und Pk vermittelten „feedback-loop“ die Rekrutierung und Stabilisierung von Fz durch Fmi eine wichtige Rolle (Strutt, 2001; Tree et al., 2002; Usui et al., 1999). Nach einem Modell von Strutt bestehen zunächst nur Unterschiede in der Fz-Aktivität zwischen benachbarten Zellen als Folge des Signals zur Gewebepolarisierung. Zu dieser Zeit ist der Fz-Rezeptor an der gesamten lateralen Membran lokalisiert. Fmi-Homodimere werden nun an den apikalen proximalen und distalen Grenzen benachbarter Zellen mit unterschiedlich hoher Fz-Aktivität ausgebildet. Fz wird dann durch Fmi an die apikale Membran rekrutiert, jedoch nur an den distalen Zellgrenzen stabilisiert. Das führt zu einer leichten Erhöhung der distalen Fz-Aktivitätsdichte, was die Lokalisation weiterer Fmi Moleküle begünstigt und somit die Rekrutierung von Fz zum distalen Zellkortex fördert, während in den angrenzenden Zellen am proximalen Zellkortex nur Fmi lokalisiert wird. So werden anfänglich kleine Unterschiede der Fz-Aktivität in der Zelle verstärkt und ein intrazellulärer Fz-Gradient ausgebildet (Strutt, 2001).

Voraussetzung für die asymmetrische Verteilung von Fz und der anderen PCP-Komponenten ist ihre apikale Lokalisation. Es konnte gezeigt werden, dass Fmi für die Rekrutierung von Fz und Stbm in den Membranbereich der AJ verantwortlich ist und so vermutlich indirekt auch die zytoplasmatischen Proteine Pk, Dgo und Dsh apikal lokalisiert werden (Bastock et al., 2003; Strutt, 2001). Wie die Proteine letztlich auf den proximalen und den distalen Zellkortex aufgeteilt werden ist unklar, es wird aber vermutet, dass die Umverteilung eine Antwort auf das Signal zur Gewebepolarisierung ist (Strutt, 2003).

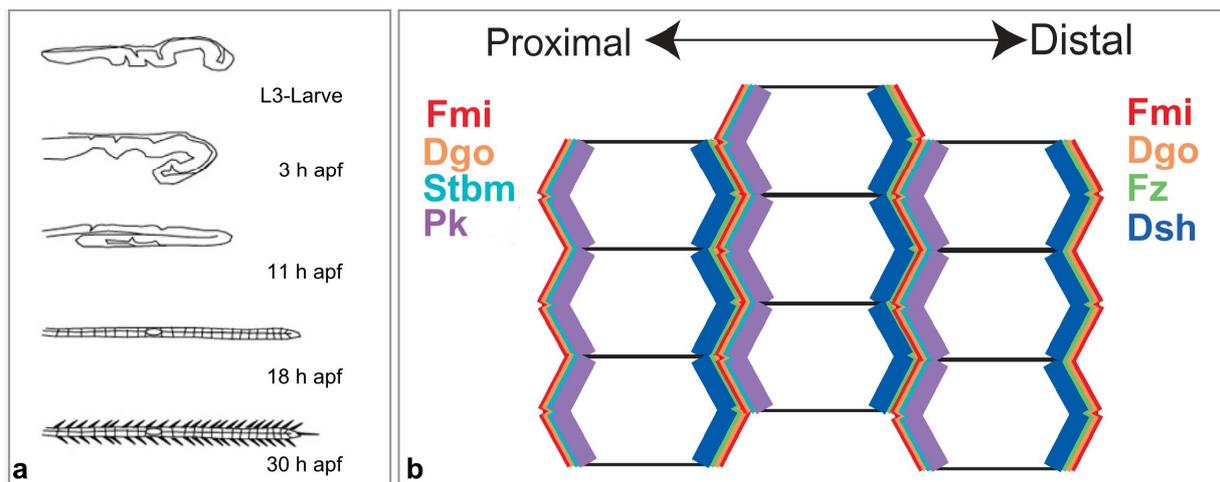


Abb 1.2: Flügelentwicklung in *Drosophila*. a Schematische Darstellung der Entwicklung eines Flügels aus einer Imaginalscheibe. b Die Ausbildung der planaren Polarität beginnt ca. 26 Stunden nach Ausbildung der Puppe (apf/ after pupae formation) und geht mit der proximo-distalen Umverteilung der als „Hauptkomponenten“ bezeichneten Proteine einher (Abkürzungen: Fmi, Flamingo; Dgo, Diego; Stbm, Strabismus; Pk, Prickle; Fz, Frizzled; Dsh, Dishevelled). Abb. modifiziert nach a: (Eaton, 2003) und b: (Fanto and McNeill, 2004)

1.3.6 Zwischen apikobasaler und planarer Polarität besteht ein funktioneller Zusammenhang

Die apikobasale Polarität eines Epithels gilt als Grundvoraussetzung für seine planare Polarisierung, da alle an der Ausbildung von planarer Zellpolarität beteiligten Proteine apikal lokalisiert sind. Die Kolokalisation der PCP-Komponenten mit Proteinen der ZA und der subapikalen Region macht zudem molekulare Interaktionen möglich. Die direkte Interaktion von Stbm und Dlg konnte im *Drosophila* Embryo bei der Zellularisierung gezeigt werden (Lee et al., 2003). Eine funktionelle Beziehung zwischen Komponenten der PCP und am Aufbau von apikobasaler Zellpolarität beteiligten Proteinen besteht auch bei der asymmetrischen Teilung der Vorläuferzellen, aus denen die sensorischen Organe auf dem Notum hervorgehen. Hier werden Pk, Stbm für die Lokalisation von Dlg am anterioren Zellkortex, Fz/Dsh für die Lokalisation des Baz-Komplexes am posterioren Kortex benötigt (Bellaiche et al., 2001; Roegiers et al., 2001). In Vertebraten sind Homologe der PCP-Determinanten in einem Fz/Dsh-Signalweg angeordnet, der die Polarisierung von Zellen während der Gastrulation bewirkt. Im Zuge der Gastrulation kommt es zur konvergenten Extension, die als Ausdruck planarer Polarität angesehen werden kann, da die Zellen in der Ebene des gastrulierenden Gewebes polarisiert sind (Keller et al., 2000). In *Drosophila* sind

die die PCP-Komponenten bei der Polarisierung der lateralen Epidermiszellen beim dorsalen Schluss des Embryos beteiligt, einem Prozess, an dem u. a. auch das apikal lokalisierte Crumbs (Crb)-Protein beteiligt ist (Harden et al., 2002; Kaltschmidt et al., 2002).

1.4 Die Malpighischen Gefäße und ihre Entwicklung

Die Malpighischen Gefäße (MG) der Insekten sind das funktionelle Analog zu den Nieren der Vertebraten und dienen der Exkretion von Stickstoff. Sie bestehen aus vier langen Schläuchen, die aus einem einschichtigen Epithel aufgebaut sind und paarig angeordnet in der Leibeshöhle liegen. Das anteriore und das posteriore Paar mündet je in einen gemeinsamen Urether, der an der Grenze zwischen Mittel- und Hinterdarm in den Verdauungstrakt führt.

Die Entwicklung verläuft in gut definierten Stadien, in denen unterschiedliche Prozesse im Vordergrund stehen. Sie beginnt mit der Determination des Primordiums im Stadium des syncycialen Blastoderms (Stadium 5), also vor der Zellularisierung, am posterioren Ende des Embryos (Hoch et al., 1994; Liu et al., 1999; Skaer, 1993). Bei der anschließenden Zellularisierung des Embryos wird das erste Epithel, das zelluläre Blastoderm, ausgebildet, das Primordium der MG wird somit Teil dieses Zellverbandes. Durch den Prozess der Keimstreifausstreckung (Stadium 7-10) werden die als Primordium spezifizierten Zellen nach dorsal verlagert und senken sich im Verlauf der amnioproctodealen Invagination (Stadium 10) ins Innere des Embryos ab. Die eingelagerte Region wird als Proctodeum bezeichnet, sie ist die gemeinsame Anlage der MG und des Hinterdarms. In dem als Evagination bezeichneten Prozess werden dann Zellen in die vier Anlagen der MG rekrutiert (Liu et al., 1999). Die Rekrutierung von Zellen wird während Stadium 12 abgeschlossen. Die Extension beginnt überlappend zu diesem Prozess mit der Proliferation der bereits eingewanderten Zellen. Sie ist das Zusammenspiel von Proliferation und einer Formveränderung der MG (Liu et al., 1999). Die Proliferation wird von der sog. *tip cell* kontrolliert, die an der Spitze jedem der vier Schläuche aufsitzt. Sie geht in Stadium 11 durch laterale Inhibition aus einer Gruppe von Zellen hervor, denen die Expression proneuraler Gene gemeinsam ist. Sie beeinflusst die Proliferation durch die Aktivierung des EGF-Rezeptors in den Zellen des Primordiums (Baumann and Skaer, 1993; Kerber et al., 1998). Nach Abschluss der Zellteilungen in Stadium 14 erfolgt der wenig verstandene Prozess der konvergenten Extension (engl.: convergent extension). Hierbei „gleiten“ die Zellen aneinander vorbei und die MG erreichen durch diese Art der Elongation am Ende der Embryonalentwicklung ihre endgültige Größe

und Gestalt. Nach Abschluss der Elongation bilden zwei Zellen den Umfang der MG, zu Beginn sind es acht (Baumann and Skaer, 1993; Liu et al., 1999). Für Vorgabe der Richtung bei der konvergenten Extension wird der Austausch von Signalen zwischen den Zellen der MG und Zellen angrenzender Gewebe angenommen (Liu et al., 1999). Eine Regulation der Zelladhäsion ist bei diesem Prozess ebenfalls anzunehmen, da die Zellen ihre Position zueinander verändern müssen. Der PCP-Signalweg steuert die Umorganisation des Aktin- und des Mikrotubulizytoskeletts in vielen verschiedenen Prozessen, z. B. die Polarisierung und Elongation von Zellen und die Ausbildung von Zellfortsätzen zur Interkalation von Zellen. Denkbar ist, dass auch die Zellformveränderungen und Interkalation von Zellen bei der konvergenten Extension der MG von PCP-Komponenten abhängig sind.

Zygotische *bazooka*⁻-Mutanten zeigen Morphogenesedefekte in der späten Entwicklung der Malpighischen Gefäße. Determination, Evagination, Extension verlaufen weitgehend wildtypisch (Wasserscheid, 2001). Der Funktionsverlust von *baz* führt zur fehlerhaften Positionierung und zu Gestaltänderungen der Malpighischen Gefäße, die auf die Existenz nicht elongierter Abschnitte neben elongierten Abschnitten zurückzuführen sind und somit auf Defekte in der konvergenten Extension hinweisen. Da in diesen Mutanten die Zellpolarität der MG korrekt ausgebildet ist, stellt sich die Frage, ob Baz eine direkte Rolle bei der konvergenten Extension spielt und ob seine apikale Lokalisation dafür wichtig ist.

1.5 Aufgabenstellung

Baz ist an der Etablierung und Aufrechterhaltung von epithelialer Zellpolarität in *Drosophila* beteiligt (Kuchinke et al., 1998; Müller and Wieschaus, 1996; Tanentzapf and Tepass, 2003). Seine Funktion bei der Abgrenzung distinkter Membrandomänen, die zur Entstehung von polarisierter Zellen führt und im späteren Leben der Zelle zur Aufrechterhaltung ihrer Polarität dient, ist hoch konserviert und gut untersucht (Macara, 2004a). Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass Bazooka neben dieser Funktion noch die der Modulation des polaren Phänotyps, mit dem Ziel morphogenetische Prozesse zu verwirklichen, hat (Bellaïche et al., 2001; Roegiers et al., 2001; Zallen and Wieschaus, 2004). Ziel dieser Arbeit ist es, weitere Zusammenhänge zwischen der von *baz* vermittelten Zellpolarität und morphogenetischen Prozessen aufzudecken. Die Funktion von *baz* wird hierfür bei der Entwicklung der konvergenten Extension der Malpighischen Gefäße und bei der Ausbildung von planarer Zellpolarität des Flügelepithels untersucht.

2 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 Bidest-H₂O angesetzt und autoklaviert oder, falls dies nicht möglich war, sterilfiltriert.

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

Kitsysteme:

- Jetstar Plasmid Midi Kit, *Genomed*, Bad Oeynhausen
- Jetquick Gel Extraction Spin Kit, *Genomed*, Bad Oeynhausen
- Qiagen Plasmid Midi Kit, *Qiagen*, Hilden
- Nucleobond AX, *Macherey-Nagel*, Düren
- High Pure PCR Product Purification Kit, *Boehringer/Roche Diagnostics*, Mannheim
- TOPO TA Cloning Kit, *Invitrogen*, Groningen, Niederlande
- TNT Coupled Reticulocyte Lysate Systems/Transcend Non-Radioactive Translation Detection System (*Promega*, Madison, USA)

Fotoarbeiten und Bildverarbeitung:

- Photolichtmikroskop: Zeiss Axiophot 2, *Zeiss*, Oberkochen
- konfokales Mikroskop: Leica TCS NT, *Leica*, Heidelberg
- Computersystem: Macintosh iBook, *Apple*, Ismaning
- Bildverarbeitung: Adobe Photoshop, *Adobe Systems*, San Jose, USA
Canvas 6, *Deneba Systems*, Miami, USA

2.1.1 Bakterienstämme

Bezeichnung	Verwendungszweck	Anmerkung
<i>E. coli</i> DH5 α	Standardwirt für diverse Plasmide	Tetrazyklin-Resistenz
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'	Standardwirt für diverse Plasmide	-
<i>E. coli</i> BL21	Standardwirt zur Herstellung von GST-Fusionsproteinen	-
<i>E. coli</i> „Sure“ „Stop unwanted rearrangement events“	Wurde zur Herstellung des RNAi-Konstruktes verwendet	Kanamycin und Tetracyclin-Resistenz

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

2.1.2 Vektoren

- pBluescript KS+/SK+: Vektor für Subklonierung, Sequenzierung, *in vitro*-Transkription (Stratagene, Heidelberg)
- pGEX: Vektor zur Erzeugung von GST-Fusionsproteinen in *E. coli* (Smith and Johnson, 1988); (*Amersham Pharmacia Biotech*, Buckinghamshire, England)
- pUChs π Δ 2-3: „Turbo-Helper“-Plasmid zur Transformation von *Drosophila*, Transposasequelle (Laski et al., 1986)
- pUAS: Vektor zur Herstellung von UAS-Effektorlinien in *Drosophila* (Brand and Perrimon, 1993)
- pGBT9: Hefe-Expressionsvektor zur Herstellung von Fusionsproteinen mit der DNA-Bindungsdomäne von GAL4 (*Clontech*, Heidelberg)
- pGBKT7: Hefe-Expressionsvektor zur Herstellung von Fusionsproteinen mit der DNA-Bindungsdomäne von GAL4, Verwendung für *in vitro*-Transkription (*Clontech*, Heidelberg)

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.

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des Jetquick Gel Extraction Spin Kit der Firma *Genomed*, Bad Oeynhausen, nach Angaben des Herstellers. DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma *Agowa*, Berlin durchgeführt.

2.2.1 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

(Hanahan et al., 1991)

- Animpfen von 50 ml SOB -Mg²⁺ mit einer frischen Bakterien-Einzelkolonie (bei *E. coli* XL1-blue-Zellen 12,5 µg/ml Tetrazyklin hinzufügen) und ü.N. bei 37 °C, im Schüttler inkubieren
- 500 ml vorgewärmtes SOB -Mg²⁺ ohne Antibiotikum mit 7,5 ml der ü.N.-Kultur animpfen und bei 37 °C, 150 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 wachsen lassen
- ! alle weiteren Arbeitsschritte müssen auf Eis/im Kühlraum erfolgen !
- überführen in vorgekühlte Zentrifugenbecher und 15 min auf Eis inkubieren
- 15 min bei 4 °C, 4000 rpm zentrifugieren, Überstand vorsichtig abgießen
- Pellet vollständig in 500 ml kaltem 10 % Glyzerin resuspendieren
- nochmals 15 min bei 4 °C, 4000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Pellet erneut in 500 ml kaltem 10 % Glyzerin resuspendieren
- nochmals 15 min bei 4 °C, 4000 rpm zentrifugieren
- Überstand vollständig entfernen und Pellet in 1,5 ml kaltem 10 % Glyzerin resuspendieren
- Aliquots à 50 µl in Eppendorf-Gefäße überführen, in flüssigem Stickstoff schockgefrieren und bei -70°C lagern (frühestens 1h nach Herstellung verwenden)

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

Lösungen:

- SOB - Mg^{2+} : 2 % Bactotrypton, 0,5 % Bactoyeast, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl

2.2.2 Transformation elektrokompetenter Zellen

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

- Ligation 1:5 bis 1:10, Mini/Midi 1:50 bis 1:100 in H_2O verdünnen
- auf Eis $1 \mu\text{l}$ der DNA-Lösung zu $50 \mu\text{l}$ kompetenten Zellen geben, mischen und in vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettieren
- Elektroporation durchführen, die Bakteriensuspension mit $450 \mu\text{l}$ SOC auffüllen und in ein Eppendorf-Gefäß überführen
- 1 h bei 37°C inkubieren
- eine geeignete Menge auf eine LB_{amp} -Agarplatte ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin) ausstreichen und ü.N. bei 37°C inkubieren

Lösungen:

- SOC: 2 % Bactotrypton, 0,5 % Bactoyeast, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM MgSO_4 , 20 mM Glucose
- LB: 1 % Bactotrypton, 0,5 % Bactoyeast, 1 % NaCl
- LB-Agar: 6,3 g Agar/300 ml LB
- Ampicillin: 100 mg/ml Stammlösung in H_2O

2.2.3 Isolierung von DNA

2.2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA

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

- 1 ml einer ü.N.-Kultur für 2 min bei 13000 rpm abzentrifugieren
- Pellet in 150 µl P1 resuspendieren
- 150 µl P2 zusetzen, invertieren
- 5 min bei RT inkubieren
- 150 µl P3 zusetzen, invertieren
- 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren, Überstand in frisches Eppendorf-Gefäß überführen und mit 300 µl Isopropanol fällen
- 20 min bei 13000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet mit kaltem 70 % Ethanol waschen und 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Pellet lufttrocknen und in 20 µl TE aufnehmen

Lösungen:

- P1: 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNaseA, gelagert bei 4 °C
- P2: 200 mM NaOH; 1 % SDS
- P3: 3,0 M Kaliumacetat pH 5,5
- TE: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

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.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Herstellung von Proteinlysaten

2.3.1.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Embryonen

- Embryonen dechorionisieren und waschen
- 100 µl Embryonen im Eppendorf-Gefäß in flüssigem Stickstoff kurz frieren
- Embryonen mit 500 µl Lysis-Puffer versetzen
- auf Eis homogenisieren (Bio-Votexer, *Biospec Products*, Bartlesville, USA)
- 30 min auf Eis inkubieren
- 30 min bei 13000 rpm, 4 °C, zentrifugieren
- mittlere Phase abnehmen und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführen
- 3 x 15 min zentrifugieren und jeweils die mittlere Phase in ein neues Eppendorf-Gefäß überführen
- Proteinbestimmung durchführen: 800 µl H₂O + 200 µl RotiQuant (*Roth*, Karlsruhe) + 2 µl Embryonenlysat mischen und die OD₆₀₀ bestimmen. Eine OD₆₀₀ von 0,1 entspricht ca. 1 mg/ml Gesamtprotein
- Embryonenlysat bei -70 °C lagern

2.3.1.2 Herstellung von Proteinlysaten aus Puppen

- Puppen mit PBS von den Wänden der Zuchtgefäße ablösen und in einen Mörser geben
- Puppen mit flüssigem Stickstoff übergießen und im Mörser zerkleinern
- In mehreren Schritten zu Pulver zermahlen.
Ständig durch Übergießen mit flüssigem Stickstoff gefroren halten!
- Je 300 µl Pulver im Eppendorfgefäß mit 500 µl Lysis Puffer versetzen
- 30 min auf Eis inkubieren
- 30 min bei 13000 rpm, 4 °C, zentrifugieren
- mittlere Phase abnehmen und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführen
- 3 x 15 min zentrifugieren und jeweils die mittlere Phase in ein neues Eppendorf-Gefäß überführen

- Proteinbestimmung durchführen: 800 μl H_2O + 200 μl RotiQuant (*Roth*, Karlsruhe) + 2 μl Puppenlysate mischen und OD_{600} bestimmen.
 OD_{600} von 0,1 entspricht ca. 1 mg/ml Gesamtprotein
- Puppenlysate bei -70°C lagern

Lösungen:

- Lysispuffer: 50 mM TrisHCl pH 8, 150 mM NaCl, 0,5 % Triton, 1 mM MgCl_2 , 1 μM Pefabloc, 5 μM Leupeptin, 1 μM Pepstatin, 0,3 μM Aprotinin

2.3.2 *In vitro* Transkriptions-/Translationsreaktion

Die *in vitro* Transkriptions-/Translationsreaktion erfolgte nach Herstellerangaben mit dem „TNT Coupled Reticulocyte Lysate Systems/Transcend Non-Radioactive Translation Detection System“ der Firma *Promega*, Madison, USA. Retikulozyten-Lysat aus Kaninchen stellt bei diesem System alle für die Transkription und Translation notwendigen Komponenten bereit. Durch Zugabe einer biotinylierten Lysin-tRNA erfolgt die Markierung des translatierten Proteins, welches dadurch mittels eines Streptavidin-POD-Konjugates und anschließender Chemilumineszenz nachgewiesen werden.

- 25 μl Rabbit Reticulocyte Lysate
- 2 μl TNT Reaction buffer
- 1 μl T3- bzw. T7-RNA-Polymerase
- 0,5 μl AA-mixture (-Leu)
- 0,5 μl AA-mixture (-Met)
- 1 μl RNase Inhibitor (40 U/ μl)
- 2 μl template DNA (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, entsprechend 1 μg)
- 2 μl transcend tRNA
- 16 μl H_2O

Die Inkubation erfolgt für 2 h bei 30 °C. Zur Kontrolle der Effizienz der Reaktion und der Überprüfung der richtigen Größe des erhaltenen Translatats werden 2 µl des Reaktionsansatzes durch SDS-PAGE-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Das synthetisierte, mit biotinyliertem Lysin markierte Protein, wird mithilfe des Streptavidin-POD-Konjugates (1:1000, *Boehringer/Roche Diagnostics*, Mannheim) und Chemilumineszenz detektiert.

2.3.3 Herstellung eines GST-Fusionsproteins

Die zur Transkription/Translation vorgesehene DNA wird in frame an das 3'-Ende der Glutathion-S-Transferase (GST) in den pGEX-Vektor kloniert. Nach Transformation des pGEX-Konstrukt (und des ursprünglichen pGEX-Vektors als Kontrolle) in BL21 Zellen (siehe 2.2.2) wird mit einer Einzelkolonie eine Vorkultur in LB_{amp}-Medium angeimpft und ü. N. bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Mit 20 ml der Kultur werden 200 ml LB-Medium angeimpft und bei 37 °C im Schüttler inkubiert bis die OD₆₀₀ bei 0,8 liegt. Durch Zugabe von IPTG (1 mM) wird die Expression des GST-Fusionproteins über 4 h im Schüttler bei 30 °C induziert (Kontrolle: nicht induzierte Probe). Dann erfolgen der Aufschluss der Zellen und die Isolierung des Proteins.

- Die Kultur 10000 rpm für 15 min zentrifugieren.
- Überstand verwerfen, Pellet kann bis zur Aufarbeitung bei -20 °C gelagert werden
- Das Pellet in 10 ml kaltem 1xPBS versetzt mit Proteaseinhibitoren vollständig resuspendieren
- 5 x 15 sec auf Eis sonifizieren.
- 500 µl 20 % Triton X-100 (= 1%) zugeben
- 30 min bei Raumtemperatur auf dem Taumler inkubieren
- 15 min bei 10000 rpm bei 4 °C zentrifugieren (Probe vom Pellet nehmen!)
- Überstand in frische Gefäß überführen
- Überstand mit der nach den Angaben des Herstellers (*Amersham Bioscience Europe*, Freiburg) vorbereiteten Glutathion Sepharose 4B versetzen (pro 100 ml Kultur werden 200 µl 50 %ige, in PBS gewaschene Glutathion Sepharose 4B eingesetzt, das entspricht 133 µl der 75 %igen vom Hersteller bereitgestellten Suspension.)

- 60 min bei Raumtemperatur auf dem Taumler inkubieren
- 15 min bei 10000 rpm bei 4 °C zentrifugieren, Glutathione Sepharose 4B mit 1 x PBS waschen
- Die Matrix mit dem gebundenen GST-Fusionsprotein kann bei 4 °C aufbewahrt werden.

Kontrollen:

- Die Induktion von GST ohne ein daran fusioniertes Protein dient der qualitativen und quantitativen Kontrolle der Proteininduktion. Bei Pull-down-Experimenten wird die an die Matrix gebundene GST als Kontrolle für den Ausschluss unspezifischer Bindungen eingesetzt.
- Das Entnehmen einer nicht induzierten Probe dient der Überprüfung der Spezifität der IPTG induzierten Transkription/Translation des Fusionsproteins als Negativkontrolle im Vergleich zur induzierten Probe.
- In einigen Fällen ist das induzierte Protein nicht löslich und befindet sich nach Aufschluss der Zellen im Pellet. Kann es dort nachgewiesen werden, besteht die Möglichkeit durch Modifikation des Standardprotokolls eine bessere Löslichkeit des Proteins zu erreichen.

Lösungen:

- PBS(10x): 1,3 M NaCl; 70 mM NaHPO₄ ; 30 mM NaH₂PO₄
- Proteaseinhibitoren: 1 µM Pefabloc, 5 µM Leupeptin, 1 µM Pepstatin, 0,3 µM Aprotinin

Zur Kontrolle Induktionseffizienz und zur Überprüfung der richtigen Größe des erhaltenen Fusionsproteins werden 10 µl des an die Matrix gebundenen Protein mit 2 x-SDS-Loading-Buffer für 5 min aufgekocht und sofort auf Eis abgekühlt. Die Probe wird dann durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und durch Coomassie blue-Färbung analysiert. (Das GST-Protein hat eine Größe von 29 kDa.)

2.3.4 SDS-PAGE-Gelelektrophorese und Western-blotting

Für SDS-PAGE-Gelelektrophorese und Western-blotting wurde ein kombiniertes Gelelektrophorese-/Nassblotgerät der Firma *Biorad*, München („Mini Trans-blot“), gemäß den Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Proteine wurden in Polyacrylamidgelen, die je nach Größe der aufzutrennenden Proteine 7,5 %-10 % Acrylamid enthielten, aufgetrennt, im Western-blot auf Nitrozellulosemembranen (*Schleicher und Schüll*, Dassel) übertragen und der Transfer durch eine Ponceau S-Färbung überprüft. Zur Proteindetektion wurde folgendermaßen vorgegangen:

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

Lösungen:

Trenngel, 10%:	2,5 ml 30 % Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1), 2,8 ml 1 M Tris pH 8,8, 38 µl 20 % SDS, 2,1 ml H ₂ O, 30 µl 10 % APS, 8 µl TEMED
Sammelgel:	310 µl 30 % Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1), 235 µl 1 M Tris pH 6,8, 10 µl 20% SDS, 1,3 ml H ₂ O, 10 µl 10 % APS, 5 µl TEMED
1 x TBST:	50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween
Blockierlösung:	3 % Milchpulver, 1 % BSA in 1 x TBST

2.3.5 GST-Pull-down

- 20 µl an die Matrix gebundenes Fusionsprotein mit
- 10 µl in vitro Tranlatiertem Protein in
- 500 µl Pull-down-Puffer
- auf dem Überkopffrotor bei 4° C ü.N. inkubieren
- Glutathione Sepharose 4B dreimal mit je 500 µl Pull-down-Puffer waschen (zwischen durch jeweils 1 min bei 6000 rpm zentrifugieren und Überstand abziehen)
- 20 µl 2 x SDS-Probenpuffer mit der Glutathione Sepharose 4B aufkochen und auf ein SDS-Gel auftragen.

Lösungen:

Pull-down-Puffer: 20 mM Tris pH 8, 0,2 M EDTA, 0,1 M NaCl, 1 mM DTT, 0,2 % IGEPAL, 1 µM Pefabloc, 5 µM Leupeptin, 1 µM Pepstatin 0,3 µM Aprotinin

2.4 Genetische Methoden

2.4.1 Fliegenzucht

Die Haltung der Fliegen erfolgt im wesentlichen wie von (Ashburner, 1989) beschrieben auf Standardmedium bei 18 °C, RT und 25 °C. Eiablagen werden auf Apfelsaft-Agarplatten angesetzt, die zur Stimulation der Eiablage mit einem Tupfer Hefe und einigen Tropfen 10 % Essigsäure versehen werden.

Lösungen:

- Standardmedium: 356 g Maisschrot, 47,5g Sojamehl, 84 g Trockenhefe, 225 g Malzextrakt, 75 ml 10 % Nipagin, 22,5 ml Propionsäure, 28 g Agar, 200 g Zuckerrübensirup, mit 4,9 l H₂O auffüllen

2.4.2 Fliegenstämme, Chromosomen und Allele

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

2.4.2.1 Balancer-Chromosomen

Stämme	Bemerkung	Referenz
<u>1. Chromosom</u>		
FM7	Balancer-Chr.	(Lindsley and Zimm, 1992)
<u>2. Chromosom</u>		
CyO	Balancer-Chr.	(Lindsley and Zimm, 1992)
<u>3. Chromosom</u>		
TM3	Balancer-Chr.	(Lindsley and Zimm, 1992)
TM6B	Balancer-Chr.	(Lindsley and Zimm, 1992)
<u>2./3. Chromosom</u>		
<u>SM6-TM6B</u>	Compound-Balancer	Thomas Klein, Köln

Tab. 2.2: Verwendete Balancer-Chromosomen

2.4.2.2 Mutante Fliegenstämme

(Beschreibung der Allele im Ergebnisteil)

Mutation in	Allel	Chromosom	Referenz
<i>bazooka</i>	815-8	1	(McKim et al., 1996)
<i>bazooka</i>	xi106	1	(Wieschaus et al., 1984)
<i>discs large</i>	m52	1	(Woods et al., 1996)
<i>par-6</i>	Delta 226	1	(Petronczki and Knoblich, 2001)
<i>stardust</i>	XN05	1	(Wieschaus et al., 1984)
14-3-3, ζ	07103	2	(Kockel et al., 1997)
<i>coracle</i>	k08713	2	(Spradling et al., 1999)
DaPKC	k06403	2	(Spradling et al., 1999)
<i>leonardo</i>	12BL	2	(Broadie et al., 1997)
<i>lethal giant larvae</i>	4	2	(Timmons et al., 1993)
<i>par-1</i>	k06323	2	(Spradling et al., 1999)
<i>par-1</i>	W3	2	(Shulman et al., 2000)
14-3-3, ϵ	j2B10	3	(Spradling et al., 1999)
<i>crumbs</i>	11A22	3	(Jürgens et al., 1984)
<i>neurexin</i>	4304	3	(Baumgartner et al., 1996)
<i>scribbled</i>	j7B3	3	(Spradling et al., 1999)

Tab. 2.3: Gene, die an der Ausbildung und Erhaltung von Zellpolarität beteiligt sind.

Mutation in	Allel	Chromosom	Referenz
<i>dishevelled</i>	3	1	(Galindo et al., 2002)
<i>flamingo</i>	192	2	(Rawls and Wolff, 2003)
<i>flamingo</i>	frz3	2	(Rawls and Wolff, 2003)
<i>flamingo</i>	E59	2	(Usui et al., 1999)
<i>prickle</i>	1	2	(Gubb et al., 1999)
<i>strabismus</i>	6	2	(Wolff and Rubin, 1998)

Tab. 2.4: Gene, die zu den primären Polaritätsgenen gehören.

Mutation in	Allel	Beschreibung	Referenz
<i>dachsous</i>	W	2	(Clark et al., 1995)
<i>dachsous</i>	33k	2	(Clark et al., 1995)
<i>dachsous</i>	UA071	2	(Adler et al., 1998)
<i>fat</i>	1	2	(Bryant et al., 1988)
<i>fat</i>	4	2	(Bryant et al., 1988)
<i>fat</i>	G-rv	2	(Bryant et al., 1988)
<i>fat</i>	sz44	2	(Bryant et al., 1988)
<i>four jointed</i>	4	2	(Villano and Katz, 1995)
<i>four jointed</i>	d1	2	(Brodsky and Steller, 1996)
<i>four jointed</i>	N7	2	(Buckles et al., 2001)
UAS <i>fj</i>	363	2	(Zeidler et al., 1999)

Tab. 2.5: Modifikationstest; Gene, die upstream der primären Polaritätsgene agieren.

Mutation in	Allel	Chromosom	Referenz
<i>punt</i>	10460	2	(Spradling et al., 1999)
<i>punt</i>	135	2	(Ruberte et al., 1995)
<i>raw</i>	k01021	2	(Spradling et al., 1999)
<i>raw</i>	1	2	(Arora et al., 1995)
<i>ribbon</i>	1	2	(Jack and Myette, 1997)
<i>schnurri</i>	1	2	(Arora et al., 1995)
<i>thick veins</i>	k16713	2	(George and Terracol, 1997)
<i>thick veins</i>	7	2	(Terracol and Lengyel, 1994)
<i>zipper</i>	IIX62	2	(Young et al., 1993)

Tab. 2.6: Modifikationstest; Gene, die Zellform beeinflussen.

2.4.2.3 GAL4-Aktivatorlinien

Stämme	Bemerkung	Referenz
<i>ombGal4</i>	<i>optomotor-blind-Gal4</i>	G. Morata, Bloomington [*] , #3045
<u>2. Chromosom</u>		
GAL4 ^{559.1}	<i>patched-GAL4</i>	(Hinz et al., 1994)
<i>enGAL4</i>	<i>engrailed-GAL4</i>	N. Perrimon, Bloomington [*] , #1973
<u>3. Chromosom</u>		
<i>daG32</i>	<i>daughterless-GAL4</i>	(Wodarz et al., 1995)

Tab. 2.4: Verwendete GAL4-Aktivatorlinien

2.4.2.4 UAS-Effektorlinien

Stämme	Bemerkung	Referenz
<u>2. Chromosom</u>		
UAS <i>ff363</i>	<i>four jointed</i> -Effektor	(Zeidler et al., 1999)
UAS <i>lacZ</i>	<i>lacZ</i> -Effektor	(Brand and Perrimon, 1993)
<u>3. Chromosom</u>		
UAS <i>fmi22</i>	<i>flamingo</i> -Effektor	(Usui et al., 1999)
UAS <i>baz6.3</i>	<i>bazooka</i> -Effektor	(Kuchinke et al., 1998)

Tab. 2.5: Verwendete UAS-Effektorlinien

* <http://flystocks.bio.indiana.edu>

2.4.3 Das GAL4/UAS-System

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

Die Funktion eines Gens lässt sich jedoch nicht nur anhand von Verlust-Mutationen beschreiben, sondern auch durch dessen Expression an ektopischen Orten oder in unphysiologisch hohen Dosierungen. Möglich wurde dies durch den Einsatz des Hitzeschock-induzierbaren *hsp70*-Promotors. Dem zu untersuchenden Gen vorgeschaltet aktiviert dieser durch Inkubation bei 37 °C dessen Transkription. Dies ermöglicht zwar eine zeitliche, aber keine räumliche Kontrolle der Genexpression, da diese ubiquitär erfolgt. Außerdem besitzt der *hsp70*-Promotor bereits bei niedrigeren Temperaturen eine Basalaktivität, die je nach zu untersuchendem Gen letal sein kann. Erst mit Hilfe des von entwickelten GAL4/UAS-Systems wurde eine zeitlich und räumlich beeinflussbare Genexpression möglich (Brand and Perrimon, 1993). Unter dem Einfluss zeit- und gewebespezifischer Enhancer wird in einem als „Aktivator“ bezeichneten Fliegenstamm der Hefe-Transkriptionsfaktor GAL4 exprimiert. In einem zweiten, „Effektor“ genannten Fliegenstamm steht das zu untersuchende Gen unter dem Einfluss von UAS-Sequenzen („upstream activating sequences“), den Bindungsstellen für GAL4. Durch Kreuzung von „Aktivator“- und „Effektor“-Stamm gelangen beide Komponenten in einen Organismus und führen zur GAL4/UAS-vermittelten Expression des Zielgens unter der räumlichen und zeitlichen Kontrolle der Enhancer.

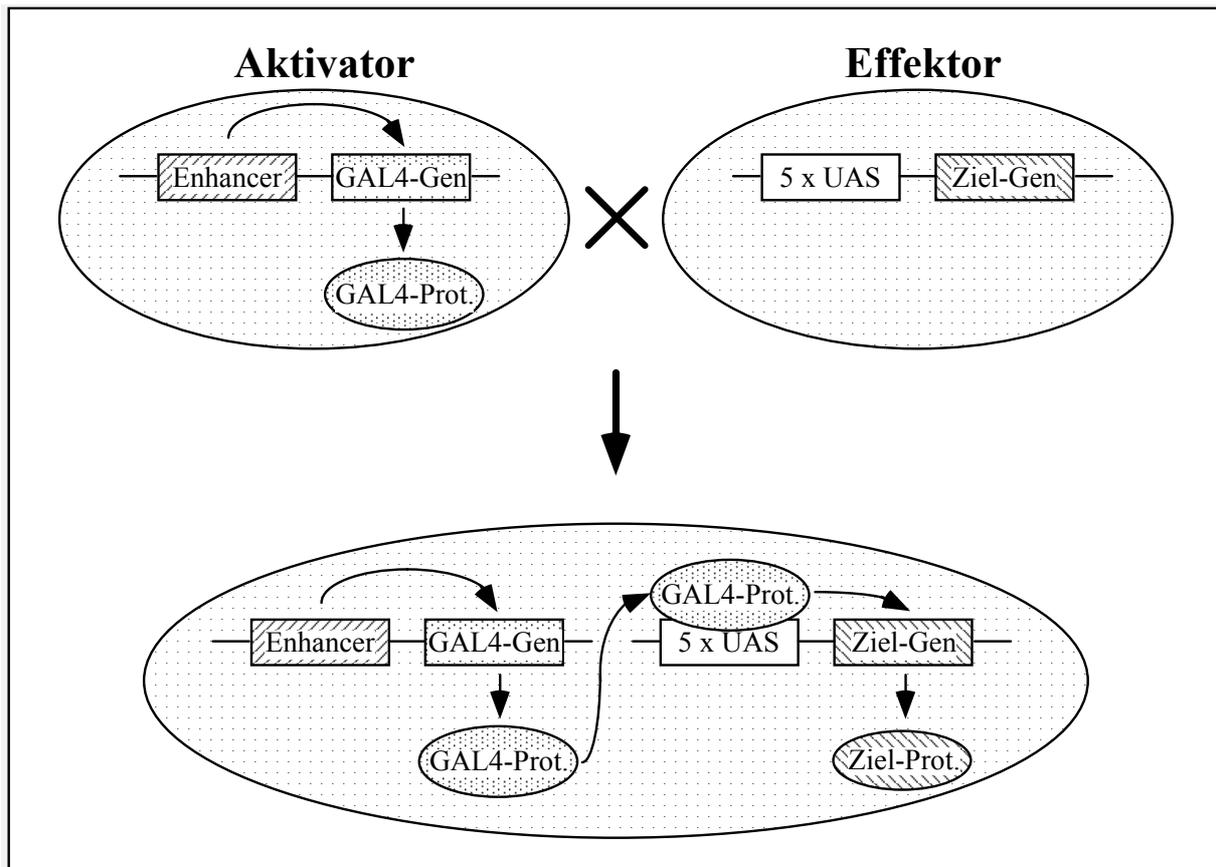


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des GAL4/UAS-Systems

2.5 Histologische Methoden

2.5.1 Verwendete Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Verdünnung	Referenz
aCut	monoklonaler Maus-Antikörper	1:50	Hybridoma Bank*
aBaz	polyklonaler Kaninchen-Antikörper	1:500	(Wodarz et al., 2000)
aBaz	polyklonaler Ratten-Antikörper	1:500	(Wodarz et al., 1999)
aDlg	monoklonaler Maus-Antikörper	1:400	Hybridoma Bank*
aDPatj	polyklonaler Kaninchen-Antikörper	1:500	Knust, nicht veröffentlicht
aPY	monoklonaler Maus-Antikörper	1:100	<i>BD Bioscience</i>
aArm	monoklonaler Maus-Antikörper	1:50	(Riggelman et al., 1990)
aPar-6	polyklonaler Meerschweinchen-Antikörper	1:1000	Wodarz, nicht veröffentlicht
aPKC zeta C20	polyklonaler Kaninchen-Antikörper	1:1000	<i>Santa Cruz</i>
aFmi	monoklonaler Maus-Antikörper	1:10	(Usui et al., 1999)
Esel-a-Kaninchen-Cy3	polyklonaler Esel-Antikörper	1:200	<i>Dianova</i>
Esel-a-Ratte-Cy3	polyklonaler Esel-Antikörper	1:200	<i>Dianova</i>
Ziege-a-Maus-Cy2	polyklonaler Ziegen-Antikörper	1:200	<i>Dianova</i>
Ziege-a-Meerschweinchen-Cy3	polyklonaler Ziegen-Antikörper	1:200	<i>Dianova</i>

Tab. 2.6: Verwendete Antikörper

* <http://www.uiowa.edu/~dshbwww/>

Esel-a-Kaninchen-Cy3	polyklonaler Esel-Antikörper	1:200	<i>Dianova</i>
Esel-a-Ratte-Cy3	polyklonaler Esel-Antikörper	1:200	<i>Dianova</i>
Ziege-a-Maus-Cy2	polyklonaler Ziegen-Antikörper	1:200	<i>Dianova</i>
Ziege-a-Meerschweinchen-Cy3	polyklonaler Ziegen-Antikörper	1:200	<i>Dianova</i>
Ziege-a-Maus-HRP	polyklonaler Ziegen-Antikörper	1:750	<i>Dianova</i>

Tab. 2.6: Verwendete Antikörper (Fortsetzung)

Aktin wurde sichtbar gemacht mit Alexa Flour 488 phalloidin oder Alexa Flour 660, *Molecular Probes*, Eugene, USA.

2.5.2 Antikörperfärbung an Embryonen

2.5.2.1 Standardprotokoll

- Embryonen 4 min in Natriumhypochlorid dechorionisieren,
- gut mit H₂O waschen
- Embryonen in ein Rollrandglas mit Fixierlösung überführen
- 15-20 min über Kopf fixieren
- zum Devitellinisieren untere (wässrige) Phase abziehen, durch Methanol ersetzen und 30 sec kräftig schütteln; Embryonen absinken lassen und Überstand abnehmen
- Embryonen 10 min in Methanol inkubieren
- 3 x 20 min mit PBT waschen
- Embryonen 1 h mit 5-10 % normalen Pferdeserum (in PBT) blocken
- Primären Antikörper in Blockinglösung verdünnen und ü.N. bei 4 °C oder für 2 h bei RT inkubieren
- Primären Antikörper abziehen, Embryonen 3 x 20 min mit PBT waschen
- Zweiten Antikörper in Blockinglösung verdünnen und für 2 h bei RT inkubieren
- Zweiten Antikörper abziehen, Embryonen 3 x 20 min mit PBT waschen

- Der Nachweis der Markierung erfolgt entweder durch eine enzymatische Farbreaktion (bei HRP-gekoppelten zweiten Antikörpern) oder durch Fluoreszenzmikroskopie (bei Fluoreszenz-gekoppelten zweiten Antikörpern).

Enzymatische Färbereaktion:

- Embryonen in Blockschälchen überführen, PBT durch Färbelösung ersetzen und Farbreaktion unter dem Binokular kontrollieren
- Färbelösung abziehen und Embryonen mehrfach mit PBT waschen
- Alkoholreihe zur Entwässerung der Embryonen: je 5 min in 30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 96 % Ethanol, 2 x 10 min in 100 % Ethanol waschen
- Embryonen in Kanadabalsam (*Roth*, Karlsruhe) einbetten

Lösungen:

Fixierlösung :	1,92 ml PBS 0,26 ml Formaldehyd (37 %) 1,82 ml Heptan
PBT :	1 x PBS mit 0,1% Triton X-100
PBS (10 x):	1,3 M NaCl; 70 mM NaHPO ₄ ; 30 mM NaH ₂ PO ₄
Färbelösung :	800 µl PBT + 200 µl DAB-Lösung (vorher mit 1-2 µl 30% H ₂ O ₂ aktiviert)
DAB –Stammlsg.:	1 mg DAB (3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid)/ml in PBS bei -20°C gelagert

2.5.2.2 Modifizierung des Standardprotokolls

Für einige Antikörper muss das oben beschriebene Standardprotokoll modifiziert werden, um das Resultat zu verbessern. Für den Crumbs-Antikörper (cq4) z. B. empfiehlt sich eine 11 %ige Formaldehydfixierung (1 ml PBS; 0,625 ml 37 %iges Formaldehyd; 1,5 ml Heptan), bei anderen Antikörpern, z. B. dem Bazooka-Antikörper führt eine Hitzefixierung zur Ergebnisverbesserung .

Hitzefixierung, (Müller and Wieschaus, 1996):

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

2.5.3 Antikörperfärbungen an larvalen und pupalen Flügeln

2.5.3.1 Antikörperfärbung an larvalen Imaginalscheiben

- Larven des gewünschten Stadiums in eiskaltem 1 x PBS sammeln (Larven werden unbeweglich und strecken sich)
- Imaginalscheiben in 1 x PBS präparieren und in 3er Blockschälchen sammeln
- Fixierung in 4 % Paraformaldehyd für 20 min
- mindestens 3 x 20 min in PBT waschen
- Inkubation mit dem primären Antikörper in PBT/5 % Pferdeserum ü.N. bei 4 °C
- mindestens 3 x 20 min in PBT waschen

- Inkubation mit dem sekundären, Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper in PBT/5 % Pferdeserum für 2 h bei RT
- mindestens 3 x 20 min in PBT waschen
- eindeckeln der Imaginalscheiben in Glycerin/Propylgalat (Präparate dunkel und kühl lagern)

Lösungen:

- PBT: 1 x PBS mit 0,1% Triton X-100
- Glycerin/Propylgalat: 50 mg/ml Propylgalat in 75 % Glycerin

2.5.3.2 Antikörperfärbungen an pupalen Flügeln

- Puppen von der Wand der Zuchtgefäße mit PBS ablösen
- In 4 % Paraformaldehyd präparieren
- Mindesten 20 min in Paraformaldehyd fixieren
- mindestens 3 x 20 min in PBT waschen
- Inkubation mit dem primären Antikörper in PBT/5 % Pferdeserum ü.N. bei 4 °C
- mindestens 3 x 20 min in PBT waschen
- Inkubation mit dem sekundären, Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper in PBT/5 % Pferdeserum für 2 h bei RT
- mindestens 3 x 20 min in PBT waschen
- eindeckeln der Imaginalscheiben in Glycerin/Propylgalat (Präparate dunkel und kühl lagern)

Wird bei den Färbungen an larvalen Imaginalscheiben oder pupalen Flügeln ein mit einem Fluorochrom gekoppeltes Phalloidin eingesetzt, so erfolgte die Inkubation hiermit vor der mit den Antikörpern für eine Stunde bei RT, auf die Zugabe von Serum wurde dann während der gesamten Färbeprozedur verzichtet.

2.5.4 X-Gal-Färbung an Adulten Flügeln

- adulte Flügel in 50 % Glutaraldehyd 2 min fixieren
- sofort in PBS waschen
- über Nacht bei RT färben
- mehrmals in PBS waschen
- in Hoyers/Lactat einbetten

Lösungen:

10 x PBS:	1,3 M NaCl, 0,07 M Na ₂ HPO ₄ , 0,03 M NaH ₂ PO ₄ , ad 1 l mit H ₂ O auffüllen und autoklavieren; für 1 x PBS 10 x PBS 1:10 mit autoklaviertem H ₂ O verdünnen
Färbelösung:	20µl 10 % X-Gal (5-Br-4-Cl-3-Indolyl- β -D-Galactosid)-DMSO in 1 ml X-Gal-Puffer (X-Gal-Puffer bei 50 °C vorwärmen, X-Gal-DMSO zugeben und noch einige min bei 50 °C vorinkubieren)
X-Gal-Puffer:	0,15 M NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 10 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,2, 3,3 mM K ₃ Fe(CN) ₆ , 3,3 mM K ₄ Fe(CN) ₆
Hoyers/Lactat:	50 ml H ₂ O + 30 g Gummi arabicum ü.N. rühren, 200 g Chloralhydrat und 16 ml Glycerin zugeben; mindestens 3 h bei 12000 rpm zentrifugieren und den Überstand verwerfen; 1:1 mit Lactat mischen

2.5.5 Präparation embryonaler Kutikula

Fliegen des gewünschten Genotyps werden ü.N auf Apfelsaftagarplatten zur Eiablage gebracht und die abgelegten Eier anschliessend für weitere 48 h 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. 4 min in Natriumhypochlorid) und nochmaligem

Waschen mit H₂O werden die Embryonen auf einem Objektträger in einen Tropfen Hoyers/Lactat überführt und eingedeckelt. Die Klärung erfolgt ü.N. bei 65 °C.

Lösungen:

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

2.6 Mikromanipulation von *Drosophila melanogaster*

2.6.1 Keimbahntransformation

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

2.6.1.1 Herstellung des Injektionsmixes

Sowohl die DNA des P-Element-Transformationsvektors, als auch die des Helferplasmids wurden mit dem Jetstar Plasmid Midi Kit der Firma *Genomed*, Bad Oeynhausen, isoliert und für den Injektionsmix etwa 4 µg P-Element-Transformationsvektor und 1 µg Helfer-Plasmid (pUCHspΔ2-3) gemischt. Desweiteren wurden 1 µl 10 x Injektionspuffer sowie 1 µl 2 % Phenolrot zugefügt und mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt.

Lösungen:

- 10 x Injektionspuffer: 5 mM KCl, 0,1 mM Na-Phosphatpuffer, pH 6,8

2.6.1.2 Herstellung der Injektionskapillaren

Glaskapillaren aus Sodaklarglas (*Hilgenberg*, Malsfeld) wurden mit dem Mikroelektrodenpuller PUL-1 (W-P Instruments Inc., New Haven, USA, bei der Einstellung Delay 2, Heat 10) gezogen, danach 5min unter einem Anstellwinkel von ca. 30 ° geschliffen (*Bachofer*, Reutlingen), in den Mikromanipulator (*Narishige*, Tokyo, Japan) eingespannt und von hinten mit 3S Voltalef-Fluorocarbon-Öl (*Lehmann und Voss*, Hamburg) befüllt. Vor dem Befüllen der Kapillaren mit dem Injektionsmix wird dieser 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um Schwebeteilchen, die die Kapillare verstopfen könnten, abzutrennen. Aus dem Überstand wird 1 µl abpipettiert und auf ein silikonisiertes Deckglas gegeben. Von dort aus kann der Injektionsmix unter mikroskopischer Kontrolle von vorne in die Kapillare aufgezogen werden.

2.6.1.3 Mikroinjektion

Für die Injektionen werden w^- -Embryonen (w^{1118}) benutzt. Da alle P-Element-Transformationsvektoren ein w^+ -Gen tragen, welches ins Fliegen-genom mitintegriert, können transgene Fliegen anhand ihrer Augenfarbe (von schwach gelb bis dunkelrot, je nach Integrationsort) erkannt werden. Die Injektion in den posterioren Teil der w^- -Embryonen erfolgt vor Bildung der Polzellen, welche die spätere Keimbahn der Fliege bilden. Nur so bietet sich die Möglichkeit, dass die DNA bei der Zellbildung mitinternalisiert und ins Genom der Polzellen integriert wird. Dies ist etwa bis 1,5 h nach Befruchtung möglich, weil der Embryo bis dahin ein Syncytium von sich teilenden Kernen darstellt (Campos-Ortega and Hartenstein, 1997). Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, die w^- -Fliegen zur Eiablage etwa zwei Tage vor Beginn der Mikroinjektion auf Apfelsaft-Agarplatten zu setzen und diese häufiger zu wechseln, da dann mehr Eier gelegt werden und die Embryonen einer Ablage vom Alter her synchronisiert sind. w^- -Fliegen werden für ca. 30 min auf Apfelsaft-Agarplatten gesetzt und die abgelegten Eier von Hand oder chemisch (2 min in einem 1:1 Gemisch aus Natriumhypochlorid und H_2O , anschließend gut waschen) dechorionisiert. Anschließend werden die Embryonen in gleicher Orientierung auf einem Apfelsaft-Agarblöckchen aufgereiht und auf ein vorher mit Kleber bestrichenes Deckglas übertragen. Nun lässt man die Embryonen unter optischer Kontrolle trocknen, bis sich bei Berührung mit einer Präpariernadel Falten bilden. Das Deckglas wird auf einem Objektträger fixiert und die Embryonen mit 3S Voltalef-Öl überschichtet. Die Injektionen erfolgen unter dem Mikroskop mit dem vorbereiteten Mikromanipulator. Der Injektionsdruck kann über eine Mikrometerschraube variiert werden und sollte so eingestellt sein, dass der Injektionsmix erst beim Eindringen in einen Embryo ausfließt. Dies kann durch den Phenolrot-Zusatz gut kontrolliert werden. Fertig injizierte Embryonen werden mit 3S Voltalef-Öl überschichtet und bis zum Schlüpfen in einer feuchten Kammer bei 18 °C aufbewahrt. Geschlüpfte L1-Larven werden zu 50 Individuen in ein vorbereitetes frisches Fliegenröhrchen (Brei wird angefeuchtet, aufgelockert und mit einem Tupfer Hefe versehen) gesammelt und bis zum Schlüpfen der adulten Fliegen ebenfalls bei 18 °C gehalten.

Lösungen:

- Kleber: tesa-Pak Paketklebeband (Beiersdorf, Hamburg) einige Tage in Heptan einweichen, dann abzentrifugieren und Überstand verwenden
- Apfelsaftagarplatten: 40 g Agar, 340 ml Apfelsaft (100 %) und 17 g Rohrzucker mit H₂O auf 1 l auffüllen, aufkochen, nach Abkühlen auf 60 °C mit 30 ml Nipagin versetzen und Platten giessen
- 10 % Nipagin: 100 g Nipagin in 1 l 70 % Ethanol lösen

2.6.1.4 Isolierung und Balancierung transgener Fliegen

Den geschlüpften Tieren der G₀ kann nicht angesehen werden, ob eine Insertion der injizierten DNA erfolgt ist, da diese nur in der Keimbahn erfolgt. Jedes G₀-Tier wird deshalb gegen 3 Tiere mit dem Genotyp w⁻/w⁻(Y); Gla/CyO (weissäugig mit zweitchromosomalem Balancer) gekreuzt. Unter den Nachkommen aus dieser Kreuzung befinden sich nur dann rotäugige Tiere, wenn es zu einer Keimbahntransformation des G₀-Tieres gekommen ist. Der Integrationsort des P-Elementes auf dem ersten, zweiten oder dritten Chromosom wird durch weitere Kreuzungen gegen erst-, zweit- und drittchromosomale Balancerchromosomen ermittelt. Stämme, die homozygot nicht lebensfähig sind, werden balanciert etabliert und gehalten. Im Falle von Mehrfachinsertionen wird versucht, diese zu trennen, separat auszukreuzen und zu etablieren.

2.6.2 RNAi (RNA-Interferenz)

RNAi ermöglicht es, ein Gen durch die Injektion der entsprechenden doppelsträngigen RNA (dsRNA aus sense- und antisense-Strang) gezielt auszuschalten. Bei *Caenorhabditis elegans* wird diese Technik schon seit längerem erfolgreich genutzt, um mutante Phänotypen zu erzeugen (Fire et al., 1998). Sie ist insbesondere dann informativ, wenn zu einem Gen keine konventionell erzeugte Mutante existiert. Die systematische Anwendung bei *Drosophila melanogaster* erfolgte erst seit 1998 (Kennerdell and Carthew, 1998; Misquitta and Paterson, 1999).

2.6.2.1 Induzierbare RNA Interferenz

Mit Hilfe des in 2.3.3 beschriebenen GAL4/UAS-Systems ist es möglich doppelsträngige RNA ektopisch zu exprimieren (Kennerdell and Carthew, 2000). Hierzu wird ein Teil der Sequenz des Gens welches mittels RNA-Interferenz beeinflusst werden soll in zweifacher Kopie in gegenläufiger Orientierung und der pUAS-Vektor kloniert. Wie unter 2.5.1 beschrieben, erfolgen die Keimbahntransformation und die Etablierung der transgenen Stämme. Durch die Kreuzung der erhaltenen Effektorstämme mit Aktivatorstämmen ist RNAi in dem durch die Aktivatorstämmen festgelegten Gewebe möglich. Die Klonierungsschritte für das in diese Arbeit verwendete UAS*bazri*-Konstrukt sind in Abb. 2.2 dargestellt.

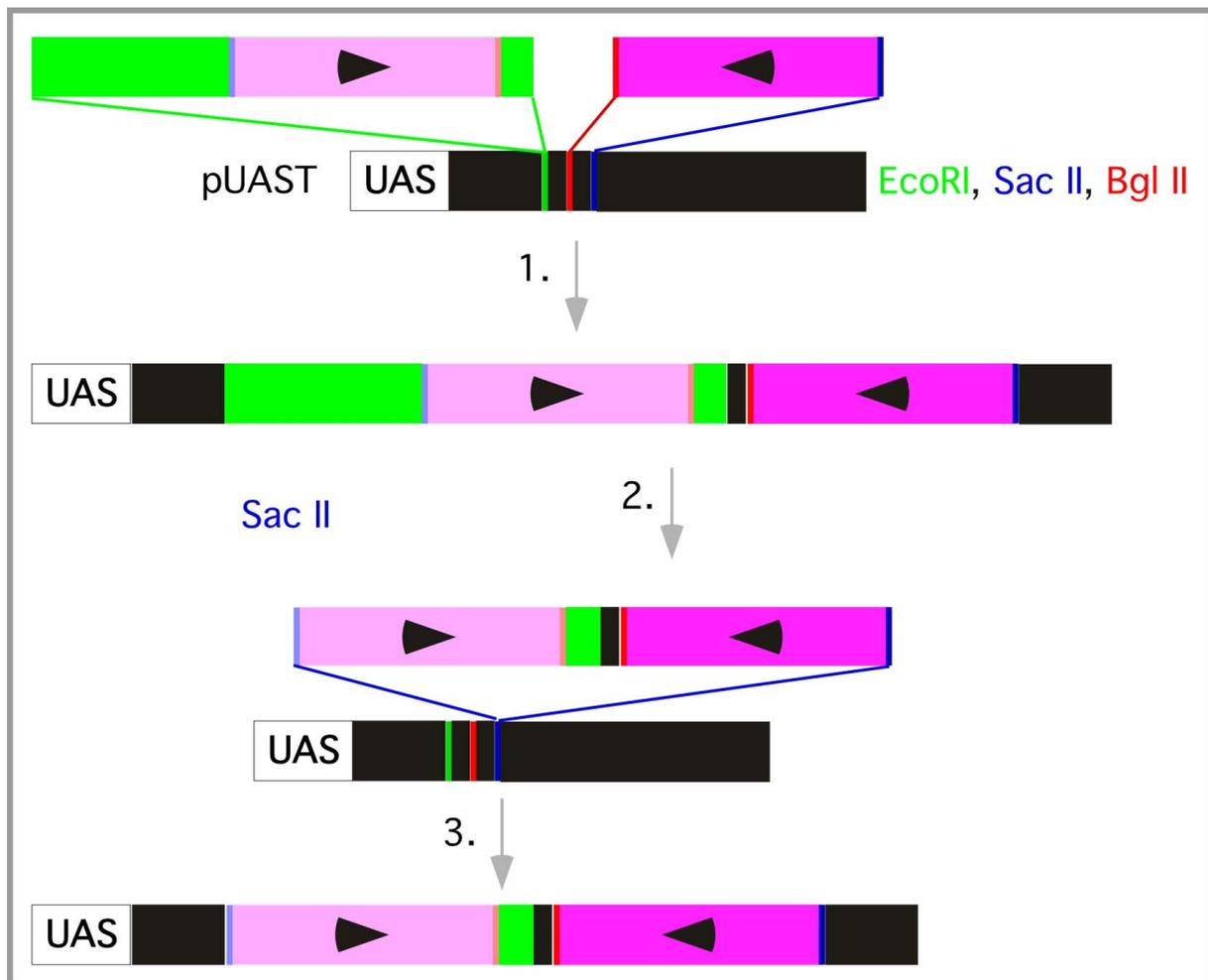


Abb. 2.2: Herstellung des UAS_{bazri}-Konstruktes 1. Ein BglII/SacII-Fragment, das 1842bp aus dem translatierten Bereich von *baz* (dunkles Magenta) enthält und ein 3528bp großes EcoRI-Fragment, das Teile des translatierten und der angrenzenden nicht-translatierten 5'-Region enthält (grün) wurden in gegenläufiger Orientierung in den pUAST-Vektor kloniert. Das EcoRI-Fragment beinhaltet das BglII/SacII-Fragment (helles Magenta). 2. Um den 5'-Überhang zu beseitigen, wurde ein Teil des Inserts über SacII ausgeschnitten 3. Das erhaltene SacII-Fragment wurde dann erneut in den pUAST-Vektor kloniert. Im zur Keimbahntransformation verwendeten Vektor lagen nun 2 1842bp große Fragmente des translatierten Bereiches von *baz* in spiegelbildlicher Anordnung vor, die durch eine 282 große „linker“-Region (grün) getrennt werden. Die Sequenzen der verwendeten Fragmente sind im Anhang vermerkt.

3 Ergebnisse

3.1 Die Delokalisation von Bazooka ist mit Fehlern bei der konvergenten Extension der Malpighischen Gefäße assoziiert

Die Entwicklung der Malpighischen Gefäße (MG) lässt sich in verschiedene Phasen einteilen. In den einzelnen Phasen laufen unterschiedliche Entwicklungsprozesse ab: die Determination der Anlage, die Rekrutierung von Zellen in die Anlage, die Zellproliferation und die Elongation der MG (siehe Einleitung). In Embryonen, denen das zygotische Genprodukt von *bazooka* (*baz*) fehlt, verlaufen die frühen Entwicklungsphasen normal. Im letzten Entwicklungsschritt, der Elongation, die durch konvergente Extension erreicht wird, kommt es dann zu Störungen. In den MG dieser Embryonen sind geweitete und verzweigte Lumina zu finden, zusätzlich sind die MG häufig fehlerhaft in der Körperhöhle positioniert (Wasserscheid, 2001). Da die Defekte der Elongation bei Verlust der *baz* Funktion entstehen, obwohl eine normale Zellpolarität nachgewiesen werden kann, ist eine direkte Rolle für Baz bei der konvergenten Extension zu vermuten. In wildtypischen Embryonen ist das Baz-Protein während aller Entwicklungsstadien, so auch während der Extension, in den MG exprimiert und apikal lokalisiert (Abb. 3.1). Um die Frage zu klären, ob für die konvergente Extension die apikale Lokalisation von Baz wichtig ist, wurde die Entwicklung der MG in Mutanten untersucht, in denen das Baz-Protein delokalisiert ist.

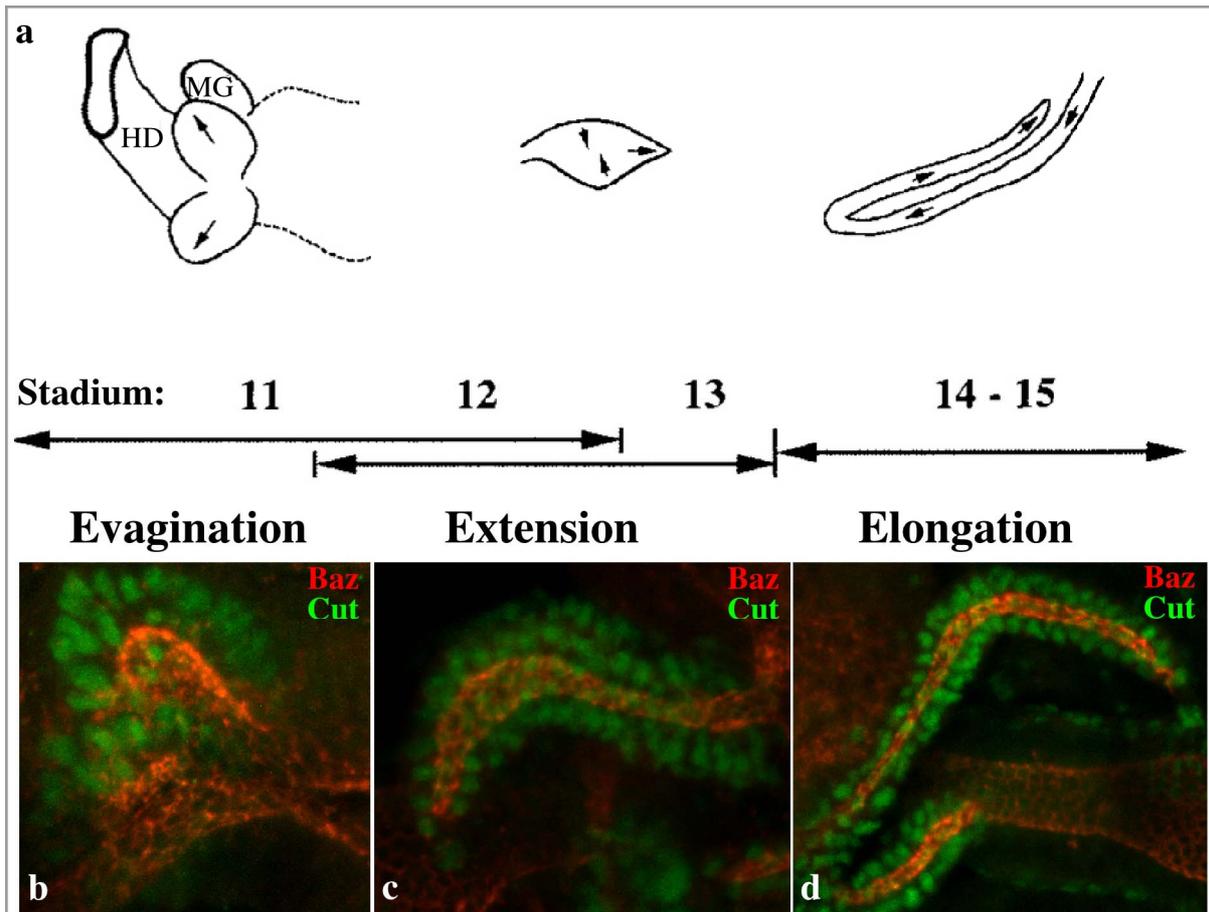


Abb. 3.1: Baz ist in den Malpighischen Gefäße exprimiert und apikal lokalisiert. a Schematische Darstellung der Entwicklung der MG ab Stadium 11 der Embryonalentwicklung, unterteilt in die Stadien: Evagination, Extension und Elongation; HD=Hinterdarm, MG=Malpighische Gefäße. Die Evagination erfolgt durch die Rekrutierung von Zellen in die Anlagen der MG. Die Extension ist mit einer Verformung der MG verbunden (Pfeile). Die Elongation erfolgt durch konvergente Extension, die zur Verlängerung der Anlagen führt (Pfeile). **b-d** Doppelfärbungen der MG zu den jeweiligen Entwicklungsstadien mit α Baz (rot) und α Cut (grün, markiert die Zellkerne). Das Baz-Protein ist in allen Stadien in den Zellen der MG apikal lokalisiert.

3.1.1 Der Funktionsverlust von *leo* führt zur Delokalisation von Baz in den MG, andere Aspekte von Zellpolarität bleiben erhalten

Aus anderen Epithelien sind Mechanismen bekannt, die sicherstellen, dass der Baz-Komplex ausschließlich an der apikalen Membran lokalisiert wird. Für das Follikelepithel, das die reifende Oozyte in *Drosophila* umgibt, konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Baz durch die Kinase Par-1 die Lokalisation von Baz an der lateralen Membran verhindert. Durch diese Phosphorylierung wird die Bindung der Proteine 14-3-3 ϵ und 14-3-3 ζ , kodiert von *leonardo* (*leo*), an Baz ermöglicht, wodurch die Delokalisation von Baz von der lateralen Membran erreicht wird. Dieser Mechanismus beschränkt die Lokalisation von Baz auf die apikale Membrandomäne (Benton and St Johnston, 2003). Um zu untersuchen, ob die apikale Lokalisation von Baz in den MG ebenfalls durch diesen Mechanismus gesichert wird, wurde in *leo*⁻-Mutanten die Lokalisation von Baz in den MG untersucht. Durch Antikörperfärbungen konnte festgestellt werden, dass Baz in den Zellen der MG in *leo*⁻-mutanten Embryonen in späten Entwicklungsstadien (Stadium 15/16) sowohl apikal als auch in geringeren Mengen an der lateralen Membran lokalisiert ist. (Abb. 3.2, Pfeilköpfe in b und d). Daraus kann geschlossen werden, dass Leo in den MG ebenfalls die Funktion hat, die Lokalisation von Baz an der lateralen Membran zu verhindern. Das späte Auftreten der Defekte und die Tatsache, dass Baz in den MG von *leo*⁻-mutanten Embryonen nicht vollständig delokalisiert ist, könnte auf die maternale Komponente von *leo* und auf seine Redundanz zu 14-3-3 ζ zurückzuführen sein (Benton et al., 2002; Benton and St Johnston, 2003). Weitere Antikörperfärbungen ergaben, dass das Protein DPatj, ein Mitglied des apikal lokalisierten Sdt-Komplex, und das Protein Dlg, eine Komponente der SJ, in den MG dieser Mutanten korrekt lokalisiert sind (Abb. 3.2 a' und d'). Dies deutet darauf hin, dass die Zellpolarität in den MG durch den Verlust von *leo* nicht generell gestört ist und dass die Fehllokalisierung von Baz an der lateralen Membran keinen Einfluss auf die Lokalisation von DPatj und Dlg hat.

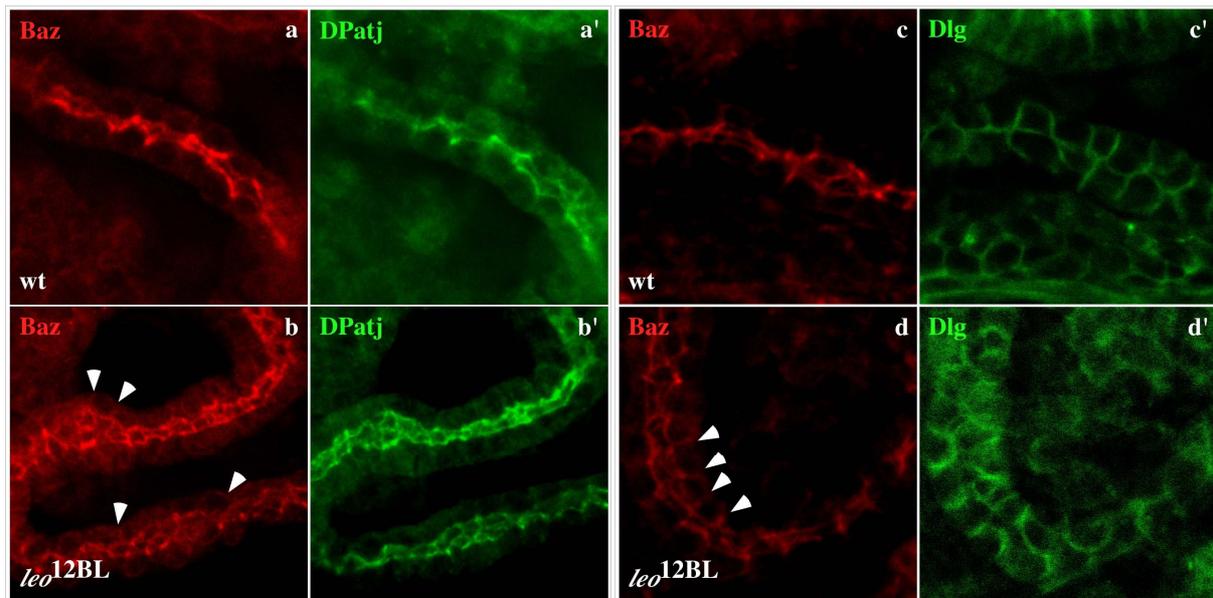


Abb. 3.2: In den MG von *leo*⁻-mutanten Embryonen ist die Lokalisation von Baz gestört. Antikörperfärbungen gegen Baz (rot in a, b, c und d), DPatj (grün in a' und b') und Dlg (grün in c' und d') an den MG von Embryonen in Stadium 15/16. a, a', c, c' Wildtyp. b, b', d, d' *leo*^{12BL}. a und c apikale Lokalisation von Baz in Wildtyp. b und d Baz ist in den MG von *leo*⁻-mutanten Embryonen auch an der lateralen Membran nachzuweisen (weiße Pfeilköpfe). a' DPatj ist in der wildtypischen Situation in der subapikalen Region lokalisiert. b' In *leo*⁻-Mutanten ist DPatj weiterhin korrekt apikal lokalisiert. c' Dlg ist in der wildtypischen Situation an der lateralen Membran lokalisiert. d' Die Lokalisation von Dlg ist in *leo*⁻-Mutanten nicht verändert.

3.1.2 In den MG von *leo*⁻-mutanten Embryonen sind Komponenten der ZA delokalisiert

Im Gegensatz zur teilweisen Aufrechterhaltung der Zellpolarität, die sich in der korrekten Lokalisation von DPatj und Dlg äußert, konnte in den MG von *leo*⁻-mutanten Embryonen eine Delokalisation der ZA-Komponente Armadillo (Arm, β -Catenin-Homolog) nachgewiesen werden (Abb. 3.3, d'). Zusätzlich wurde der Zustand der ZA mit einem gegen Phosphotyrosin gerichteten Antikörper untersucht, da Proteine mit phosphorylierten Tyrosinresten besonders stark in der ZA angereichert sind (Abb. 3.3 b'). Mit beiden Antikörpern zeigte sich, dass die ZA in den Zellen der MG in *leo*⁻-mutanten Embryonen nicht ausschließlich an der Grenze zwischen apikaler und lateraler Membrandomäne lokalisiert ist, sondern ZA-Bestandteile wie Armadillo und phosphorylierte Tyrosinreste auch in der lateralen Membrandomäne nachweisbar sind (Abb. 3.3 Pfeilköpfe in b' und d'). Die Delokalisation der ZA-Komponenten ist möglicherweise eine Folge der durch den Funktionsverlust von Leo hervorgerufenen Delokalisation des Baz-Proteins (Abb. 3.3 b und d).

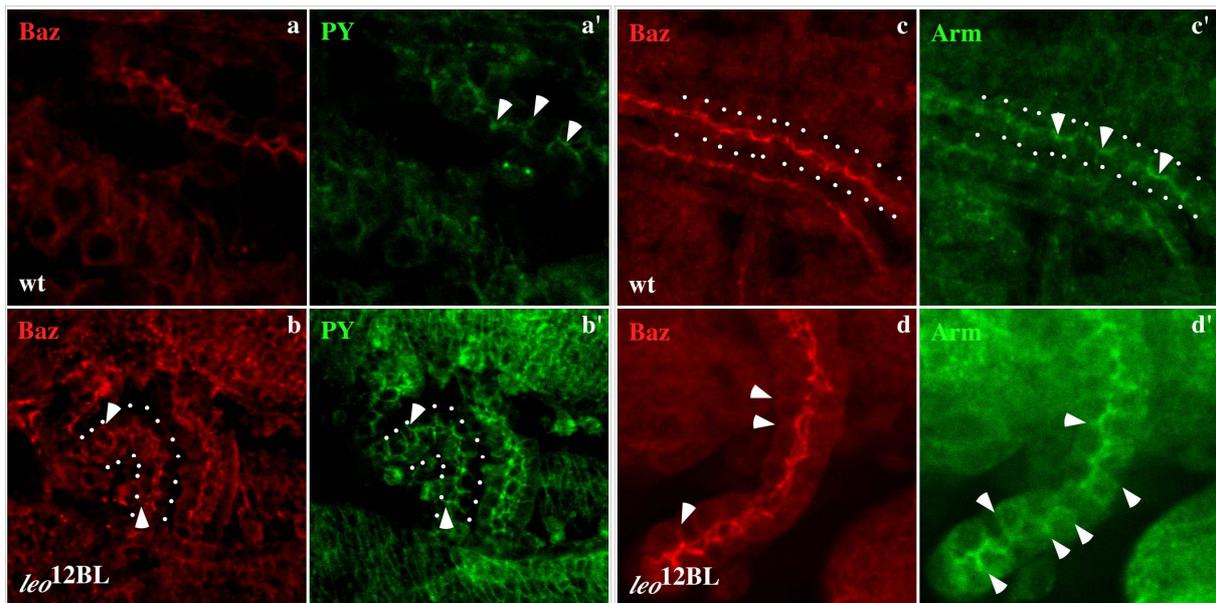


Abb. 3.3: In den MG von *leo*⁻-mutanten Embryonen sind ZA-Komponenten delokalisiert. Antikörperfärbungen gegen Baz (rot in **a-d**), Armadillo (grün, **c'** und **d'**) und Phosphotyrosin (grün, **a'** und **b'**) an den MG von Embryonen in Stadium 15/16. **a, a', c, c'** Wildtyp. **b, b', d, d'** *leo*^{12BL}. Im Wildtyp ist die ZA in den MG an der Grenze zwischen apikaler und basolateraler Membrandomäne lokalisiert. **a'** ZA markiert durch einen Antikörper gegen Phosphotyrosin (Pfeilköpfe). **c'** ZA markiert durch einen Antikörper gegen das Armadillo-Protein (Pfeilköpfe). **a** und **c** Baz ist im Wildtyp in der subapikalen Region lokalisiert. **b** und **d** Baz ist in *leo*⁻-Mutanten auch an der lateralen Membran lokalisiert (Pfeilköpfe). **b'** Phosphorylierte Tyrosinreste, die im Wildtyp stark in der ZA angereichert sind, können in den Zellen der MG von *leo*⁻-mutanten Embryonen auch an der lateralen Membran nachgewiesen werden (Pfeilköpfe). **d'** In den MG von *leo*⁻-mutanten Embryonen ist die ZA-Komponente Arm auch an der lateralen Membran detektierbar (Pfeilköpfe). Punkte in **b, b'** und **c, c'** markieren den Verlauf der MG.

3.1.3 Der Verlust von *leo* führt zu Morphogenesedefekten der Malpighischen Gefäße

Durch Antikörperfärbungen gegen das Cut-Protein, das in allen Zellkernen der die MG bildenden Zellen exprimiert ist, kann der Verlauf der MG sichtbar gemacht werden. In Mutanten werden so Defekte, die die Positionierung und die Elongation der MG betreffen, erkennbar. Die Analyse des durch den Funktionsverlust von *leo* hervorgerufenen Phänotyps in den MG zeigt große Ähnlichkeit zu dem von *baz*⁻-mutanten Embryonen. Beide Phänotypen zeichnen sich durch eine fehlerhafte Elongation der MG und durch die Fehlpositionierung der MG aus (Abb. 3.4). Dies deutet auf einen fehlerhaften oder unvollständigen Verlauf der konvergenten Extension der MG in *leo*⁻-mutanten Embryonen hin. Dies ist möglicherweise auf die Fehllokalisierung von Baz zurückzuführen und deutet darauf hin, dass die ausschließlich apikale Lokalisation von Baz für die Ausführung der konvergenten Extension in den MG nötig ist.

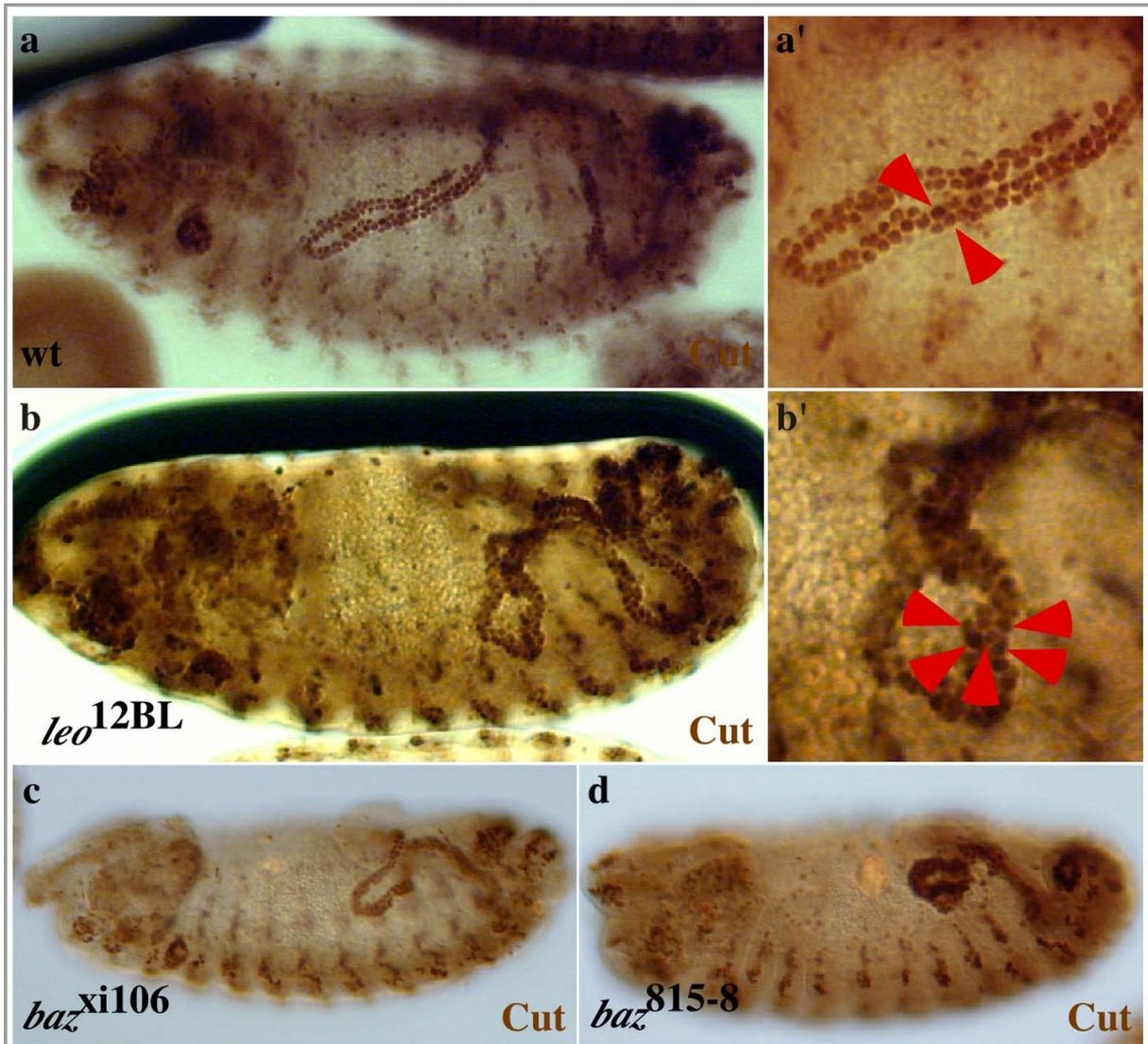


Abb. 3.4: leo^- -Mutanten zeigen ähnliche Defekte in den MG wie baz^- -Mutanten.

Antkörperfärbungen gegen das Cut-Protein (braun) an Embryonen in Stadium 16. Cut ist in den Zellkernen der MG exprimiert und markiert so deren Verlauf. **a, a'** Wildtyp. **b, b'** leo^{12BL} . **c** baz^{xi106} . **d** baz^{815-8} . **a** Die MG sind in Stadium 16 im Wildtyp vollständig elongiert und positioniert. **a'** In den elongierten MG wird das Lumen von jeweils zwei gegenüberliegenden Zellen begrenzt (rote Pfeilköpfe). **b** leo^- -mutante Embryonen zeigen Defekte in der Elongation und Positionierung der MG. **b'** Die unvollständige Elongation der MG ist in leo^- -Mutanten daran erkennbar, dass sich in den MG in Stadium 16 mehr als zwei Zellen gegenüberliegen (rote Pfeilköpfe). **c** und **d** Durch den Verlust der zygotischen Komponente von baz werden ebenfalls Defekte in der Elongation und der Positionierung der MG hervorgerufen (**c** baz^{xi106} und **d** baz^{815-8}). Anterior ist in allen Abb. links, dorsal oben.

3.1.4 Zusammenfassung

Baz ist in MG von *leo*⁻-mutanten Embryonen in späten Stadien delokalisiert, der apikale Marker DPatj und der laterale Marker Dlg werden in ihrer Lokalisation dadurch nicht beeinflusst. Die ZA-Komponente Arm und phosphorylierte Tyrosine, die im Bereich der ZA angereichert sind, sind hingegen in den MG von *leo*⁻-Mutanten ebenfalls delokalisiert und an der lateralen Membran detektierbar. Der Funktionsverlust von *leo* führt ebenso wie der von *baz* zu Störungen in der konvergenten Extension der MG. Die Defekte bei der konvergenten Extension bei gleichzeitiger Delokalisation von Baz in *leo*⁻-Mutanten deuten auf die Notwendigkeit der apikalen Lokalisation von Baz für die Morphogenese der MG hin.

3.2 Unterdrückung der *baz*-Funktion durch RNA-Interferenz (RNAi)

Um die Funktion eines Gens in einem bestimmten Gewebe zu untersuchen, ist zunächst die Analyse des durch den Funktionsverlust hervorgerufenen Phänotyps von Interesse. Dabei ist allerdings zu beachten, dass der Phänotyp in dem untersuchten Gewebe nicht nur durch den Verlust der Genfunktion in diesem direkt entstanden sein kann, sondern seine Ursache auch in der Schädigung umliegender, mit dem untersuchten Gewebe in Wechselwirkung stehender Gewebe haben kann. Diese Defekte sind sekundär und lassen keine Rückschlüsse auf die Rolle des Gens in diesem bestimmten Gewebe zu. Um sekundäre Effekte zu verhindern, muss der Verlust der Genfunktion auf das zu untersuchende Gewebe beschränkt werden, während die Genfunktion in allen anderen Geweben erhalten bleibt. Durch die Methode der RNA-Interferenz (RNAi) kann die Genfunktion von *baz* durch die Injektion doppelsträngiger RNA in Embryonen früher Stadien, vor der Zellularisierung, ubiquitär ausgeschaltet werden (Bachmann, 2000). Durch Keimbahntransformation ist es möglich, transgene Fliegen zu erzeugen, die doppelsträngige RNA unter der Kontrolle von UAS transkribieren können. Somit kann RNAi mit Hilfe des GAL4/UAS-Systems in bestimmten Geweben, die durch den verwendeten GAL4-Treiber festgelegt werden, induziert werden. Mit Hilfe dieser Methode sollten auf den Verlust von *baz* direkt zurückzuführende Defekte in den MG erzeugt und analysiert werden. Für das verwendete Konstrukt wurde ein Teil von *baz*, der 1862bp des translatierten Bereiches umfasst (Abb. 2.2 und Abb. 7.2), für den Erhalt von doppelsträngiger RNA in den pUAS-Vektor kloniert und mit Hilfe des GAL4/UAS-Systems in verschiedenen Geweben exprimiert. Es wurden ca. 30 transgene Fliegenstämme etabliert, in denen unabhängige Insertionsereignisse stattgefunden haben. Fünf Stämme, die Einzelinsertionen des Transgens tragen, wurden an Hand von Antikörperfärbungen auf ihre Fähigkeit hin, die Genfunktion von *baz* auszuschalten, analysiert. Durch Kreuzung wurde ein Fliegenstamm hergestellt, der Insertionen des Konstruktes *UASbazri* auf den Chromosomen 1, 2 und 3 trägt (Bezeichnung: 112.3; 3.7; 18.3.2/TM6). Die erhöhte Zahl der Kopien sollte zur Bereitstellung von mehr doppelsträngiger RNA und somit zur stärkeren Reduktion des endogenen Baz-Proteins führen.

3.2.1 In Embryonen wird durch induzierbare RNAi nur eine schwache Proteinreduktion von Baz erreicht

Um Aussagen über die Stärke der Proteinreduktion, bedingt durch RNAi, zu machen, wurde das *UASbazri*-Konstrukt mit Hilfe eines GAL4-Treibers, der unter der Kontrolle des Promotors für das Gen *engrailed* (*en*) steht, exprimiert. *en* ist ein Segmentpolaritätsgen, welches in 14 Streifen jeweils im posterioren Teil jedes Segments des Embryos exprimiert wird. Das Expressionmuster des *enG4*-Treibers bietet somit den Vorteil, wildtypische Bereiche mit angrenzenden, das Konstrukt exprimierenden Bereichen innerhalb des Epidermisepithels direkt vergleichen zu können. Es wurden verschiedene Fliegenstämme, die Einzelinsertionen des Transgens tragen, als auch ein Stamm, in dem drei Insertionen des Konstruktes vorliegen, mit dem gleichen Ergebnis getestet. Bei Verwendung des *enG4*-Treibers (Abb. 3.5), sowie des ubiquitären *daG4*-Treibers (GAL4 wird unter der Kontrolle des *daughterless*-Promotors exprimiert) und spezifischer Treiber für die MG konnte keine oder nur eine sehr geringe Reduktion des Baz-Proteins erreicht werden. Mit allen verwendeten Treibern konnten keine frühen embryonalen Phänotypen erzeugt werden.

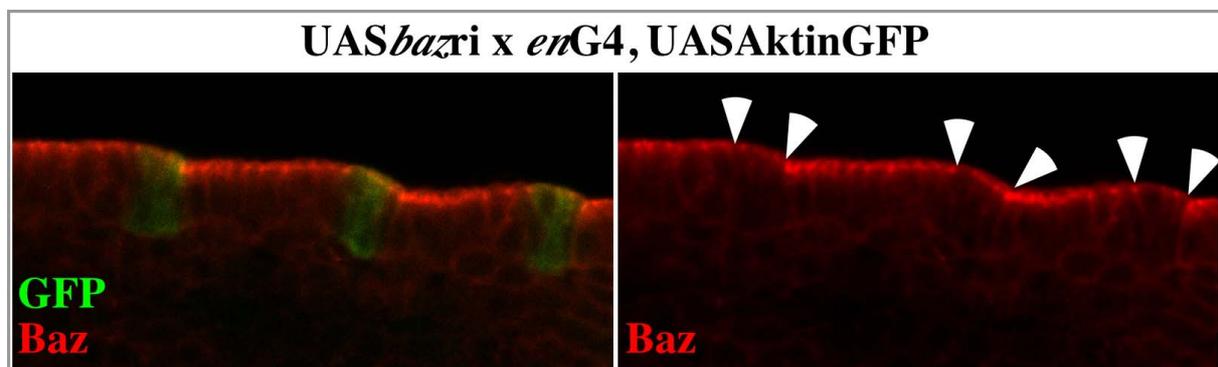


Abb. 3.5: Die Expression von *UASbazri* mit dem *enG4*-Treiber führt zu einer leichten Reduktion von *Baz*. Die Abbildungen zeigen optische Sagittalschnitte durch das Epidermisepithel von Embryonen, die doppelsträngige *baz*-RNA (verwendet wurde der Fliegenstamm mit der Einzelinsertion 3.6) unter der Kontrolle des *en*-Promotor exprimieren. Zur Kennzeichnung der das Konstrukt exprimierenden Regionen wurde gleichzeitig ein an Aktin fusioniertes GFP (Green Fluorescent Protein, grün), das sich ebenfalls unter der Kontrolle von UAS befindet, exprimiert. Die weißen Pfeilköpfe zeigen auf Regionen, in denen eine Reduktion von *Baz* (rot) zu erkennen ist.

3.2.2 Die Expression von UAS*bazri* ist in weniger als 20 % der untersuchten Tiere embryonal letal und erzeugt Defekte in der späten Embryogenese

An Hand von Antikörperfärbungen konnten in Embryonen keine aus der schwachen Reduktion des Baz-Proteins resultierenden Defekte epithelialer Zellpolarität identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Die Durchführung von Letalitätstest ergab, dass bei Verwendung des *enG4*-Treibers 11 % (Tab. 3.1), bei Verwendung des *daG4*-Treibers 19 % (Tab. 3.2) der Embryonen, die UAS*bazri* (112.3; 3.7; 18.3.2/TM6) exprimieren, sterben. In Eiablagen von Wildtypen beträgt die embryonale Letalität ca. 4 %, die durch den RNAi-Effekt nur leicht erhöht wird. Auf Grund der zygotischen Funktion von *baz* bei der Embryogenese ist eine embryonale Letalität von 100% zu erwarten, wenn durch RNAi die Genfunktion von *baz* vollständig ausgeschaltet werden kann. Wird der *en-G4*-Treiber für die Expression des Konstruktes verwendet, sterben ca. 56 % der Tiere in larvalen Stadien, ca. 7 % arretieren im Puppenstadium und 25 % entwickeln sich zu lebensfähigen adulten Fliegen (Tab. 3.1). Bei Verwendung des ubiquitären *daG4*-Treibers entwickeln sich nur 0,2% der Tiere zu adulten Fliegen, die pupale Letalität liegt bei 43 %, während ca. 39 % der Tiere als Larven sterben (Tab. 3.2). Somit wird durch die Reduktion von *baz* mittels RNAi-Interferenz die Lebensfähigkeit der Tiere hauptsächlich in Stadien nach der embryonalen Entwicklung reduziert. Das spricht dafür, dass die durch den RNAi-Effekt bedingte Reduktion des Baz-Proteins in den meisten Fällen eine normale Embryonalentwicklung erlaubt. Erst in larvalen und pupalen Stadien kommt es zu starken Entwicklungsdefekten, die zum Tod führen.

UAS <i>bazri</i> (112.3; 3.7; 18.3.2/TM6) x <i>enG4</i>	beobachtet	errechnet	
Zahl entwicklungsfähiger Eier	293	entwicklungsfähige	100 %
Liegengebliebene Embryonen, mit Kutikula	33	embryonal letal	11,3 %
Tot als Puppe	21	pupal letal	7,2 %
Geschlüpfte Fliegen	74	vital	25,3 %
		larval letal	56,2 %

Tab. 3.1: Letalitätstest der Kreuzung UAS*bazri* x *enG4*

UAS <i>bazri</i> (112.3; 3.7; 18.3.2/TM6) x <i>daG4</i>	beobachtet	errechnet	
Zahlentwicklungsfähiger Eier	488	entwicklungsfähige	100 %
Liegegebliebene Embryonen, mit Kutikula	94	embryonal letal	19 %
Tot als Puppe	210	pupal letal	43 %
Geschlüpfte Fliegen	1	vital	0,2 %
		larval letal	37,8 %

Tab. 3.2: Letalitätstest der Kreuzung UAS*bazri* x *daG4*

Anhand von Kutikula Präparationen ließ sich feststellen, dass die embryonale Letalität bei Expression der RNAi-Konstruktes für *baz* durch Defekte in späten Entwicklungsstadien hervorgerufen wird. Bei der Kutikula handelt es sich um ein Sekretionsprodukt verschiedener ektodermaler Epithelien (z.B. der Epidermis), die am Ende der Embryonalentwicklung gebildet wird. Die Kutikulastruktur erlaubt Rückschlüsse auf den Zustand dieser Kutikula-sekretierenden Gewebe. Neben regelmäßig angeordneten ventralen Zähnchenbändern lässt sich in Kutikulapräparationen u. a. das Kopfskelett identifizieren. Die Nachkommen aus den Kreuzungen *enG4* x UAS*bazri* (112.3; 3.7; 18.3.2/TM6) und *daG4* x UAS*bazri* (112.3; 3.7; 18.3.2/TM6) zeigen Defekte bei der Invagination des Kopfskelettes, wodurch in der Kutikula ein großes anteriores Loch entsteht (Abb. 3.6, b und c, markiert durch einen Stern). Frühe Defekte z. B. bei der Segmentierung, die sich in Kutikulapräparationen durch die Fusion der ventralen Zähnchenbänder äußern, lassen sich nicht identifizieren (Abb. 3.6, b und c). An Hand der Kutikulastruktur ist erkennbar, dass die Integrität des Epidermisepithels weitgehend erhalten bleibt, demnach ist die Reduktion des Baz-Proteins mittels induzierter RNA-Interferenz nicht stark genug, um die Funktion von Baz bei der Etablierung und Aufrechterhaltung der Polarität dieses Epithels zu stören.

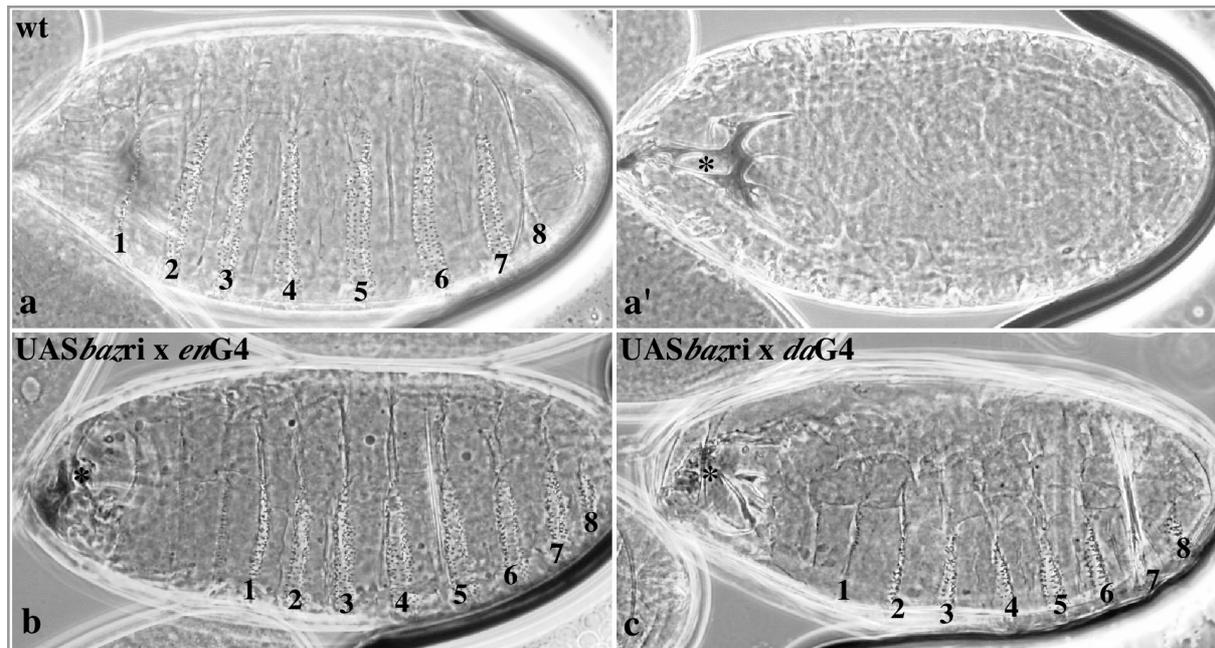


Abb. 3.6: Die Expression von UASbazri im Embryo erzeugt Defekte bei der Ausbildung des Kopfskeletts. **a** Wildtypische Kutikula, im Fokus die ventralen Zähnchenbänder (1-8). **a'** Wildtypische Kutikula, im Fokus das Kopfskelett (Stern). **b** und **c** Die Expression von UASbazri (112.3; 3.7; 18.3.2/TM6) mit dem *enG4*-Treiber (**b**) und dem *daG4*-Treiber (**c**) führt zu Defekten bei der Invagination des Kopfskeletts, erkennbar durch ein großes, anteriores Loch in der Kutikula (Stern). Die Zähnchenbänder sind normal ausgebildet. Anterior ist in allen Abb. links, dorsal oben.

3.2.3 Durch die Reduktion von Baz mittels RNAi entstehen Defekten im adulten Flügel

Da die Expression von UASbazri hauptsächlich Letalität in larvalen und pupalen Stadien erzeugt und adulte Tiere bei Verwendung der Treiber *enG4* und *ptcG4* Flügeldefekte aufweisen, wurde das Ausmaß der Proteinreduktion in Flügelimaginalscheiben von L3-Larven mit Hilfe von Antikörperfärbungen untersucht. Imaginalscheiben sind sackartige Einfaltungen des embryonalen Epidermisepithels, aus denen während der larvalen und pupalen Entwicklung die Körperanhänge gebildet werden. Die Flügelimaginalscheibe ist in ein anteriores und ein posteriores Kompartiment unterteilt. Das Gen *en* wird im gesamten posterioren Kompartiment exprimiert, die *ptc*-Expression ist auf einen schmalen Streifen entlang der Kompartimentsgrenze beschränkt (Abb. 3.7, b, c). Bei Expression des UASbazri-Konstruktes mit dem *enG4*-Treiber kann im posterioren Kompartiment die Reduktion des Baz-Proteins nachgewiesen werden (Abb. 3.7, c Pfeil zeigt von der Kompartimentsgrenze nach posterior). Erfolgt die Expression unter der Kontrolle des *ptc*-Promotors, kommt es zur Reduktion von Baz entlang der Kompartimentsgrenze (Abb. 3.7 d, Pfeile begrenzen den Expressionsbereich von *ptc*). Die Kompartimentsgrenze bleibt auch im adulten Flügel

erhalten. Das posteriore Kompartiment zeichnet sich weiterhin durch die Expression von *en* aus (Abb. 3.7, a), entlang der Kompartimentsgrenze, im Bereich zwischen der zweiten und dritten Längsvene wird *ptc* exprimiert (Abb. 3.7, b, die Kompartimentsgrenze ist in Rot eingezeichnet). Die Reduktion von Baz im adulten Flügel mit dem *enG4*-Treiber führt zur Ausbildung von ektopischen campaniforme Sensillen auf dem posterioren Flügelblatt (Abb. 3.7, c, rote Pfeilköpfe). Campaniforme Sensillen sind Teil des peripheren Nervensystems und im Wildtyp auf den Flügelvenen und auf dem anterioren Flügelrand angeordnet. Die Reduktion von Baz im *ptc*-Expressionsmuster führt zum Verlust der ersten Quervene, die im Expressionsbereich liegt (Abb. 3.7, f roter Pfeilkopf). Die beiden Längsvenen, die den Expressionsbereich begrenzen, liegen näher beieinander (Abb. 3.7, f, gelbe Pfeilköpfe). In den Fliegen mit adulten Phänotypen reicht der apikal lokalisierte Anteil des Baz-Proteins aus, um die embryonale Entwicklung zu gewährleisten, die fortdauernde Reduktion von Baz durch RNA-Interferenz im larvalen und pupalen Flügel führt aber zur Ausbildung von leichten Morphogenesedefekten. Die hohe larvale Letalität bei Verwendung des *enG4*-Treibers ist vermutlich auf die Expression von *en* in Teilen des Nervensystems zurückzuführen.

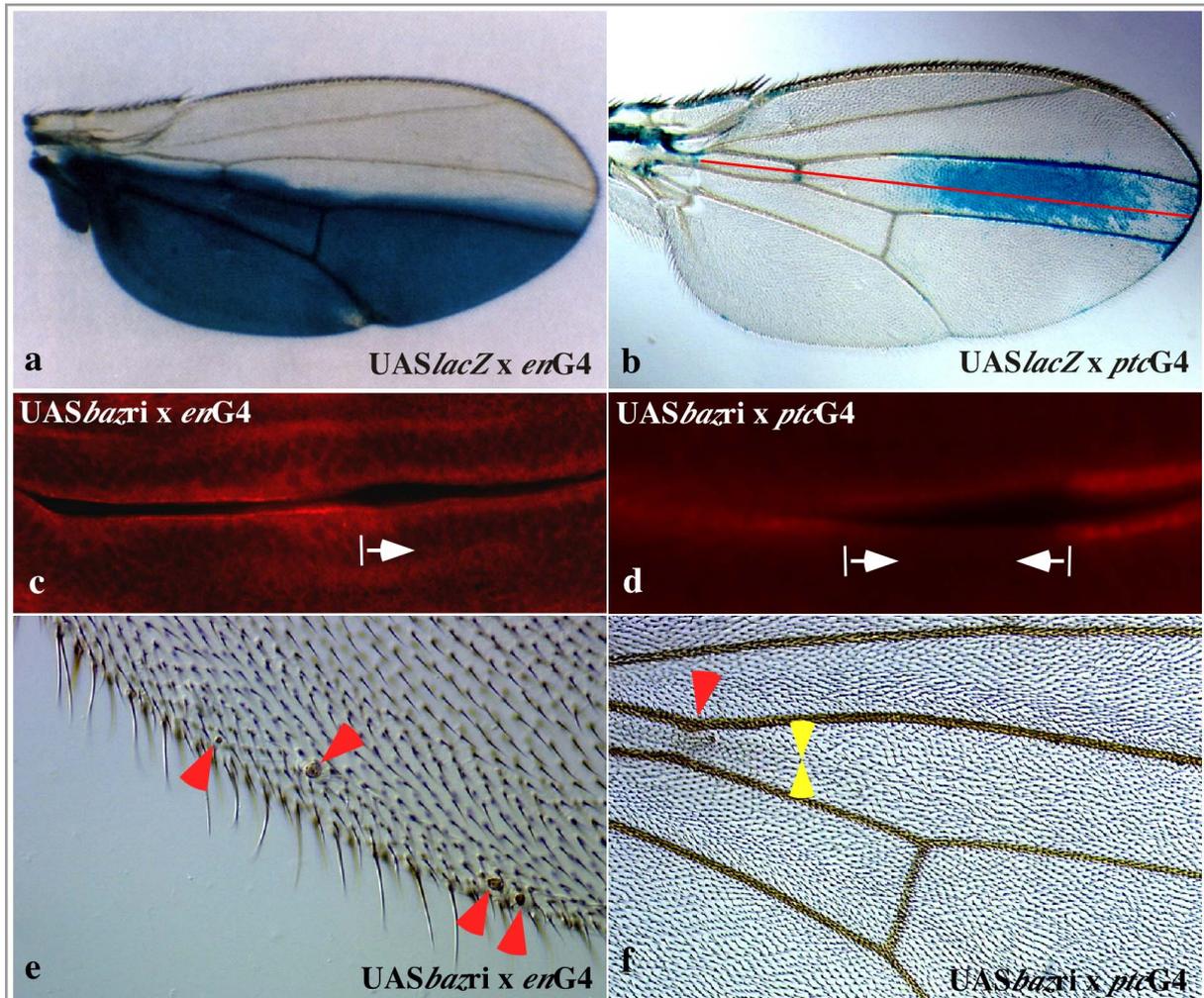


Abb. 3.7: Die Reduktion von Baz mittels RNAi führt zu Defekten in der Flügelentwicklung. a, b Adulte Flügel, angefärbt durch eine enzymatische X-GAL-Farbreaktion **c, d** Antikörperfärbungen an L3-Imaginalschieben gegen das Baz-Protein (rot). **e, f** Adulte Flügel, die UASbazri (112.3; 3.7; 18.3.2/TM6) exprimieren. **a** Expressionsbereich des *enG4*-Treibers im gesamten posterioren Kompartiment des adulten Flügels, durch das Reportergen *lacZ* sichtbar gemacht. **b** Expressionsbereich des *ptcG4*-Treibers im Bereich zwischen der 2. und 3. Längsvene in einem Streifen entlang der Kompartimentsgrenze (rote Linie), durch das Reportergen *lacZ* sichtbar gemacht. **c** und **d** Reduktion des Baz-Proteins in den das RNAi-Konstrukt exprimierenden Bereichen im Imaginalscheibenepithel durch eine Antikörperfärbung gegen das Baz-Protein sichtbar gemacht (**c**: *enG4*, **d**: *ptcG4*, Pfeile markieren die Grenzen des Expressionbereichs). **e** Die Expression von UASbazri mit dem *en*-Treiber führt zur Entstehung ektopischer campaniformer Sensillen im posterioren Kompartiment des Flügels (rote Pfeilköpfe). **f** Die Expression von UASbazri im *ptc*-Expressionsmuster führt zum Verlust der im Expressionbereich liegenden Querveine (roter Pfeilkopf). Der Abstand der Längsvenen ist verringert (gelbe Pfeilköpfe). Abb. **a, b, e, f**, anterior ist oben, proximal rechts. Abb. **c** und **d**, anterior ist rechts. Abb. **a**: (Cohen, 1993)

3.2.4 Zusammenfassung

Mit der Methode der induzierten RNAi kann in Embryonen nur eine schwache Reduktion der Menge an Baz-Protein erreicht werden.

Auch bei Verwendung ubiquitärer Treiber führt die Reduktion der Genfunktion von *baz* durch RNAi nur zu einer embryonalen Letalität von 20 %.

An Hand der Kutikulastruktur ist zu erkennen, dass die Integrität des Epidermisepithels, vermutlich bedingt durch die nur schwache Reduktion des Baz-Proteins, erhalten bleibt. Es kommt aber zu Defekten bei der Invagination des Kopfes, die auf Störungen in der späten Embryogenese hindeuten. In larvalen Flügelimaginalscheiben wird eine deutliche Reduktion des Baz-Proteins bewirkt, was zu Defekten in der Morphogenese des Flügels führt. Auch hier bleibt die Integrität des Epithels erhalten. Verschiedene Marker für apikobasale Zellpolarität sind im Epithel der Flügelimaginalscheibe trotz der Reduktion von Baz korrekt lokalisiert (Daten nicht gezeigt).

3.3 Untersuchungen zur Funktion von Baz bei der Ausbildung von planarer Polarität

In den MG können sowohl bei Verlust als auch bei Delokalisation von Baz Fehler bei der konvergenten Extension beobachtet werden. Die apikobasale Zellpolarität bleibt weitgehend erhalten. Es kann daher angenommen werden, dass die apikale Lokalisation von Baz in den MG Informationen für die räumliche Neuordnung der Zellen während der Elongation bereitstellt. Eine Möglichkeit, diese Information über die apikale Lokalisation von Baz zu vermitteln, ist die Beschränkung von Baz auf bestimmte kortikale Regionen. Es konnte z. B. gezeigt werden, dass die asymmetrische Verteilung von Baz entlang des Zellquerschnitts für die konvergente Extension, die zur Keimstreifstreckung im *Drosophila* Embryo führt, wichtig ist. (Zallen and Wieschaus, 2004). Die Polarisierung der Zellen in der Ebene des Gewebes, diese drückt sich hierbei auch in der asymmetrischen Verteilung von Baz aus, ist Voraussetzung für die Interkalation der Zellen entlang der dorso-ventralen Achse, die zur Streckung des Keimstreifs entlang der anterior-posterioren Achse des Embryos führt. Die asymmetrische subzelluläre Lokalisation von Baz konnte in den Zellen der MG mit Hilfe von Antikörperfärbungen, die durch konfokale Lasermikroskopie ausgewertet wurden, nicht analysiert werden. Dies liegt vor allem daran, dass die räumliche Anordnung der Zellen zu einem Tubulus die Identifizierung und Unterscheidung der verschiedenen kortikalen Membrandomänen erschwert.

In Vertebraten beruht die konvergente Extension auf Komponenten, die Mitglieder des Frizzled-abhängigen Signalweges sind und die in *Drosophila* an der Ausprägung von planarer Zellpolarität (planar cell polarity, PCP), auch Gewebepolarität genannt, beteiligt sind (Tada et al., 2002; Wallingford et al., 2002) In adulten Fliegen sind die Ausrichtung von Haaren und Borsten auf dem Flügel und dem Körper und die Anordnung der Ommatidien im Komplexauge sichtbare Zeichen planarer Zellpolarität. Da der Flügel ein an Hand von Antikörperfärbungen in allen Entwicklungsstadien gut zu untersuchendes System darstellt, gelang es hieran, die Rolle von Baz bei der Ausbildung von Gewebepolarität zu untersuchen.

3.3.1 Die Überexpression von *baz* führt zur Störung der planaren Polarität im Flügelepithel

Die Überexpression von Baz führt dazu, dass in adulten Flügeln die Haare nicht wie im Wildtyp entlang der proximal-distalen-Achse des Flügels ausgerichtet sind. Die Entstehung von Wirbeln (Abb. 3.8, b' und d') ist vermutlich auf die Existenz eines Mechanismus zurückzuführen, der die Ausrichtung von Flügelhaaren benachbarter Zellen miteinander koordiniert (Usui et al., 1999) und der durch die Überexpression von *baz* nicht beeinflusst wird. Im pupalen Flügelepithel bildet jede Zelle ein Haar aus. Dies kann, da es eine aktinreiche Struktur ist, mit Hilfe von fluoreszenzmarkiertem, aktinbindendem Phalloidin sichtbar gemacht werden (Abb. 3.8, e'). So wurde der Überexpressionsphänotyp von Baz, bezogen auf die Positionierung der Haare, in pupalen Flügeln genauer untersucht (Abb. 3.8, f-f''). Zudem wurde die subzelluläre Lokalisation von Baz, mit Hilfe eines gegen Baz gerichteten Antikörpers, in der Überexpression und im Wildtyp analysiert (Abb. 3.8, e-f''). In wildtypischen pupalen Flügeln ist Baz am apikalen Zellkortex sowohl an den anterior-posterioren Zellgrenzen, als auch an den proximo-distalen Zellgrenzen der hexagonalen Zellen des Flügelepithels lokalisiert (Abb. 3.8, e). Das Flügelhaar entspringt im Wildtyp am distalen Zellkortex und ist nach distal ausgerichtet (Abb. 3.8, e). Die Überexpression führt zur Erhöhung der Menge des apikal lokalisierten Baz-Proteins und zur Anreicherung des Proteins im Zytoplasma, was zu Zellformveränderungen in den *baz* überexprimierenden Zellen führt (Abb.3.8, vergleiche f mit e). Das solitäre Haar ist im überexprimierenden Bereich entweder in der Mitte der apikalen Zelloberfläche positioniert oder zufällig an der Peripherie angeordnet, eine wildtypische Positionierung am distalen apikalen Zellkortex ist selten zu beobachten (Abb. 3.8 f' u. f''). In wenigen Zellen kommt es zur Bildung von zwei Haaren (Abb. 3.8 f' u. f'', gelber Pfeilkopf). Überexprimierende Zellen, die in Kontakt zu wildtypischen Bereichen stehen, zeigen eine korrekte Anordnung des Haares (Abb. 3.8 f'', blaue Punkte), das gleiche gilt für an die überexprimierende Region angrenzende, wildtypische Zellen (Abb. 3.8 f'', blaue Kreise). Bei Verwendung des *enG4*-Treibers zur Überexpression von *baz* ist neben Störungen der PCP eine starke Verkürzung des posterioren Flügelkompartiments zu beobachten. Der Überexpressionsphänotyp von *baz* zeigt, bezogen auf die Defekte der PCP, Ähnlichkeit zu den Phänotypen, die durch den Funktionsverlust der PCP-Komponenten hervorgerufen werden. Der Funktionsverlust jedes einzelnen der Gene *dsh*, *stbm*, *fmi*, *pk* und *dgo* führt zu ähnlichen Defekten der planaren Polarität, außerdem ist

auch hierbei die Anordnung der Flügelhaare in Wirbeln zu beobachten (Adler, 1992; Usui et al., 1999; Wong and Adler, 1993). Auch bezogen auf die Positionierung des Haares in der Zelle entspricht der durch Überexpression von Baz hervorgerufene Phänotyp dem, der durch den Funktionsverlust der genannten Gene entsteht. Hinsichtlich der Zellformveränderungen, der Verkürzung der Flügelanteile und der Ausrichtung der Flügelhaare besteht auch starke Ähnlichkeit zum Verlustphänotyp von *dachsous* (*ds*), einem Gen, das „upstream“ zu den oben genannten Komponenten agiert (Adler et al., 1998). Mutationen in ‚downstream‘ zu den PCP-Komponenten agierenden Genen verändern die Ausrichtung der Flügelhaare zueinander oder führen zur Ausbildung von multiplen Flügelhaaren in jeder Zelle (Adler, 2002; Eaton, 2003), zu diesen Phänotypen besteht somit keine Ähnlichkeit.

Für die Überexpression wurde ein Konstrukt verwendet, das die gesamte cDNA von *baz* im pUAS-Vektor beinhaltet (Kuchinke et al., 1998). Die durch GAL4 initiierte Transkription führt zum Erhalt eines in seiner Funktion wildtypischen Baz-Proteins. *baz*⁻-mutante Embryonen können durch die Überexpression dieses UAS*baz*-Konstruktes bei Verwendung eines ubiquitären G4-Treibers zur Lebensfähigkeit hin gerettet werden (Kuchinke et al., 1998). Daher sind die erzeugten Überexpressionsphänotypen im Flügelepithel auf die Expression des wildtypischen *baz*-Gens zurückzuführen.

Abb. 3.8, nächste Seite: Die Überexpression von *baz* führt zur Störung der planaren Polarität im Flügel. **a, c** Adulte Flügel, angefärbt durch eine enzymatische X-GAL-Farbreaktion. **b, b', d, d'** Adulte Flügel, die UAS*baz*6.3 überexprimieren. **e, e', e'', f, f', f''** Antikörperfärbungen an pupalen Flügeln gegen das Baz-Protein (rot) und mit FITC-Phalloidin (grün). **a** Expressionsbereich des *ptcG4*-Treibers im Bereich zwischen der 2. und 3. Längsvene in einem Streifen entlang der Kompartimentsgrenze (rote Linie), durch das Reportergen *lacZ* sichtbar gemacht. **b, b'** Die Überexpression von *baz* mit dem *ptcG4*-Treiber führt zu Defekten bei der Ausbildung der ersten Querverne (b, roter Pfeilkopf) und zur Störung der PCP im Expressionsbereich (b', rote Linie markiert die A/P-Kompartimentsgrenze). **c** Expressionsbereich des *enG4*-Treibers im gesamten posterioren Kompartiment des adulten Flügels, durch das Reportergen *lacZ* sichtbar gemacht. **d** Die Überexpression von *baz* mit dem *enG4*-Treiber führt zur Verkürzung des posterioren Kompartiments, was die Krümmung des Flügels zur Folge hat (gestrichelte Linie). **d'** In der Vergrößerung sind Venendefekte (rote Pfeilköpfe) und Störungen der PCP im gesamten posterioren Kompartiment zu sehen (Kompartimentsgrenze markiert durch eine Pfeil). **e** Lokalisation von Baz im Flügelepithel 33 h nach Eintritt in die pupale Entwicklung an allen Zellgrenzen im Wildtyp. **e'** Färbung der aktinreichen Flügelhaare im Wildtyp. **e''** Überlagerung: die nach distal ausgerichteten Flügelhaare entspringen am distalen Zellkortex. **f** Durch die Überexpression wird Baz verstärkt am apikalen Zellkortex akkumuliert, ist an der gesamten apikalen Oberfläche der Zelle und im Zytoplasma zu finden. Im *baz*-überexprimierenden Bereich ist die Zellform verändert (vergleiche mit **e**). **f'** Im *baz*-überexprimierenden Kompartiment sind die Flügelhaare nicht nach distal orientiert. **f''** Überlagerung: Die Flügelhaare sind innerhalb der überexprimierenden Zellen falsch positioniert. Benachbarte wildtypische Zellen zeigen eine korrekte Ausrichtung und Positionierung der Flügelhaare (blaue Punkte). An wildtypische Zellen angrenzende *baz*-überexprimierende Zellen zeigen ebenfalls die wildtypische Positionierung und Ausrichtung der Flügelhaare (blaue Kreise). Selten kommt es zur Ausbildung von zwei Haaren in einer Zelle (gelber Pfeilkopf). Anterior ist in allen Abb. oben, distal rechts. Abb. c: (Cohen, 1993).

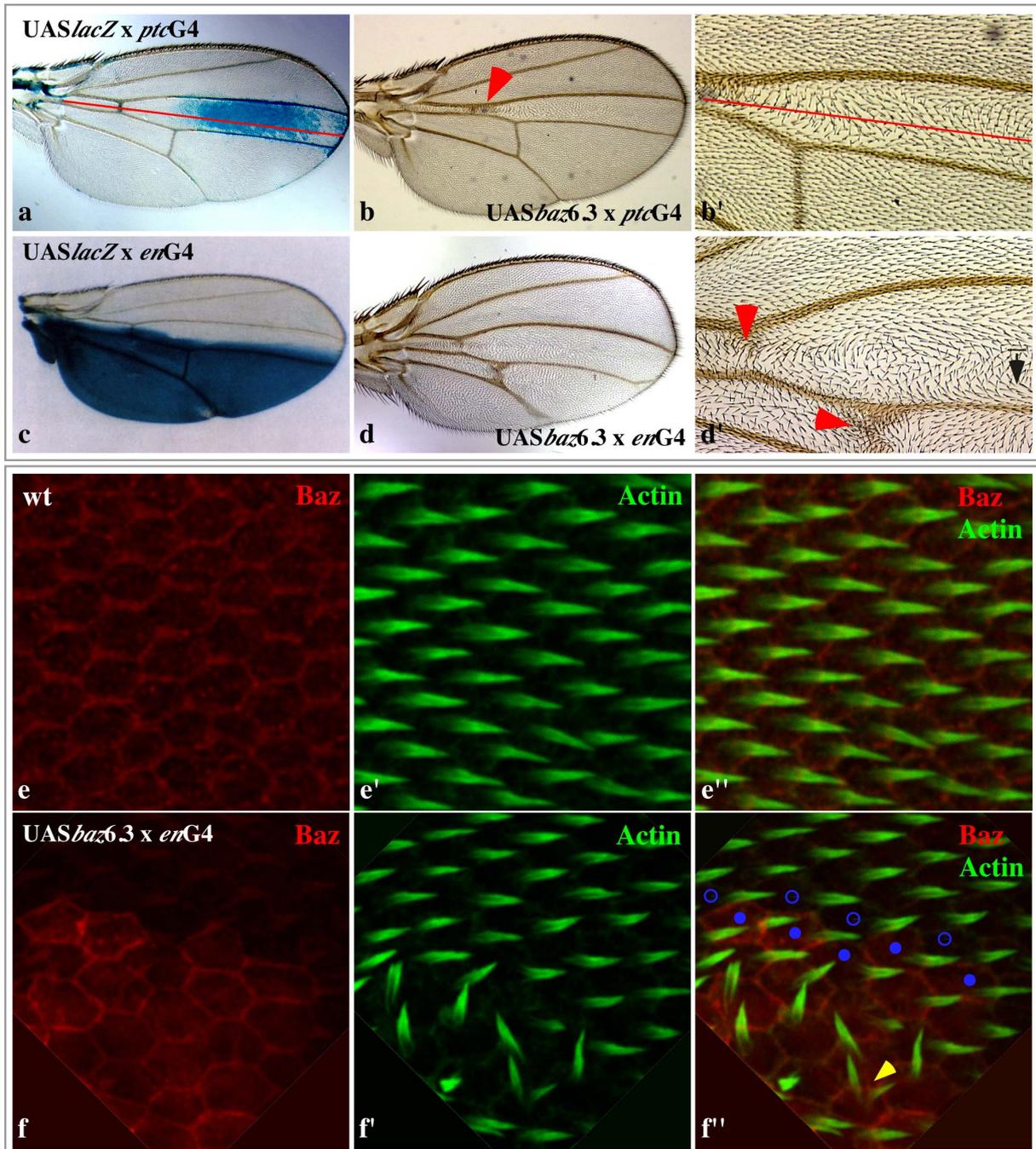


Abb. 3.8, Erklärung auf der vorherigen Seite

3.3.2 Die Überexpression von *baz* stört die apikobasale Zellpolarität im Epithel der Flügelimaginalscheibe nicht

Da die korrekte Ausbildung der apikobasalen Zellpolarität die Voraussetzung für die Ausbildung von planarer Polarität in einem Gewebe darstellt (Eaton, 2003), wurde zunächst untersucht, ob die Überexpression von *baz* die Zellpolarität in Imaginalscheiben von L3-Larven beeinflusst. Zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung liegen die Flügelanlagen als Imaginalscheiben, das sind eingefaltete Säckchen epidermaler Zellen, vor. Diese entfalten sich in der sich dem Larvenstadium anschließenden pupalen Entwicklung zu Flügeln. Die Zellen der Imaginalscheiben weisen eine von dem Epidermisepithel übernommene apikobasale Polarität auf. In wildtypischen Zellen von L3-Flügelimaginalscheiben sind DPatj, ein Mitglied des Crb-Komplexes sowie die Komponenten des Baz-Komplexes, Baz, DmPar-6 und DaPKC, apikal zur ZA in der sog. subapikalen Region lokalisiert (Abb. 3.9 b, c, d). Basal zur ZA an der lateralen Membran ist Dlg, assoziiert mit den SJ, lokalisiert (Abb. 3.9 g). Das Aktinzytoskelett zeigt eine starke Akkumulation an den apikalen Zellkontakten (3.9 f). Durch die Überexpression von *baz* wird das Baz-Protein auch im Zytoplasma und an den lateralen Membranen lokalisiert. Alle untersuchten Marker für Zellpolarität werden durch die Überexpression von *baz* in ihrer Lokalisation nicht verändert (3.9 b, c, d, g). Ebenso hat die Überexpression keinen Einfluss auf die Lokalisation der ZA und den Aufbau des Aktinzytoskeletts (3.9 e, f). Da die Zellen der Flügelanlage in L3 Larven trotz der Überexpression von Baz und der damit verbundenen ektopischen Akkumulierung im Zytoplasma und an der lateralen Membran eine normale apikobasale Polarität aufweisen, ist anzunehmen, dass Baz eine direkte Rolle bei der folgenden Etablierung von planarer Polarität in der pupalen Flügelentwicklung spielt.

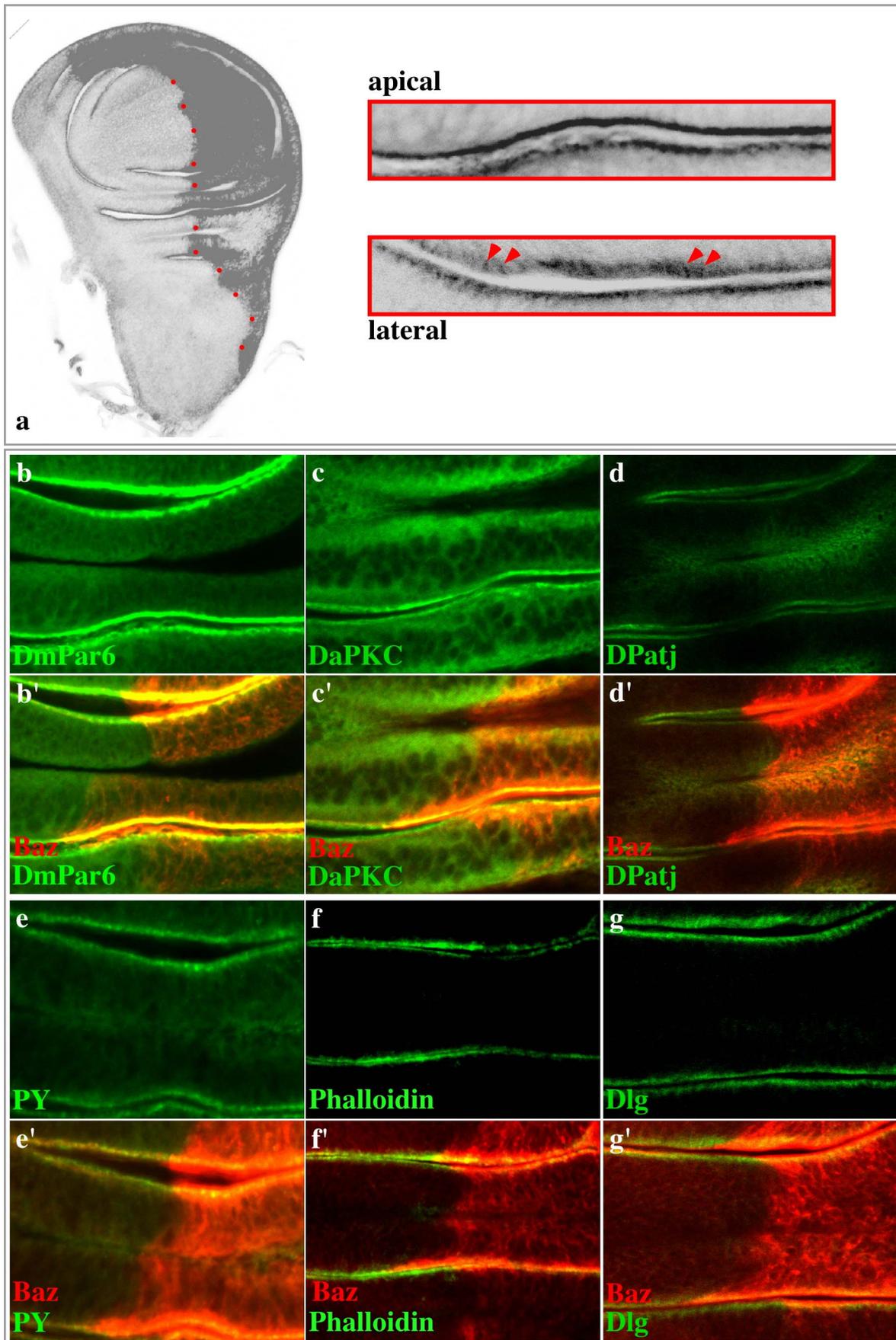


Abb. 3.9, Erklärung auf der nächsten Seite

Abb. 3.9, vorherige Seite: Im Imaginalscheibenepithel hat die Überexpression von *baz* keinen Einfluss auf die Zellpolarität. Antikörperfärbungen an Imaginalscheiben, die *baz* im posterioren Kompartiment mit dem *enG4*-Treiber überexprimieren. **a** L3-Imaginalscheibe: sichtbar ist die Expressionsdomäne von *en*, das posteriore Kompartiment. (schwarz, die Kompartimentsgrenze ist durch rote Punkte gekennzeichnet). Die Vergrößerungen zeigen Ausschnitte aus dem Imaginalscheibenepithel, in denen die apikale bzw. die laterale Membran (rote Pfeilköpfe) mit Antikörperfärbungen gegen Par-6 (apikal) und Dlg (lateral) sichtbar gemacht wurde. **b-g'** Ausschnittvergrößerungen aus dem Bereich der Kompartimentsgrenze. **b**, DmPar-6, **c**, DaPKC und **d** DPatj sind im *baz*-überexprimierenden Kompartiment normal apikal lokalisiert (vergleiche anteriores Kompartiment). **e** Die Lokalisation von phosphorylierten Tyrosinresten im Bereich der ZA wird durch die Überexpression von *baz* nicht beeinflusst. **f** Im überexprimierenden Bereich sind keine Veränderungen des Aktinzytoskeletts sichtbar. **g** Dlg ist im *baz*-überexprimierenden Kompartiment weiterhin wildtypisch an der lateralen Membran lokalisiert. **b', c', d', e', f', g'** Die Überexpression von *baz* führt neben der apikalen Anreicherung zur Ansammlung des Baz-Proteins (rot) im Zytoplasma und an den lateralen Membranen. Anterior ist in allen Abbildungen links.

3.3.3 Die Überexpression von *baz* bewirkt die Delokalisierung von Flamingo in pupalen Flügeln

Für die Positionierung des Flügelhaares muss zunächst die Identität des distalen und des proximalen Zellkortex durch die asymmetrische Verteilung verschiedener an der Ausbildung von PCP beteiligter Proteine festgelegt werden. Die durch die Überexpression von *baz* hervorgerufenen Störungen der PCP lassen vermuten, dass hier die asymmetrische Verteilung dieser Komponenten gestört wird. Um den Einfluss von Baz auf die Verteilung dieser Proteine zu untersuchen, wurden Antikörperfärbungen an pupalen Flügeln, die *baz* im posterioren Kompartiment überexprimieren, durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die Überexpression von Baz die asymmetrische Verteilung von Flamingo (Fmi) stört (Abb. 3.10, a und b). Beim Fmi-Protein handelt es sich um ein atypisches Cadherin, welches bis 30 Stunden apf („after puparium formation“, nach dem Eintritt in die pupale Entwicklung) in Flügeln am gesamten apikalen Zellkortex lokalisiert ist und dann im Zuge der Gewebepolarisierung umverteilt wird, so dass es danach ausschließlich an den proximalen und distalen Zellgrenzen zu finden ist. Die Überexpression von Baz führt dazu, dass Fmi an allen, auch an den anterioren und posterioren Zellgrenzen lokalisiert wird. Die Fehlverteilung von Fmi kann in frühen Phasen, kurz nach der Initiierung des Flügelhaares (ca. 32 Std apf), und nach Beginn des Auswachsens des Flügelhaares (33 Std apf) beobachtet werden. Fmi ist in Zellen, die *baz* überexprimieren, mit Baz an den Stellen seiner verstärkten Akkumulation kolokalisiert, was für eine Rekrutierung des Proteins durch Baz spricht (Abb. 3.10, a' und b', rote Pfeilköpfe). Zugleich konnte ein Einfluss der Überexpression von *baz* auf die Initiierung des Flügelhaares beobachtet werden. Während im wildtypischen Kompartiment bereits eine

Zentrierung der Aktinbündel zu der Stelle, an der das Haar entsteht, zu beobachten ist, wirkt die Aktinfärbung in den Zellen, die *baz* überexprimieren, diffus (Abb. 3.10, a''). Dies deutet auf eine Verzögerung bei der Initiierung des Haares hin. Fmi ist bereits in Imaginalscheiben von L3-Larven apikal lokalisiert. Durch Antikörperfärbungen kann untersucht werden, ob die Lokalisation von Fmi bereits zu diesem Zeitpunkt von Baz beeinflusst wird. Die Überexpression von *baz* in diesem Stadium führt zu einer stärkeren apikalen Anreicherung von Fmi. Eine Delokalisation an die Stellen der ektopischen Lokalisation von Baz, an die laterale Membran und in das Zytoplasma, ist nicht zu beobachten (Abb. 3.11). Es ist daher anzunehmen, dass die apikale Lokalisierung von Fmi durch einen zusätzlichen, von der Rekrutierung durch Baz unabhängigen, Mechanismus gesichert wird.

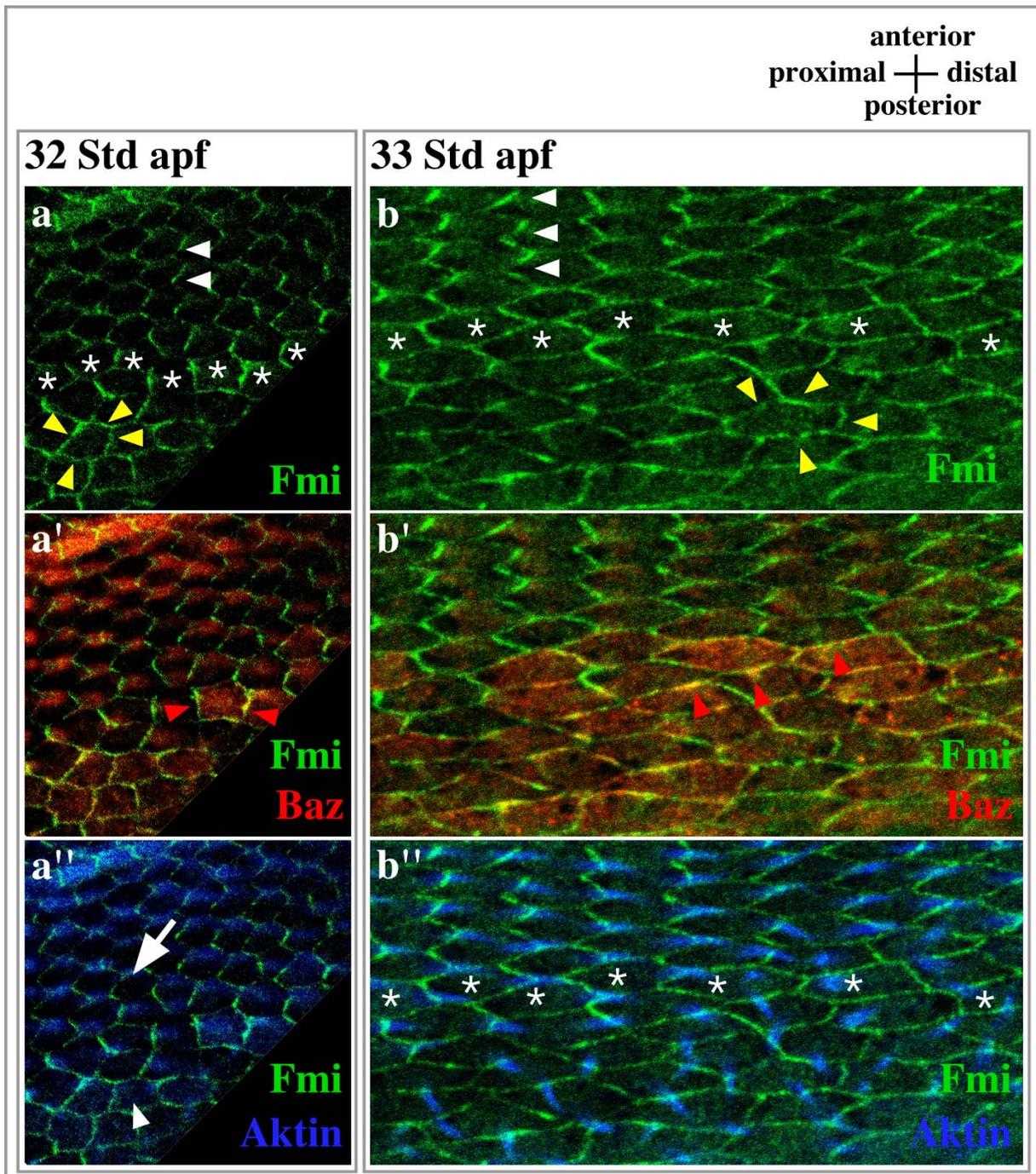


Abb. 3.10: Überexpression von *baz* stört die Verteilung von Fmi. Antikörperfärbungen an pupalen Flügeln 32 Std bzw. 33 Std apf (Fmi: grün, Baz: rot, Aktin: blau). Gezeigt ist die Grenzregion zwischen anteriorem und posteriorem Kompartiment. **a, b** Im wildtypischen, anterioren Kompartiment ist Fmi 32 Std apf (**a**) und 33 Std apf (**b**) an den distalen und proximalen Zellgrenzen lokalisiert (weiße Pfeilköpfe). Im posterioren Kompartiment, dort wird *baz* überexprimiert, ist Fmi an allen Zellgrenzen nachzuweisen (gelbe Pfeilköpfe). Die Sterne markieren die anteriore Reihe der *baz* überexprimierenden Zellen des posterioren Kompartiments. **a', b'** Fmi ist mit Baz an den Zellgrenzen in überexprimierenden Zellen kolokalisiert (rote Pfeilköpfe). **a'', b''** Durch die Aktinfärbung werden die Defekte in der Positionierung und Ausrichtung der Flügelhaare sichtbar. Während im anterioren Kompartiment bereits die Bündelung der Aktinfilamente im Trichom zu erkennen ist (**a''**, weißer Pfeil), wird das Aktinzytoskelett im überexprimierenden Bereich noch nicht polarisiert (**a''**, weißer Pfeilkopf).

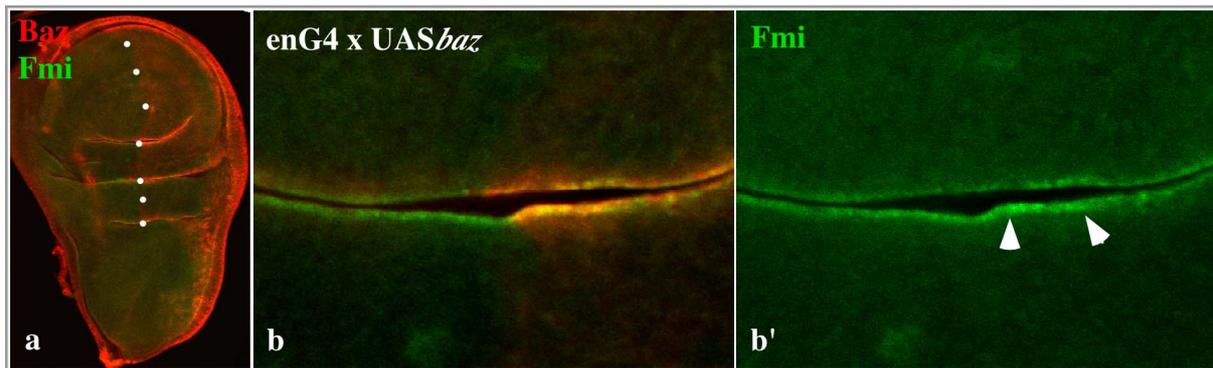


Abb. 3.11: Erhöhte Mengen des Baz-Proteins bewirken in Imaginalscheiben eine apikale Anreicherung von Fmi. Antikörperfärbung gegen Baz (rot) und Fmi (grün) an einer L3-Imaginalscheibe, in der *baz* unter der Kontrolle des *en*-Promotors überexprimiert wird. **a** Übersicht: Die Überexpression von *baz* im posterioren Kompartiment (die Kompartimentsgrenze durch Punkte markiert) führt zu einer Erhöhung der Menge an Baz-Protein. **b**, **b'** Vergrößerung: die Überexpression von *baz* führt zur apikalen Anreicherung des Baz-Proteins (**b**, rot). In diesen Bereichen ist die Menge an Fmi-Protein ebenfalls erhöht (**b'**, grün).

3.3.4 Baz bindet an eine Isoform von Fmi, die ein putatives PDZ-Bindemotiv besitzt

Die Fähigkeit von Baz, Fmi zu rekrutieren, kann sowohl auf einer direkten Bindung der Proteine aneinander als auch auf einer indirekten Bindung, vermittelt durch andere Proteine, beruhen. Baz besitzt für die Protein-Protein-Interaktion 3 PDZ (Post synaptic density protein/Discs large/Zonula occludens protein) Domänen. Sollte eine direkte Bindung über diese Domänen vermittelt werden, muss Fmi ein PDZ-Bindemotiv besitzen. Die Funktion und Struktur von Flamingo, des an der Ausbildung von PCP beteiligten atypischen Cadherins, wurde 1999 von zwei unabhängigen Gruppen beschrieben (Chae et al., 1999; Usui et al., 1999). Das Protein besitzt 4 EGF-ähnliche Motive, 9 Cadherin-Motive, 2 Laminin G-Motive und 7 Transmembrandomänen, kodiert von 3579 AS (Chae et al., 1999). Usui et al. zeigten, dass Fmi homophile Zelladhäsion vermittelt und sowohl an den distalen als auch an den proximalen Zellgrenzen zur Zeit der proximo-distalen Modulation lokalisiert ist. Usui et al. geben die Größe von Flamingo hingegen mit 3575 AS an. Wie an Hand der Datenbankeinträge nachzuvollziehen ist, entstehen die unterschiedlichen Proteine durch alternatives Splicing (GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, accession number AF172329 (unter dem Namen *starry night*) und accession number AB028498 (unter dem Namen *flamingo*)). Die 4 zusätzlichen AS kodieren für ein C-terminales TTV-Motiv, ein putatives PDZ-Bindemotiv (Harris and Lim, 2001). Um zu überprüfen, ob dieses TTV-Motiv direkt mit den PDZ-Domänen von Baz interagiert, wurden GST-Pull-down-Experimente durchgeführt.

Hierfür wurde ein Proteinfoagment, das die 3 PDZ Domänen von Baz beinhaltet, *in vitro* transkribiert/translatiert (Abb. 7.2 und Abb. 7.3) und die Interaktion mit zwei verschiedenen GST-Fusionsproteinen getestet. Beide beinhalten Teile der gemeinsamen intrazellulären Domäne beider Isoformen und unterschieden sich in den 11 bzw. 6 AS am Ende des C-Terminus (siehe Abb. 3.12, c und Abb. 7.1; die zur Herstellung der Fusionsproteine verwendeten pGex-Klone wurden mir freundlicherweise von Hendrik Strumpf aus der Arbeitsgruppe von Ulrich Thomas, IfN-Magdeburg, zur Verfügung gestellt). Im GST-Pull-down konnte so die Bindung von Baz an den C-Terminus von Fmi_{PDZbm} (Fmi-Isoform, die das putatives PDZ-Bindemotiv besitzt), vermittelt durch die PDZ-Domänen von Baz und das TTV-Motiv von Fmi_{PDZbm} gezeigt werden (Abb. 3.12). Die Fmi-Isoform, welche die PDZ-Bindestelle nicht besitzt, bindet nicht an Baz. Somit beruht die durch die Überexpression von Baz hervorgerufene Störung der planaren Polarität vermutlich auf einer durch direkte Interaktion erreichte Rekrutierung von Fmi_{PDZbm} durch Baz, was die Fehlverteilung von Fmi_{PDZbm} zur Folge hat. Da Fmi über die extrazelluläre Domäne Homodimere ausbildet, könnte durch die mögliche Rekrutierung von Fmi_{PDZbm} durch Baz auch die Verteilung der Fmi-Isoform ohne das PDZ-Bindemotiv verändert sein. Die Möglichkeit einer Rekrutierung von Baz durch Fmi_{PDZbm} wurde nicht überprüft, es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Überexpression von Fmi, ohne das TTV-Motiv (UASfmi, Usui et al., 1998), im Imaginalscheibenepithel die Menge und Verteilung des Baz-Proteins nicht beeinflusst (Abb. 3.13).

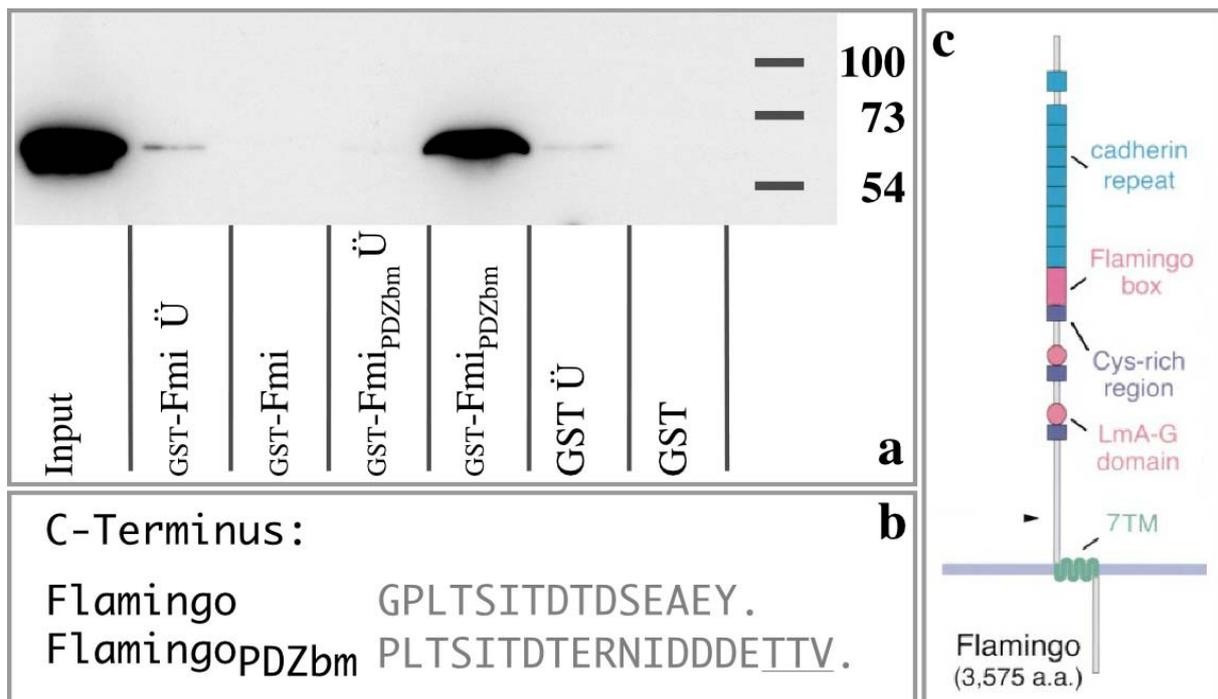


Abb. 3.12: Baz bindet an eine Isoform von Fmi, die ein putatives PDZ-Bindemotiv besitzt (Fmi_{PDZbm}). **a** Ergebnisse der GST-Pull-down-Experimente. Die verschiedenen GST-Fusionproteine beinhalten Teile des C-Terminus von Fmi_{PDZbm} bzw. Fmi. Ein *in vitro* transkribiertes/translatiertes Fragment, das die 3 PDZ-Domänen von Baz enthält (Input), kann mit Fmi_{PDZbm}-GST präzipitiert werden. Das Baz-Fragment kann dagegen nicht mit Fmi-GST (ohne PDZ-Bindemotiv) präzipitiert werden, ist aber in dem durch die Präzipitation entstehenden Überstand nachzuweisen (Fmi-GST Ü). Eine unspezifische Bindung an das GST-Protein kann ausgeschlossen werden. Das Baz-Fragment kann mit GST nicht präzipitiert werden und befindet sich nach der Präzipitation im Überstand (GST Ü). **b** die unterschiedlichen C-Termini der Fmi-Isoformen (unterstrichen ist das putative PDZ-Bindemotiv, TTV). **c** Übersicht über die Proteinstruktur von Fmi.

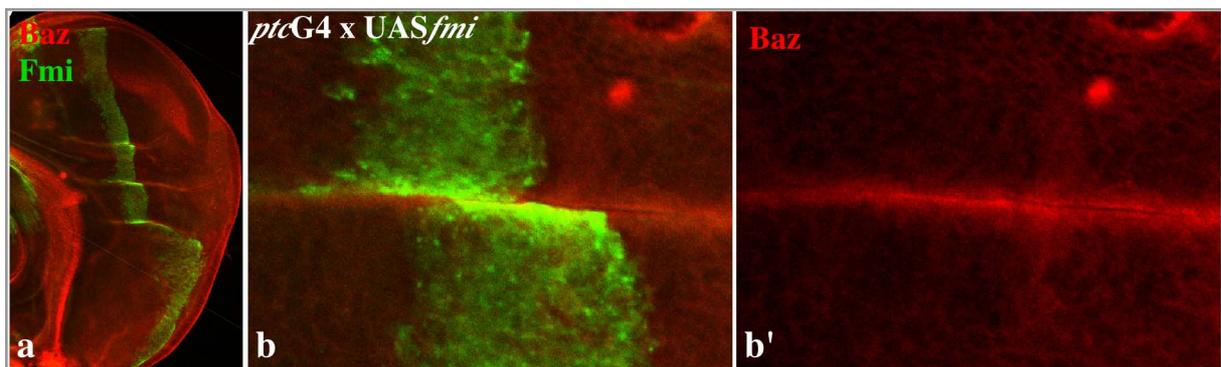


Abb. 3.13: Baz wird nicht durch Fmi rekrutiert. Antikörperfärbung gegen Baz (rot) und Fmi (grün) an einer L3-Imaginialscheibe, in der *fmi* unter Kontrolle des *ptc*-Promotors überexprimiert wird. **a** Übersicht: Überexpression von *fmi* unter der Kontrolle des *ptc*-Promotors in einem Streifen entlang der A/P-Kompartimentsgrenze führt dort zur Erhöhung der Menge an Fmi-Protein. **b** Vergrößerung: Fmi ist im Zytoplasma der *fmi* überexprimierenden Zellen angereichert (grün). **b'** Vergrößerung: Veränderungen in der Lokalisation von Baz können nicht beobachtet werden.

3.3.5 Die Reduktion der Genfunktion verschiedener Gene führt zur Unterdrückung der durch die Überexpression von *baz* hervorgerufenen Störungen der PCP

Die Störungen der PCP, die durch die Überexpression von *baz* im Flügel hervorgerufen werden, sind vermutlich auf die Rekrutierung von Fmi durch Baz zurückzuführen. Es ist daher wahrscheinlich, dass Baz im wildtypischen Flügelepithel an der Ausbildung von PCP, möglicherweise durch eine Funktion bei der apikalen Lokalisation von Fmi, beteiligt ist. Um weitere Gene zu identifizieren, die mit *baz* bei der Ausbildung von planarer Zellpolarität interagieren, wurden Mutationen bekannter Gene darauf hin getestet, ob sie in Heterozygose den Überexpressionsphänotyp von *baz* im Flügel unterdrücken. Mutationen in Genen, deren Produkte mit Baz funktionell interagieren, können je nach Art der Interaktion den Überexpressionsphänotyp von Baz im Flügel verstärken oder abschwächen. Durch die Identifikation von Suppressoren (abschwächenden Faktoren) des *baz*-induzierten Flügelphänotyps sollten Gene identifiziert werden die mit *baz* bei der Ausbildung von planarer Zellpolarität interagieren. Es wurden zunächst Kandidaten getestet, die an der Etablierung und Aufrechterhaltung von epithelialer Zellpolarität beteiligt sind. Des Weiteren wurden Gene getestet, die bei morphogenetischen Prozessen Zellformveränderungen bewirken. Außerdem wurden Kandidaten getestet, die zu den primären Polariätsgenen zählen oder solche, die „upstream“ zu den primäre Polaritätsgenen agieren. Für die Auswahl der Kandidatengene wurde zunächst der Flügelphänotyp, der durch die Überexpression erzeugt wird, genauer betrachtet. Neben der Störung in der planaren Polarität treten weitere Defekte auf:

- der Flügel ist verkürzt, was bei der Verwendung des *enG4*-Treiber zu einer Verkürzung des posterioren Kompartiments und damit zu einer Krümmung des Flügels führt (Abb. 3.8. d, vergleiche mit c)
- die Zellform ist verändert, was zum Verlust der hexagonalen Zellform führt (Abb. 3.8, f und 3.10 a und b)
- die Flügelvenen sind verdickt (Abb. 3.8 d und 3.16 b)

Gene, die an der Ausbildung apikobasaler Zellpolarität beteiligt sind, wurden getestet, um heraus zu finden, ob gleiche Wechselwirkungen zwischen den Proteinen des Baz-Komplexes und/oder gleiche Wechselwirkungen zwischen den Proteinkomplexen (Baz-Komplex, Crb-Komplex, Scrib-Komplex) bei der Ausbildung von planarer Zellpolarität wie bei der

Etablierung von apikobasaler Zellpolarität bestehen. Die Mitglieder der primären Polaritätsgene wurden getestet, um weitere direkte und indirekte Interaktionspartner von *baz* auf der Ebene von *fmi* zu identifizieren. Von den „upstream“ zu den primären Polaritätsgenen wirkenden Genen, *dachsous (ds)*, *fat (ft)*, *fourjointed (ff)*, ist wenig darüber bekannt, wie sie die planare Polarität beeinflussen. Interessanterweise sind sie aber auch an Prozessen beteiligt, die die Flügelform bestimmen, indem sie das Verhältnis von Flügelbreite zu Flügellänge kontrollieren. Diese drei Gene wurden somit vor allem auf Grund der beobachteten Verkürzung des Flügels getestet. Gene, die an Prozessen beteiligt sind, die Zellformveränderung bewirken, wurden angesichts der durch die Überexpression von *baz* im Flügel hervorgerufenen Zellformveränderungen und der Fehlpositionierung des Flügelhaares getestet. Beide Defekte sind vermutlich auf Veränderungen des Aktinzytoskeletts zurückzuführen. Außerdem wurden sie ausgewählt, weil ihr Funktionsverlust Zellformabnormalitäten in den MG hervorruft und dort zur Ausbildung eines ähnlichen Phänotyps wie der Verlust von *baz* führt (Blake et al., 1999; Jack and Myette, 1999). Ein Teil der getesteten Gene beeinflusst das Zusammenspiel von Aktin und Myosin, *zipper (zip)*, *ribbon (rib)*, *raw*. Die anderen, *schmurri (shn)*, *thick veins (tkv)*, *punt (put)* kodieren Proteine, die an der intrazellulären Weiterleitung des Dpp-Signals (kodiert von *decapentaplegic*), einem sekretierten Protein der TGF- β -Familie (transforming growth factor), beteiligt sind. *shn* kodiert einen Transkriptionsfaktor, *tkv* eine Rezeptoruntereinheit, die mit einer zweiten von *punt* kodierten Untereinheit einen Transmembranrezeptor mit Serin-Threonin-Kinase Aktivität ausbildet (Arora et al., 1995; Letsou et al., 1995; Ruberte et al., 1995). Der Funktionsverlust jedes dieser Gene führt außerdem zu Defekten im dorsalen Schluss, die auch in *baz*⁻-mutanten Embryonen zu beobachten sind (Affolter et al., 1994; Blake et al., 1998). Sie wurden getestet, um zu überprüfen, ob die Überexpression von *baz* neben dem Einfluss auf die Verteilung von *fmi* auch einen anderen, direkteren Einfluss auf die Modulation des Aktinzytoskeletts hat. Die genannten Komponenten des Dpp-Signalwegs wurden auch auf Grund ihrer Funktion bei der Ausbildung der Flügelvenen, die durch die Überexpression von *baz* gestört wird, getestet. Die Ergebnisse der Kreuzungen sind in den folgenden Tabellen (Tab. 3.3-3.6) dargestellt. Bei der Auswertung der Phänotypen wurde zwischen einer vollständigen (gekennzeichnet mit: ++) und einer partiellen (gekennzeichnet mit: +) Unterdrückung des Überexpressionsphänotyps von *baz* unterschieden. Die Verstärkung des Phänotyps konnte mit diesem System nicht bewertet werden.

Um bei der Testkreuzung den Aktivator und den Effektor immer gemeinsam zu vererben wurde ein Stamm verwendet, der *ptcG4* und *UASbaz6.3* über einem Compound-Balancer für das 2. und 3. Chromosom trägt (Abb. 3.14).

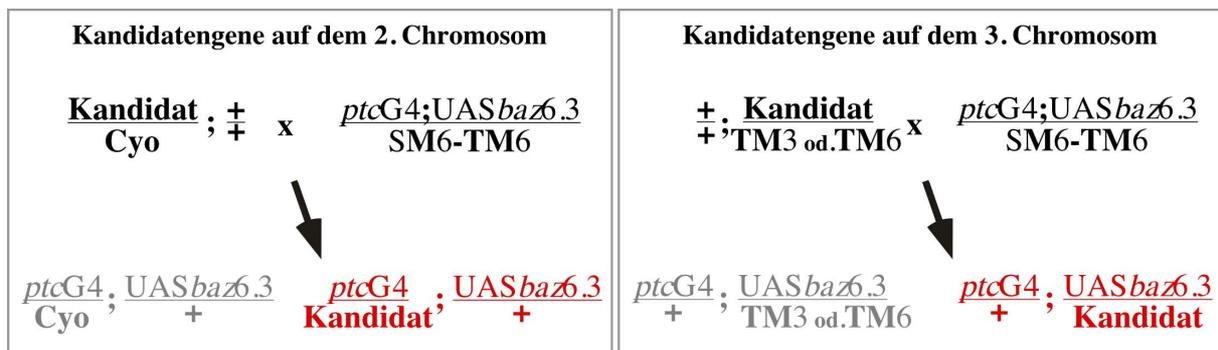


Abb. 3.14: Kreuzungsschema für den Test auf Unterdrückung des Überexpressionsphänotyps von *baz* im Flügel. Jungfräuliche Weibchen der Kandidatenstämme wurden gegen Männchen gekreuzt, die den Aktivator, *ptcG4*, und den Effektor, *UASbaz6.3*, über einem Compound-Balancer für das 2. und 3. Chromosom tragen. Dieser Balancer verhindert die freie Segregation des 2. und 3. Chromosoms, was die gemeinsame Vererbung von Aktivator und Effektor bewirkt. Die Nachkommen, die neben dem Besitz beider Komponenten für die Überexpression durch den Verlust einer Kopie des zu testenden Gens gekennzeichnet sind, können am Verlust aller der durch Marker gekennzeichneten Balancerchromosomen identifiziert werden (rot). Als Referenz dienen die Nachkommen der Kreuzung, die den durch den Kandidatenstamm eingebrachten Balancer für das 2. oder das 3. Chromosom tragen, sie zeigen den reinen Überexpressionsphänotyp für *baz* (grau).

Mutation in	Allel	Beschreibung	Unterdrückung
<i>bazooka</i>	815-8	verm., „loss-of-function“-Mutation ¹ embryonal letal, rezessiv,	keine
<i>bazooka</i>	xi106	verm., „loss-of-function“-Mutation ² embryonal letal, rezessiv	+
DaPKC	k06403	amorphes Allel, embryonal letal, rezessiv	+
<i>par-6</i>	Delta 226	embryonal letal, rezessiv	keine
<i>stardust</i>	XN05	hypomorphes Allel, embryonal letal, rezessiv	keine
<i>crumbs</i>	11A22	amorphes Allel, embryonal letal, rezessiv	keine
14-3-3, ϵ	j2B10	„loss-of-function“-Mutation letal, rezessiv	keine
14-3-3, ζ	07103	hypomorphes Allel, letal, rezessiv	keine
<i>leonardo</i>	12BL	„loss-of-function“-Mutation, embryonal letal, rezessiv	keine
<i>par-1</i>	k06323	letal, rezessiv	keine
<i>par-1</i>	W3	letal, rezessiv	keine
<i>discs large</i>	m52	amorphes Allel, larval letal, rezessiv	keine
<i>coracle</i>	k08713	letal, rezessiv	keine
<i>scribbled</i>	j7B3	letal, rezessiv	keine
<i>neurexin</i>	4304	amorphes Allel, letal, rezessiv	keine
<i>lethal giant larvae</i>	4	„loss-of-function“-Mutation larval letal, rezessiv	keine

Tab. 3.3: Modifikationstest; Gene, die an der Ausbildung und Erhaltung von Zellpolarität beteiligt sind.

^{1,2} Wodarz, persönliche Mitteilung

Mutation in	Allel	Beschreibung	Unterdrückung
<i>strabismus</i>	6	„loss-of-function“-Mutation, lebensfähig, rezessiv	+
<i>flamingo</i>	192	„loss-of-function“-Mutation	++
<i>flamingo</i>	frz3	hypomorphes Allel, lebensfähig	keine
<i>flamingo</i>	E59	„loss-of-function“-Mutation embryonal letal, rezessiv	++
UAS <i>fmi</i>	Usui	Effektor	keine
<i>dishevelled</i>	3	„loss-of-function“-Mutation larval letal, rezessiv	keine
<i>prickle</i>	1	„loss-of-function“-Mutation, rezessiv	+

Tab. 3.4: Modifikationstest; Gene, die zu den primären Polaritätsgenen gehören.

Mutation in	Allel	Beschreibung	Unterdrückung
<i>dachsous</i>	W	lebensfähig	keine
<i>dachsous</i>	33k	loss-of-function“-Mutation, rezessiv	keine
<i>dachsous</i>	UA071	loss-of-function“-Mutation, letal, rezessiv	++
<i>four jointed</i>	4	hypomorphes Allel, lebensfähig	keine
<i>four jointed</i>	d1	loss-of-function“-Mutation, lebenfähig, rezessiv	+
<i>four jointed</i>	N7	K. A.	keine
UAS <i>fj</i>	363	Effektor	++
<i>fat</i>	1	lebensfähig, rezessiv	+
<i>fat</i>	4	pupal, letal, rezessiv	keine
<i>fat</i>	G-rv	amorphes Allel, embryonal letal, rezessiv	keine
<i>fat</i>	sz44	embryonal letal, rezessiv	keine

Tab. 3.5: Modifikationstest; Gene, die upstream der primären Polaritätsgene agieren.

Mutation in	Allel	Beschreibung	Unterdrückung
<i>zipper</i>	IIX62	amorphes Allel, embryonal letal, rezessiv	+
<i>ribbon</i>	1	loss-of-function“-Mutation, embryonal letal, rezessiv	keine
<i>raw</i>	k01021	embryonal letal, rezessiv	keine
<i>raw</i>	1	embryonal letal, rezessiv	keine
<i>punt</i>	10460	amorphes Allel, embryonal letal, rezessiv	keine
<i>punt</i>	135	amorphes Allel, embryonal letal, rezessiv	keine
<i>thick veins</i>	k16713	hypomorphes Allel, embryonal letal, rezessiv	++
<i>thick veins</i>	7	loss-of-function“-Mutation, embryonal letal, rezessiv	keine
<i>schnurri</i>	Andre	amorphes Allel, embryonal letal, rezessiv	keine

Tab. 3.6: Modifikationstest; Gene, die Zellform beeinflussen.

Die Ergebnisse der Kreuzung geben Anlass zu folgenden Überlegungen:

- Die Gesamtproteinmenge von Baz und die Phosphorylierung durch DaPKC beeinflussen Ausprägung des *baz*-Überexpressionsphänotyps im Flügel
- Die Dosisreduktion von *fmi*, erreicht durch die „loss-of-function“-Mutationen der Allele *fmi*^{E59} und *fmi*¹⁹² (heterozygot vorliegend) führt zur vollständigen Wiederherstellung der planaren Polarität (Abb. 3.15 b und c). Die primären Polaritätsgene, *prickle* (*pk*) und *strabismus* (*stbm*) werden durch die Überexpression von *baz* vermutlich durch indirekte Interaktion über *fmi* beeinflusst.
- Die Verringerung der *ds*-Gendosis durch das heterozygot vorliegende „loss of function“-Allel *ds*^{UA071} führt zur vollständigen Unterdrückung des *baz*-Überexpressionsphänotyps (Abb. 3.15), während die Reduktion von *ft* durch das heterozygot vorliegende Allel *ft*¹ (lebensfähiges Allel) eine teilweise Unterdrückung bewirkt. Beide Gene kodieren für atypische Cadherine, die planare Zellpolarität „upstream“ zum Fz/Dsh-Signalweg kontrollieren. Sie sind im Flügel in gegenläufigen proximal-distal-Gradienten exprimiert, subzellulär aber nicht asymmetrisch verteilt und kolokalisieren mit Komponenten der ZA. Beide interagieren mit dem Morphogen *ff*. Die Reduktion der *ff*-Funktion durch das heterozygot vorliegende „loss-of-function“-Allel *ff*^{d1} führt ebenfalls zu einer teilweisen Wiederherstellung der planaren Zellpolarität, während mit der Überexpression von *ff* eine vollständige Wiederherstellung erreicht wird. Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse kann keine Aussage über die Wirkung von *baz* auf der Ebene dieser Gene getroffen werden.
- Eine partielle Unterdrückung des Überexpressionsphänotyps von *baz* wird durch eine heterozygot vorliegende Deletion bewirkt, die neben der Genfunktion anderer Gene die Genfunktion von *zipper* (*zip*) zerstört. *zip* kodiert für eine Untereinheit des nicht-muskulären Myosins (nonmuscle myosin heavy chain), einem Motorprotein, das die Aktinkontraktion bewirkt und so Zellformveränderungen durch die Modulation des Aktinzytoskeletts bewirkt. Eine vollständige Unterdrückung des Überexpressionsphänotyps wird durch die Dosisreduktion von *tkv* mit dem heterozygot vorliegenden hypomorphen Allel *tkv*^{K16713} erreicht (Abb. 3.15). *tkv* kodiert für eine Rezeptoruntereinheit, die mit einer zweiten, von dem Gen *punt* (*put*) kodierten Untereinheit, einen Transmembranrezeptor mit Serin-Threonin-Kinase-Aktivität ausbildet, der an der intrazellulären Weiterleitung des Dpp-Signals beteiligt ist (Letsou et al., 1995; Ruberte et al., 1995). Dpp bewirkt u. a. Zellstreckung, so ist es für die

Elongation der Epidermiszellen beim dorsalen Schluss verantwortlich (Martin-Blanco et al., 2000). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Zellformveränderungen und die Defekte des Aktinzytoskeletts, hervorgerufen durch die Überexpression von *baz*, möglicherweise auf Beeinflussung der Signaltransduktion über Dpp und/oder auf Veränderungen in der Aktin-Myosin-Interaktion zurückzuführen sind.

Abb. 3.15, nächste Seite: Verringerung der Gendosis von *fmi* und *ds* sowie die Überexpression von *ff* führt zur Unterdrückung des Überexpressionsphänotyps von *baz* im Flügel. a-e Flügelphänotypen von Tieren, die zusätzlich zu den für die Überexpression von *baz* benötigten Komponenten, *ptcG4* und *UASbaz6.3*, eine Mutation auf dem 2. Chromosom tragen. Das mutante Chromosom ist in der Beschreibung des Genotyps durch das rote x gekennzeichnet. Die Bezeichnungen der verwendeten Chromosomen sind in den Abbildungen mit dem modifizierten Phänotyp dargestellt (**b-e**). Als Referenz für die Beurteilung der Abschwächung des Überexpressionsphänotyps dienen die Nachkommen der Kreuzung, die anstelle eines mutanten Chromosoms das Balancerchromosom *Cy0* tragen (**a**, rote Linie markiert die Kompartimentsgrenze). **f** Referenzphänotyp für das dritte Chromosom, anstelle einer Mutation liegt hier das Balancerchromosom *TM3* vor (rote Linie markiert die Kompartimentsgrenze). **g** Flügel eines Tieres, das neben dem Effektor *UASbaz6.3* ein Konstrukt für die Überexpression von *ff*, *UASff363*, trägt. Dieser Effektor steht ebenfalls unter der Kontrolle des Aktivators, *ptcG4*. Es kommt deshalb zu einer gleichzeitigen Überexpression von *baz* und *ff*. Das mutante Chromosom ist in der Beschreibung des Genotyps durch das rote x gekennzeichnet. **h** Expressiondomäne des *ptcG4*-Treiber an der Grenze zwischen anteriorem und posteriorem Kompartiment des Flügels zwischen der 2. und 3. Längsvene.

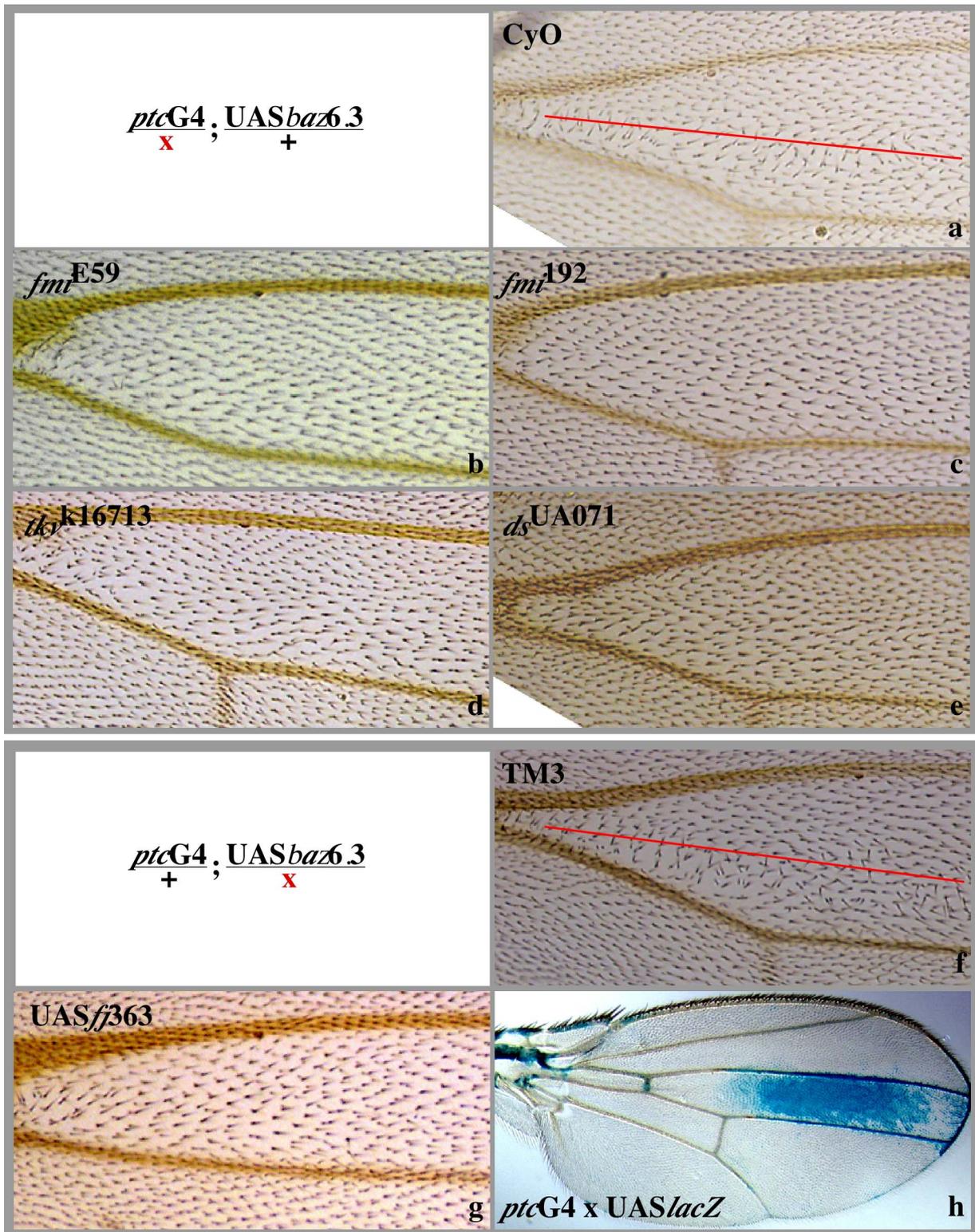


Abb. 3.15, Erklärung auf der vorherigen Seite

3.3.6 Die Überexpression von *baz* führt zur Verkürzung des Flügelblatts und zu Venendefekten

In adulten Fliegen, die *baz* mit dem *enG4*-Treiber überexprimieren, kommt es zu einer starken Verkürzung des posterioren Flügelkompartimentes, was zur Krümmung des Flügels führt (Abb. 3.8, d). Zusätzlich haben diese Tiere verkürzte und gekrümmte Beine, was auf die Überexpression von *baz* auch im posterioren Kompartiment der Beinanlage zurückzuführen ist (Daten nicht gezeigt). Diese Merkmale zeigen starke Übereinstimmung zu denen, die durch den Funktionsverlust von *ds* hervorgerufen werden.

Die atypischen Cadherine Ft und Ds kontrollieren sowohl das Längenwachstum der Flügel und Beine als auch planare Zellpolarität in Flügel und Auge von *Drosophila*. Der Verlust der *ds*-Funktion führt neben Polaritätsdefekten zu stark verformten Flügeln und Beinen (Adler et al., 1998; Clark et al., 1995). Die Mechanismen, wie *ft* und *ds*, die planare Polarität im Flügel kontrollieren, sind bisher weitgehend unbekannt. Durch Epistaseanalysen konnte ihre Funktion „upstream“ des Fz/Dsh-Signalweges angeordnet werden. Interessant ist, dass sich die durch den Funktionsverlust von *ds* hervorgerufenen Störungen der planaren Polarität im Flügel von jenen durch den Ausfall der Mitglieder des Fz/Dsh-Signalweges in einer Hinsicht deutlich unterscheiden. So kommt es in Flügeln von Tieren, die die Allelkombination *ds*^{UAO71}/*ds*^{33K} tragen, im Bereich zwischen der zweiten und dritten Längsvene zu einer Ausrichtung der Flügelhaare nach proximal.

Um die Effekte von *Baz* auf das Längenwachstums des Flügels und auf die Ausrichtung der Flügelhaare genauer zu untersuchen, wurde *baz* unter Verwendung des *omb-G4*-(*optomotor-blind*) Treibers in der gesamten Flügelblattanlage exprimiert. Dies führt zu einer starken Verkürzung des Flügels, so wie sie durch den Funktionsverlust von *ds* hervorgerufen wird (Abb. 3.16 a und b). Zudem konnte festgestellt werden, dass die Überexpression von *baz* ebenfalls die Ausrichtung der Flügelhaare nach proximal bewirken kann (Abb. 3.16, c Flügelhaare in Pfeilrichtung). Weitere Ähnlichkeiten der Phänotypen ergeben sich dadurch, dass es auch in Flügeln von für *ds*⁻-mutanten Fliegen in manchen Zellen zur Ausbildung von multiplen Haaren kommt. Außerdem werden durch die Überexpression von *baz* Defekte in der Ausbildung der Flügelvenen hervorgerufen. Es kommt zu einer Verdickung der 1.-3. Längsvene im distalen Bereich des Flügels (Abb. 3.16 b, rote Pfeilköpfe) und zum Verlust der posterioren Quervene (Abb. 3.16 b, gelber Pfeilkopf). Der Funktionsverlust von *ds* führt zum Verlust beider Quervenen (Abb. 3.16 c, gelbe Pfeilköpfe). Aufgrund der ähnlichen Defekte in PCP und Morphogenese, die durch die Überexpression von *baz* und die Reduktion der *ds*-

Genfunktion hervorgerufen werden, ist die Unterdrückung der Genfunktion von *ds* durch die Überexpression von *baz* denkbar. Diese Überlegung steht allerdings in Widerspruch zu der beobachteten Unterdrückung des *baz*-Überexpressionsphänotyps durch die Reduktion der Gendosis von *ds* (siehe 3.3.5).

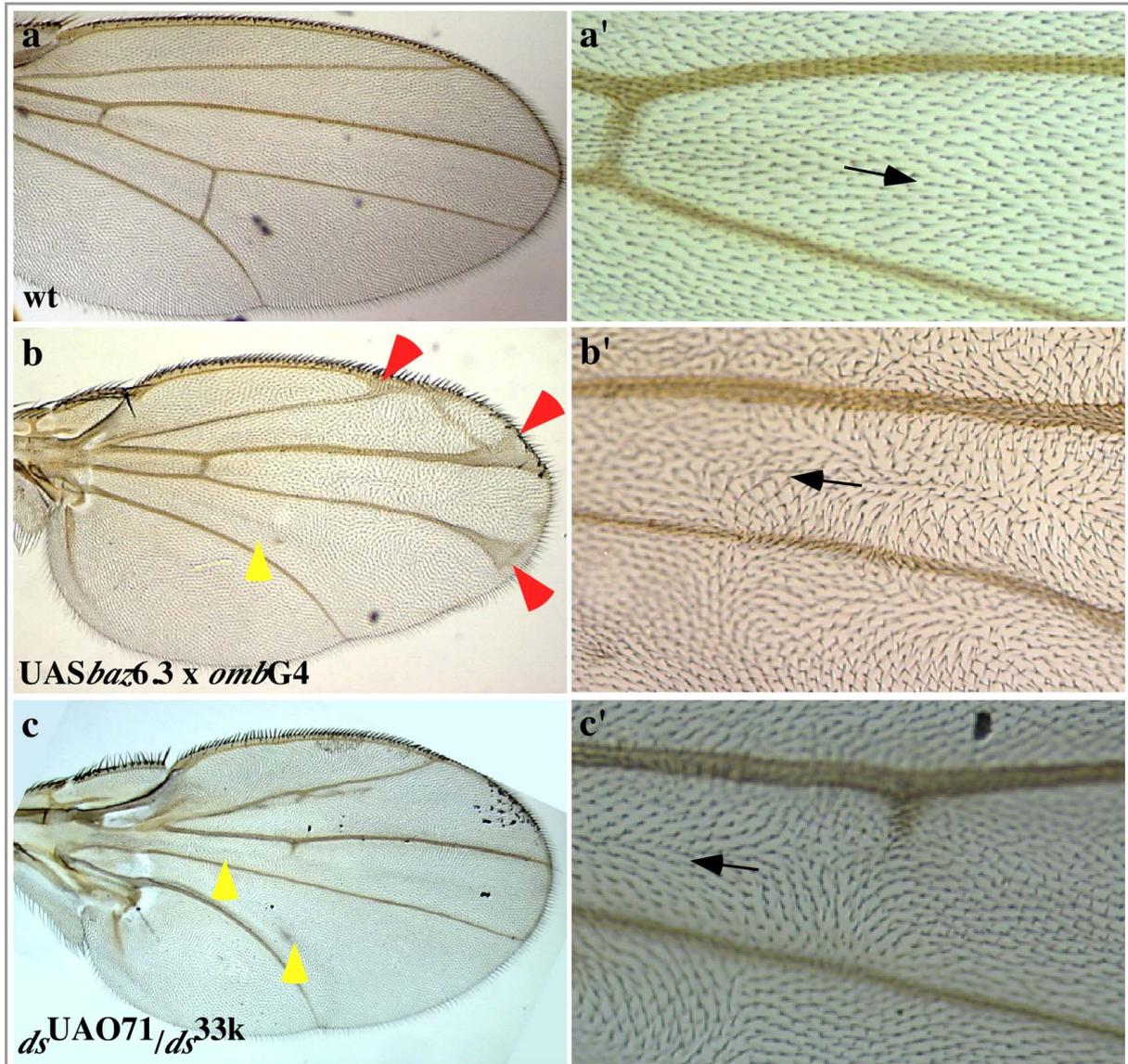


Abb. 3.16: Funktionsverlust von *ds* und Überexpression von *baz* rufen ähnliche Flügeldefekte hervor. **a** Form eines wildtypischen Flügels. **a'** wildtypische Ausrichtung der Flügelhaare nach distal (Pfeil). **b** Die Überexpression von *baz* in der gesamten Flügelblattanlage führt zu einer starken Flügelverkürzung und zur Verbreiterung der 1.–3. Längsvene (rote Pfeilköpfe), sowie zum Verlust der posterioren Quervene (gelber Pfeilkopf) **b'** Durch die Überexpression von *baz* kommt es zur Ausbildung von reverser Polarität. Zwischen der zweiten und dritten Längsvene sind die Flügelhaare teilweise nach proximal ausgerichtet (Pfeil). **c** Der Verlust der *ds*-Funktion ruft ebenfalls eine starke Verkürzung des Flügels hervor und führt zum Verlust beider Quervenen (gelbe Pfeilköpfe). **c'** Der Verlust der *ds*-Funktion verursacht ebenfalls die Ausbildung von reverser Polarität. Proximal ist in allen Abbildungen links, anterior oben.

3.3.7 Zusammenfassung

Baz überexprimierende Zellen des Flügeleithels verlieren ihre planare Polarität. An Hand des entstehenden Phänotyps, bezogen auf die Positionierung und Ausrichtung der Flügelhaare, kann die Wirkung von Baz im Signalweg für PCP auf der Ebene der sogenannten primären Polaritätsgene oder „upstream“ dazu eingeordnet werden (siehe Einleitung). Des Weiteren weisen die Zellen, die Baz überexprimieren, Zellformveränderungen auf. Untersuchungen der apikobasalen Zellpolarität in Stadien vor der Etablierung von planarer Zellpolarität ergaben, dass diese in den Baz überexprimierenden Regionen des Flügeleithels korrekt ausgebildet ist. Für pupale Stadien konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Baz die asymmetrische Verteilung von Fmi entlang der proximo-distalen Achse stört. Fmi wird durch das überexprimierte Baz-Protein auch an die anterior-posterioren Zellgrenzen rekrutiert und somit fehlverteilt. Durch GST-Pull-down-Experimente konnte gezeigt werden, dass Baz direkt mit einer Isoform von Fmi, die ein putatives PDZ-Bindemotiv besitzt, interagiert. Hierdurch könnte die in der Zelle beobachtete Rekrutierung von Fmi durch Baz erklärt werden. Im Weiteren konnte der durch die Überexpression von Baz hervorgerufene Phänotyp durch die Verringerung der Gendosis von verschiedenen Genen unterdrückt werden. So konnte die Interaktion von Baz und Fmi auf genetischer Ebene bestätigt werden und es konnten weitere Suppressoren identifiziert werden, die mit *baz* genetisch interagieren. Neben den Defekten der PCP erzeugt die Überexpression von *baz* Morphogenesedefekte des Flügels. Bei der Überexpression von *baz* mit dem *omb-G4*-Treiber kommt es zur Verkürzung des Flügels, die vermutlich auf Zellformveränderungen bzw. veränderter Zellstreckung beruht. Außerdem kann die Ausbildung von reverser Polarität in bestimmten Flügelregionen und eine fehlerhafte Ausbildung der Flügelvenen im distalen Flügelbereich beobachtet werden. Bezogen auf die Morphogenesedefekte und die Ausbildung von reverser Polarität weist der Überexpressionsphänotyp von *baz* eine starke Ähnlichkeit zu dem Phänotyp auf, der durch den Verlust des „upstream“ zu den primären Polaritätsgenen agierenden Gens *dachsous (ds)* hervorgerufen wird.

4 Diskussion

4.1 Die Überexpression von *baz* erzeugt Störungen auf verschiedenen Ebenen der Etablierung von PCP im Flügelepithel

4.1.1 Die Überexpression von *baz* kann Störungen in der Weiterleitung des nicht-zellautonomen Fz-Signals bewirken

Im Zuge der Etablierung von planarer Polarität im Flügel erfolgt die Interpretation eines weitreichenden Polarisierungssignals durch die Aktivität des Fz-Rezeptors in den Zellen des pupalen Flügelepithels (Adler et al., 1997; Ma et al., 2003; Strutt and Strutt, 2002). Die Stärke des Signals wird in der Höhe der Fz-Aktivität ausgedrückt (Adler et al., 1997). Das führt dazu, dass die Fz-Aktivität in den proximalsten Zellen des Flügelepithels am höchsten ist und von Zelle zu Zelle nach distal abnimmt. Die Ausrichtung der Flügelhaare erfolgt in Richtung der niedrigsten Fz-Aktivität, also nach distal (Adler et al., 1997). An der Übermittlung der Information über die Höhe der Fz-Aktivität im Gewebe durch Zell-Zell-Kommunikation ist das Transmembranprotein Fmi beteiligt (Lu et al., 1999; Strutt and Strutt, 2002; Usui et al., 1999). Die Kommunikation erfolgt durch die Ausbildung von Fmi-Homodimeren zwischen den distalen und proximalen Zellgrenzen benachbarter Zellen. (Usui et al., 1999).

4.1.1.1 Ektopische Lokalisation von Fmi kann den Zusammenbruch des Weiterleitungssystems über die Fz-Aktivität bewirken

Die Überexpression von *baz* im gesamten Flügel führt zu Defekten der PCP. Ähnliche Defekte entstehen bei Verlust der *ds*-Funktion, die für die Ausbildung des globalen Polarisierungssignals benötigt wird, oder bei Verlust der nicht-zellautonomen *fz*-Funktion. Es kommt als Zeichen der gestörten Gewebepolarisierung zur Ausbildung von reverser Polarität in bestimmten Regionen des Flügels, in denen die Flügelhaare nach proximal zeigen. Zellen des pupalen Flügelepithels, die *baz* überexprimieren, lokalisieren Fmi an allen Zellgrenzen. Dies kann auf die Rekrutierung von Fmi_{PDZbm} durch Baz zurückgeführt werden, da in GST-

Pull-down-Experimenten die Interaktion einer Fmi-Isoform, die ein putatives PDZ-Bindemotiv besitzt, mit Baz gezeigt werden konnte. Die Defekte der PCP können durch die Ausbildung von ektopischen Fmi-Homodimeren an den anterioren und posterioren Zellgrenzen erklärt werden, die Störungen in der Weiterleitung des nicht-zell-autonomen Fz-Signal verursachen.

Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass die Überexpression von *baz* andere Defekte hervorruft als der Funktionsverlust von *fmi*. Fliegen, die lebensfähige heteroallelische Kombinationen von Mutationen im *fmi*-Gen tragen, bilden keine *ds*-ähnlichen Phänotypen bezogen auf die PCP aus (Chae et al., 1999; Usui et al., 1999). Es kommt beim Funktionsverlust von *fmi* nicht zur Ausbildung von reverser Polarität. Dies kann daran liegen, dass in diesen Fliegen die Fmi-Proteinmenge nicht vollkommen reduziert ist und so das nicht-autonome Fz-Signal weitergeleitet werden kann. Der Unterschied zwischen dem Funktionsverlust-Phänotyp von *fmi* und dem aus der Überexpression von *baz* resultierenden Phänotyp kann aber auch an Hand der veränderten Fmi-Lokalisation erklärt werden. Es ist denkbar, dass es durch die ektopische Lokalisation von Fmi zu Fehlern bei der Übermittlung des Fz-Aktivitätsgradienten kommt, da die Fz-unabhängige Anreicherung von Fmi an allen Zellgrenzen den Verlust der Korrelation von Fz-Aktivität und der Ausbildung von Fmi-Dimeren bedeutet. Die Lokalisation von Fmi an den anterioren und posterioren Zellgrenzen kann somit dazu führen, dass ein nicht existenter Fz-Aktivitätsgradient über die A/P-Achse des Flügels im Gewebe gemeldet wird. Dies kann zum Zusammenbruch des Weiterleitungssystems über die positionsabhängige Höhe der Fz-Aktivität führen. Die gestörte Weiterleitung der Fz-Aktivität könnte dann die Ausbildung des gleichen Phänotyps bewirken, wie der Verlust der *ds*-Funktion, die für die Erzeugung unterschiedlicher Fz-Aktivitäten benötigt wird, oder der Verlust der nicht-zellautonomen Fz-Funktion selbst.

4.1.1.2 Die Überexpression von *baz* ruft zellautonome Defekte hervor

Die Überexpression von *baz* mit dem *enG4*-Treiber im posterioren Kompartiment des Flügels erzeugt keine Defekte der PCP im angrenzenden anterioren Kompartiment. In wildtypischen Zellen, die an *baz*-überexprimierende Zellen angrenzen, kann die korrekte subzelluläre Lokalisation von Fmi an den distalen und proximalen Zellgrenzen nachgewiesen werden. Bei Detektion des Fmi-Proteins in Antikörperfärbungen kommt es zur Markierung der Zellgrenzen zwischen dem überexprimierenden und dem wildtypischen Bereich. Diese ist vermutlich ausschließlich auf die Lokalisation von Fmi am anterioren Kortex der überexprimierenden Zellen zurückzuführen. Die Ausbildung ektopischer Fmi-Homodimere zwischen den anterioren Zellgrenzen der Zellen, die *baz* überexprimieren, und den posterioren Zellgrenzen der wildtypischen Zellen ist auf Grund der korrekten Ausbildung der PCP in den wildtypischen Zellen unwahrscheinlich. Da sich die Defekte der PCP also ausschließlich auf die überexprimierenden Zellen beschränken, wird die Veränderung der Fmi-Lokalisation durch die Überexpression von *baz* zellautonom bewirkt.

Die Zellautonomie der Defekte ist ein weiterer Hinweis dafür, dass die Störungen der PCP tatsächlich auf eine Interaktion von Baz mit Fmi_{PDZbm} zurückzuführen sind. *fmi*⁻-mutante Zellklone zeigen auf Grund der verhinderten Ausbildung von Homodimeren an den Klongrenzen und der dadurch unterbrochenen Zell-Zell-Kommunikation ebenfalls ausschließlich zellautonome Defekte (Strutt et al., 2002; Usui et al., 1999).

Bei Verlust der nicht-autonomen Funktion von Fz in Zellklonen wird Fmi in den angrenzenden wildtypischen Zellen dem Gefälle der Fz-Aktivität folgend lokalisiert. Es kommt in den wildtypischen Zellen zur Lokalisation von Fmi an den Zellgrenzen, die an den Klongrenzen, und an den gegenüberliegenden Seiten (Strutt and Strutt, 2002). Solche Effekte sind in den Zellen, die an die *baz*-überexprimierende Region angrenzen, nicht zu beobachten. Daraus kann geschlossen werden, dass die Überexpression von *baz* keinen direkten Einfluss auf das nicht-autonome Fz-Signal, wohl aber auf seine Weiterleitung über Zell-Zell-Kommunikation hat.

Da die Überexpression von *baz* in den ausgewerteten Tieren im posterioren Kompartiment erfolgte, muss die Lokalisation von Fmi an den Grenzen von Klonen, die *baz* überexprimieren, erneut untersucht werden, da die Ausbildung der ektopischen Fmi-Homodimere durch die Existenz der Kompartimentsgrenze unterbrochen sein könnte.

Überexprimierende Zellen, die an der Kompartimentsgrenze in Kontakt zu wildtypischen Zellen stehen, zeigen keine Störung der PCP. Diese Unterdrückung des Überexpressionsphänotyps kann nicht über die proximale und distale Lokalisation von Fmi in den wildtypischen Nachbarzellen erklärt werden, da der Effekt auch eintritt, wenn die Zellen ausschließlich über die anteriore Zellgrenze mit den wildtypischen Zellen in Kontakt stehen.

4.1.2 Durch die Überexpression von *baz* kann der Aufbau des intrazellulären Fz-Signals gestört werden

Fmi stabilisiert Fz am distalen Zellkortex, was zur Erhöhung der distalen Fz-Aktivität führt. Die erhöhte Fz-Aktivität ist die Voraussetzung für die Positionierung des Flügelhaares am distalen Zellkortex (Strutt, 2001; Usui et al., 1999).

4.1.2.1 Die Rekrutierung von Fmi_{PDZbm} durch Baz kann zur Überlagerung der asymmetrischen Umverteilung führen

In wildtypischen Zellen des pupalen Flügelepithels ist Baz nicht asymmetrisch verteilt (Abb. 3.8, e). Es ist daher anzunehmen, dass die Interaktion von Baz mit Fmi_{PDZbm} der apikalen Lokalisation von Fmi dient und nicht der asymmetrischen Umverteilung von Fmi. Wenn man annimmt, dass die spätere Umverteilung von Fmi nach proximal und distal von Baz unabhängig verläuft, kann die ektopische Lokalisation von Fmi, hervorgerufen durch die Überexpression von *baz*, durch eine andauernde Rekrutierung von Fmi_{PDZbm} erklärt werden. Diese fortdauernde Rekrutierung kann die Baz-unabhängige Umverteilung von Fmi stören oder überlagern.

Zur Überprüfung, ob Baz eine Funktion bei der Rekrutierung von Fmi an die apiko-laterale Membran hat, kann die Lokalisation von Fmi in für *baz*⁻-mutanten Zellklonen im pupalen Flügelepithel untersucht werden.

4.1.2.2 Ektopische Lokalisation von Fmi kann den Aufbau des intrazelluläre Fz-Gradienten verhindern

Die distale Lokalisation von Fmi wird für die Stabilisierung von Fz am distalen Zellkortex und damit für den Aufbau des Gradienten benötigt (Strutt, 2001; Usui et al., 1999). Die ektopische Lokalisation von Fmi_{PDZbm} und der dadurch postulierte Aufbau von Fmi-Homodimeren an allen Zellgrenzen könnte die Stabilisierung von Fz am gesamten apikalen Zellkortex bewirken. Dadurch würde der Aufbau eines Fz-Gradienten verhindert, was die Fehlpositionierung der Flügelhaare zur Folge hätte.

Zur Überprüfung dieser Annahme kann die subzelluläre Lokalisation von Fz bei der Überexpression von *baz* mit Hilfe von Antikörperfärbungen untersucht werden

4.1.2.3 Die erhöhte Aktivität von Fmi am distalen Kortex kann durch Lokalisation der Isoform Fmi_{PDZbm} erklärt werden

Es ist bis heute unbekannt wie Fmi die Fz-Signaltransduktion ausschließlich am distalen Zellkortex verstärkt (Strutt, 2001; Usui et al., 1999).

Aufgrund der selektiven Bindung von Baz an Fmi_{PDZbm} kann ein Modell aufgestellt werden, dass die Verstärkung der Fz-Aktivität am distalen Kortex durch die dort lokalisierte Isoform Fmi_{PDZbm} erklärt. Vorstellbar ist, dass Fmi_{PDZbm} durch Baz an alle apikalen Zellgrenzen rekrutiert wird. Über einen von Baz unabhängigen Prozess könnten nun freie, nicht an Baz gebundene Fmi-Moleküle an den proximalen Zellkortex gebracht werden, die mit den distal lokalisierten Fmi_{PDZbm}-Molekülen der angrenzenden Zelle eine Bindung eingehen. Wenn anschließend alle nicht an Fmi gebundenen Fmi_{PDZbm}-Moleküle durch Lösung der Verbindung zu Baz von der Membran delokalisiert würden, entstünden Fmi_{PDZbm}:Fmi-Dimere an den D/P-Zellgrenzen. Fmi_{PDZbm} wäre ausschließlich am distalen Zellkortex lokalisiert. Da Dsh ein PDZ-Motiv besitzt, wäre so die Möglichkeit gegeben, die Fz-Signaltransduktion am distalen Kortex über die Rekrutierung des „downstream-Effektors“ Dsh zu verstärken.

Die Kolokalisation von Fmi und Dsh und ihre Abhängigkeit voneinander bei ihrer asymmetrischen Umverteilung ist bereits bekannt (Shimada et al., 2001). Allerdings konnte *in vitro* eine schwache Interaktion zwischen dem C-Terminus des Fz-Homolog und einem Bereich der PDZ-Domäne des Dsh-Homologs in *Xenopus* gezeigt werden (Wong et al.,

2003). Diese Bindung wirkt inhibierend auf die Signaltransduktion über den „canonical“-Wnt-Signaltransduktionsweg und beeinflusst die „noncanonical“-Wnt-Signaltransduktion nicht. Ob diese Daten gegen eine Bindung von Fmi an Dsh in *Drosophila* sprechen, ist unklar. Es bedarf daher genauerer Untersuchungen zur Interaktion zwischen Fmi und Dsh, z. B. durch GST-Pull-down-Experimente und/oder durch Co-Immunopräzipitation. Um Unterschiede in der subzellulären Lokalisation von Fmi_{PDZbm} und Fmi zu untersuchen, muss ein Fmi_{PDZbm}-spezifischer Antikörper generiert werden.

4.1.3 Die Überexpression von *baz* erzeugt *dachsous*⁻-ähnliche Phänotypen in Morphologie und PCP

Durch die Expression eines *fz*-Transgens in *fz*⁻-mutanten Fliegen gelang es, die nicht-zellautonome Funktion von Fz unabhängig von seiner späteren zellautonomen Funktion zu untersuchen (Strutt and Strutt, 2002). Es zeigte sich, dass der Verlust der nicht-zellautonomen Fz-Funktion im Flügel zur Ausbildung von *dachsous*⁻-(*ds*)-ähnlichen Defekten der planaren Polarität führt. Es wird daher vermutet, dass die *ds*-Funktion für die *dsh*-unabhängige nicht-zellautonome Weiterleitung und Aufrechterhaltung des Fz-abhängigen Signals benötigt wird, während die intrazelluläre, *dsh*-abhängige Signaltransduktion von *ds* unabhängig verläuft (Adler et al., 1998; Strutt and Strutt, 2002). Der Verlust der ersten, nicht-zellautonomen Fz-Funktion erzeugt keine Defekte in der Flügelmorphogenese. Diese äußern sich in *ds*⁻-Mutanten in der Verkürzung des Flügels und in der fehlerhaften Ausbildung der Flügelvenen. Daraus wird geschlossen, dass die Effekte von *ds* auf die Ausbildung der PCP und auf die Flügelmorphogenese zwei separate Funktionen darstellen (Strutt and Strutt, 2002).

4.1.3.1 Durch die Überexpression von *baz* werden Störungen in der Morphologie des Flügels erzeugt

Die Überexpression von *baz* in der gesamten Flügelblattanlage führt zusätzlich zur Störung der PCP zur Ausbildung von starken Morphogenesedefekten. Der Flügel ist stark verkürzt und zeigt Defekte in der Ausbildung der Flügelvenen.

Es wird angenommen, dass die Funktion von Ds bei der Flügelmorphogenese eine von Fz unabhängige Funktion darstellt (Adler et al., 1998; Strutt and Strutt, 2002). Deshalb können die durch die Überexpression von *baz* erzeugten Morphogenesedefekte nicht über die Fehlverteilung von Fmi und ihre Folgen auf die Verbreitung des nicht-zellautonomen Fz-Signals erklärt werden.

Ds ist wie Baz in der subapikalen Region aller Zellgrenzen lokalisiert ist und wird nicht asymmetrisch umverteilt (Ma et al., 2003). Da Ds zudem ein putatives PDZ-Bindemotiv besitzt (GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, accession number Q24292; (Harris and Lim, 2001)), könnten die bei der Überexpression von *baz* auftretenden Defekte in Morphologie und PCP auf eine direkte Interaktion von Baz mit Ds zurückzuführen sein. Nach einem Modell von Ma et al. gehen die atypischen Cadherine Fat (Ft) und Ds an den Zellgrenzen des pupalen Flügelepithels heterophile interzelluläre Interaktionen miteinander ein, die von Four Jointed (Fj) reguliert werden. Sowohl der Funktionsverlust von Ft als auch der von Ds führt bei gleichzeitiger Überexpression von Fz zur Ausweitung nicht-autonomer PCP-Defekte. Es wird deshalb vermutet, dass Fat und Ds an der Ausbildung des globalen Polarisierungssignals beteiligt sind. Dieses beschränkt die Wirkung des nicht-autonomen Fz-Signals auf eine bestimmte Reichweite. Die Überexpression von Baz könnte durch die Störung der Ft/Ds-Stöchiometrie den Zusammenbruch des globalen Polarisierungssignales bewirken und somit *ds⁻*-ähnliche Defekte der PCP verursachen.

Für die Ausbildung der Morphogenesedefekte in *ds⁻*-Mutanten wird u. a. eine veränderte Zelladhäsion verantwortlich gemacht (Adler et al., 1998; Clark et al., 1995). In *ds⁻*-mutanten Zellklonen wird die verminderte Zelladhäsion durch die Abrundung der Zellen sichtbar. Veränderungen in der Zellform sind auch in Bereichen des pupalen Flügelepithels zu beobachten, die *baz* überexprimieren. Dies könnte als Zeichen für die negative Beeinflussung der *ds*-Funktion durch die Überexpression von *baz* gewertet werden. Zur Überprüfung dieser Annahme kann die Lokalisation des Ds-Proteins mit Hilfe von Antikörperfärbungen in Flügeln, die *baz* überexprimieren, untersucht werden.

Gegen ein Modell, wonach die Überexpression von *baz* zum Funktionsverlust von *ds* führt, spricht, dass in *ds*-mutanten Zellklonen Fmi asymmetrisch verteilt ist (Ma et al., 2003). Durch die Überexpression von Baz wird hingegen die Lokalisation von Fmi an alle Zellgrenzen bewirkt. Es ist daher möglich, dass Baz die Lokalisation von Fmi und Ds beeinflusst, was bei der Überexpression von *baz* zur Ausbildung eines kombinierten Phänotyps führen könnte.

Es ist aber auch möglich, dass das überexprimierte Baz-Protein selbst oder die ektopische Lokalisation von Fmi auf noch unerklärbare Weise *ds*⁻-ähnliche Morphogenesedefekte erzeugt. Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Gradienten von Ds und Fj nicht von Bedeutung für die Ausbildung eines globalen Signals zur Etablierung von PCP sind (Simon, 2004, Matakatzu and Blair, 2004). Die Funktion von *ds* bleibt somit weiterhin unklar. Die Tatsache, dass die Überexpression von *baz* sowohl zur Ausbildung von Morphogenesedefekten als auch zu Defekten der PCP bei einer gleichzeitigen Fehlverteilung von Fmi führt, sollte zum Anlass genommen werden, das Zusammenspiel von apikobasaler Zellpolarität, Gewebepolarität, Morphogenese und Zelladhäsion genauer zu untersuchen.

4.2 Die Unterdrückung des *baz*-Überexpressionsphänotyps erfolgt auf verschiedenen Ebenen

Interaktionen Genen, die auf verschiedenen Ebenen an der Ausbildung von PCP beteiligt sind, führen zur Unterdrückung der durch die Überexpression von *baz* hervorgerufenen Störungen der PCP. Die Unterdrückung des morphologischen Phänotyps wurde nicht untersucht.

4.2.1.1 Eine partielle Unterdrückung wird durch die Reduktion der Gendosis von *baz* oder DaPKC erreicht

In Fliegen, in denen das als amorph beschriebene Allel *baz*^{xi106} heterozygot vorliegt, erfolgt eine partielle Unterdrückung der durch die Überexpression von *baz* hervorgerufenen Defekte der PCP. Mit dem heterozygot vorliegenden Allel *baz*⁸¹⁵⁻⁸ kann hingegen keine Unterdrückung der Defekte erreicht werden. Beiden Allelen liegen Mutationen zu Grunde, die ein Stopp-Kodon erzeugen (für das Allel *baz*^{xi106} an der Position Q374 und für das Allel *baz*⁸¹⁵⁻⁸ an der Position E253; Wodarz, persönliche Mitteilung). Dies führt in beiden Fällen zum Erhalt eines stark verkürzten Proteins, was einen vollständigen Funktionsausfall des Baz-Proteins vermuten lässt. Eine Unterdrückung des Überexpressionsphänotyps mit dem Allel *baz*^{xi106} kann daher auf die Reduktion der Gesamtmenge an Baz und der damit einhergehenden Reduktion des apikal lokalisierten Baz-Proteins zurückgeführt werden. Hierdurch könnte die andauernde Rekrutierung von Fmi_{PDZbm}-Molekülen an die A/P-Grenzen verringert oder unterbunden werden. Warum mit dem Allel *baz*⁸¹⁵⁻⁸ nicht derselbe Effekt erzielt werden kann ist unklar. Die Phosphorylierung von Baz durch die DaPKC scheint für die Lokalisation des überproduzierten Proteins an die apikolaterale Membran oder für dessen Fähigkeit, Fmi_{PDZbm} zu rekrutieren, ebenfalls notwendig zu sein, denn die Reduktion der DaPKC durch das heterozygot vorliegende amorphe Allel DaPKC^{k06403} führt ebenfalls zur Unterdrückung des Überexpressionsphänotyps.

4.2.1.2 *baz* interagiert genetisch mit verschiedenen, an der Ausbildung von PCP beteiligten Genen

Eine vollständige Wiederherstellung der planaren Polariät wird durch die heterozygot vorliegenden Allele *fmi*^{E59} und *fmi*¹⁹², beides „loss-of-function“- Mutationen des Gens *fmi*, erreicht. Dies kann über den Verlust aktiver Fmi-Komplexe an den anterioren und posterioren Zellgrenzen erklärt werden, wenn man davon ausgeht, dass weniger Fmi_{PDZbm} nach apikal rekrutiert werden kann, oder das nach apikal rekrutierte Protein nicht funktionell ist. So verursacht die dem Allel *fmi*^{E59} zu Grunde liegende Mutation den vorzeitigen Abbruch der Translation. Dies führt zum Erhalt eines verkürzten Fmi-Proteins, das nur einen Teil der extrazellulären Domäne besitzt. Die Transmembrandomänen und der zytoplasmatische Anteil fehlen, dadurch wird die Rekrutierung dieses verkürzten Fmi-Proteins durch Baz unmöglich. Eine partielle Wiederherstellung der planaren Polarität kann durch das heterozygot vorliegende Allel *stbm*⁶, eine „loss-of-function“-Mutation im Gen *stbm*, erreicht werden. *Stbm* wirkt auf die apikale Lokalisation von Fmi stabilisierend (Bastock et al., 2003). Die partielle Unterdrückung des Überexpressionsphänotyps von *baz* bei verminderter *stbm*-Genfunktion kann damit erklärt werden, dass weniger funktionelles *Stbm*-Protein zur Stabilisierung ektopischer Fmi-Komplexe von der Zelle bereitgestellt wird.

Ebenfalls eine partielle Unterdrückung des Überexpressionsphänotyps von *baz* erfolgt durch die Reduktion der *prickle* (*pk*)-Gendosis bei dem heterozygot vorliegenden Allel *pk*¹, einer „loss-of-function“-Mutation. *Pk* bindet an *Stbm* und nach der asymmetrischen Umverteilung sind beide Proteine in einem Komplex am proximalen Zellkortex lokalisiert (Bastock et al., 2003). *Pk* wirkt antagonistisch zu *Dsh* und verhindert die Fz-Signaltransduktion am proximalen Kortex (Ma et al., 2003; Tree et al., 2002). Es wäre daher anzunehmen, dass bei Herabsetzung der antagonistischen *Pk*-Funktion der verstärkende Einfluss von Fmi auf die Fz-Signaltransduktion auch in ektopischen Fmi-Komplexen vergrößert wird. Die Unterdrückung des Überexpressionsphänotyps durch die Reduktion der *pk*-Gendosis kann somit an Hand der bis heute vorhandenen Erkenntnisse nicht erklärt werden.

4.2.1.3 *baz* interagiert mit Genen, die an der Ausbildung des globalen Polarisierungssignals beteiligt sind

Die Überexpression von *baz* erzeugt Defekte der PCP, die auf den Verlust der *ds*-Funktion hindeuten. Trotzdem kann der Überexpressionsphänotyp durch die Verringerung der *ds*-Gendosis durch das heterozygot vorliegende „loss of function“-Allel ds^{UAO71} vollständig unterdrückt werden. Das deutet darauf hin, dass die Überexpression von *baz* einen Funktionszugewinn von Ds bewirkt, der sich in einer erhöhten Produktion oder vermehrten Rekrutierung von Ds an den apikalen Kortex äußern könnte und daher durch eine Reduktion des Ds-Proteins gemindert werden kann. Da jedoch ein Phänotyp erzeugt wird, der dem Funktionsverlust von Ds entspricht, könnte die Anreicherung von Ds die Funktionsfähigkeit von Ds herbsetzen.

Eine Unterdrückung des Überexpressionsphänotyps kann mit keinem der anderen getesteten *ds*-Allele ds^W („loss-of-function“) und ds^{33k} (unbekannt) erzielt werden, weshalb die Wiederherstellung der PCP durch ds^{UAO71} auch durch eine genauer zu untersuchende Allelspezifische Interaktion mit *baz* zustande kommen könnte.

Ebenfalls eine vollständige Wiederherstellung der PCP wird durch die Überexpression von *Fj* erzielt. Nach einem Model, das zur Erklärung der Ausbildung von planarer Polarität im Komplexauge von *Drosophila* aufgestellt wurde, wirkt *Fj* hemmend auf Ds (Fanto et al., 2003). Die Überexpression von *ff* könnte demnach über die Anhebung der *Fj*-Proteinmenge der „Überaktivierung“ von Ds entgegen wirken und zu einer Wiederherstellung der PCP führen. Widersprüchlich zu dieser möglichen Wechselbeziehung ist die Beobachtung, dass auch die Reduktion der *ff*-Funktion durch das „loss-of-function-Allel“ ff^{dl} zu einer partiellen Wiederherstellung der PCP führt.

Ebenfalls mit den bis heute existierenden Daten nicht zu erklären ist die partielle Wiederherstellung der PCP durch die Herabsetzung der *ft*-Funktion durch das heterozygot vorliegende Allel ft^1 , einem nicht genauer charakterisiertem, lebensfähigem Allel. *Ft* agiert „downstream“ von Ds bei der Ausbildung des Signals zur Gewebepolarisierung und wird durch Ds inhibiert (Ma et al., 2003). Eine Überaktivierung von *ds*, hervorgerufen durch die Überexpression von *baz*, würde demnach eine verstärkte Inhibition von *Ft* und damit eine

Reduktion des polarisierenden Signals zur Folge haben, was dem beobachteten Phänotyp entspricht. Dieser Phänotyp sollte daher nicht durch einen zusätzlichen Funktionsverlust von *ft* unterdrückt werden können.

Die Wechselwirkungen von Ft, Ds und Fj im Flügelepitel sind nur unvollständig geklärt und die publizierten Daten stehen teilweise zueinander im Widerspruch (Ma et al., 2003; Simon, 2004; Strutt et al., 2004). Es kann daher auf Grund der bis jetzt zur Verfügung stehenden Daten kein Modell für die Wirkung der Überexpression von *baz* auf die Ausbildung des Polarisierungssignals im Flügel aufgestellt werden.

4.2.1.4 Die Überexpression von *baz* beeinflusst die Dpp-aktivierte Signaltransduktion

Die Überexpression von *baz* im Flügel führt zur Ausbildung von verbreiterten Flügelvenen. Dieser Phänotyp ist auch zu beobachten, wenn *dpp* (*decapentaplegic*), welches für ein sekretiertes Protein der TGF- β -Familie (*transforming growth factor*) kodiert, oder eine konstitutiv aktive Form der von *tkv* kodierten Rezeptoruntereinheit in den Zellen des pupalen Flügelepithels, die die Venen ausbilden, überexprimiert wird (de Celis, 1997). Da Venendefekte bei Überexpression von *baz* mit allen verwendeten Treibern, *ptcG4*, *enG4*, *ombG4* beobachtet werden, kann eine Aktivierung der Dpp-Signaltransduktion als Folge der Überexpression von *baz* angenommen werden.

Die durch die Überexpression von *baz* hervorgerufenen Defekte der planaren Zellpolarität werden durch *tkv*^{K16713}, einem hypomorphen Allel, in Heterozygose vollständig unterdrückt, während durch *tkv*⁷, einem „loss of function“-Allel, keine Unterdrückung des Überexpressionsphänotyps von *baz* erreicht wird. Die Bedeutung dieser Allel-spezifischen Interaktion ist unklar. Sie kann aber als weiterer Hinweis für die Aktivierung der Dpp-vermittelten Signaltransduktion durch die Überexpression von *baz* gewertet werden, da sie durch Herabsetzung der Rezeptorfunktion erreicht wird.

Eine Folge der durch die Überexpression von *baz* aktivierten Dpp-Signaltransduktion könnte die vermehrte Transkription der „downstream“-Komponente *zip* sein, da die Transkription von *zip* durch Dpp aktiviert wird (Arquier et al., 2001). Das ist vereinbar mit der Beobachtung, dass eine partielle Wiederherstellung der PCP durch eine Defizienz erreicht wird, in der das Gen *zipper* (*zip*) liegt. Diese Unterdrückung des Überexpressionsphänotyps von *baz* kann allerdings auch auf die Reduktion der Funktion anderer in der Deletion

liegender Gene zurückzuführen sein. Diese Möglichkeit soll hier nicht diskutiert werden. Ob die partielle Wiederherstellung der PCP durch die Reduktion der *zip*-Funktion erreicht wird, muss mit Hilfe reiner *zip*-Allele erneut überprüft werden.

zipper (*zip*) kodiert für eine Untereinheit des nicht-muskulären Myosins (nonmuscle myosin heavy chain, NMHC), einem Motorprotein, das die Aktinkontraktion und -akkumulation fördert und so Zellformveränderungen bewirkt (Blake et al., 1999; Young et al., 1993). Eine verstärkte Anreicherung von NMHC in den *baz*-überexprimierenden Zellen des Flügelepithels könnte deshalb die Verhinderung der Zellstreckung bewirken, was so zur Verkürzung der *baz*-überexprimierenden Flügelregionen führen könnte. Der Einfluss von Zip auf die Positionierung der Flügelhaare, die bei der Unterdrückung des Überexpressionsphänotyps berücksichtigt wurde, ist bislang unbekannt. Untersucht ist jedoch, dass NMHC in den Zellen des pupalen Flügelepithels zu der Zeit, in der das Flügelhaar ausgebildet wird, am distalen Zellkortex akkumuliert und in einem Signalweg „downstream“ zu Fz/Dsh angeordnet ist, der die Zahl der Flügelhaare kontrolliert (Winter et al., 2001). NMHC wird bei der Ausbildung der Flügelhaare für die Bündelung von Aktinfilamenten benötigt. Die Fähigkeit von NMHC, Aktin zu binden, wird durch die Phosphorylierung der regulatorischen leichten Kette des nicht-muskulären Myosins (nonmuscle myosin regularory light chain, MRLC) erhöht. Diese Phosphorylierung erfolgt durch die Rho-assoziierte Kinase Drok (Winter, 2001). Sowohl die fehlende Phosphorylierung von MRLC in *Drok*-Mutanten, als auch die Hyperphosphorylierung dieses regulatorischen Elementes führt zur Ausbildung von multiplen Flügelhaaren. Die Überexpression von *baz* führt ebenfalls in einigen Zellen zur Ausbildung von multiplen Flügelhaaren (Abb. 3.8, f’), die durch die Überaktivierung von NMHC hervorgerufen werden könnte. Diese Überaktivierung von NMHC könnte die Folge einer erhöhten intrazellulären Fz-Aktivität sein, die in den *baz*-überexprimierenden Zellen durch die Ausbildung ektopischer Fmi-Dimere hervorgerufen werden könnte (siehe 4.1.2.2).

Die Überexpression von *baz* könnte somit nicht nur die Transkription von *zip* über Dpp beeinflussen, sondern über die Anhebung der intrazellulären Fz-Aktivität die Fähigkeit von Zip, an Aktin zu binden, erhöhen.

Die Wiederherstellung der PCP des PCP-Phänotyps durch die Reduktion der Gendosis von *zip* setzt eine Funktion von NMHC bei der Positionierung des Flügelhaares voraus. Über eine solche Funktion ist in der Literatur nichts verzeichnet. Bisher konnte die Beteiligung von Zip nur bei der von Drok abhängigen Kontrolle der Anzahl an Flügelhaaren pro Zelle gezeigt werden. Daher bleibt der Grund für die Wiederherstellung der PCP durch die Reduktion der *zip*-Gendosis unklar. Denkbar ist aber, dass Zip auch in einen Signalweg unabhängig von

Drok die Modulation des Aktinzytoskeletts bewirkt und so zur Positionierung des Flügelhaares am distalen Zellkortex beiträgt.

Über den Einfluss von Dpp auf die Positionierung der Flügelhaare ist ebenfalls nichts bekannt. Bekannt ist jedoch seine Funktion bei der Initiation von Zellformveränderungen. So bewirkt Dpp die Elongation der lateralen Epidermiszellen beim dorsalen Schluss von *Drosophila* und wird hierzu durch den sog. JNK-Signalweg aktiviert (Affolter et al., 1994; Glise and Noselli, 1997; Scuderi and Letsou, 2005). Ein Signaltransduktionsweg des Fz-Rezeptors verläuft über Cdc42 und mündet in der JNK-Signaltransduktion. Damit besteht die Möglichkeit, dass die erhöhte Signaltransduktion über Dpp in *baz*-überexprimierenden Zellen des pupalen Flügelepithels eine Folge verstärkter Fz-Aktivität, hervorgerufen durch die ektopische Lokalisation von Fmi, ist.

Eine weitere Möglichkeit für Baz mit der Fz-Signaltransduktion zu interferieren ist durch Cdc42 gegeben, das „downstream“ von Dsh und „upstream“ der JNK-Signaltransduktion agiert. Cdc42 ist im GTP gebundenen Zustand mit Par-6 assoziiert, also im Baz-Komplex lokalisiert (Hutterer et al., 2004; Petronczki and Knoblich, 2001). Die Überexpression von *baz* könnte die Aktivität von Cdc42 verändern und so über die Signaltransduktion im JNK-Signalweg die Dpp-vermittelte Signaltransduktion aktivieren.

Die Interaktion von Baz und Cdc42 könnte bei der Überexpression von *baz* zusätzlich auch unabhängig von Dpp zu Defekten in Positionierung der Flügelhaare führen. Cdc42 gehört zur Rho-Familie der kleinen GTPase, die als Bindeglieder zwischen Signaltransduktionsprozessen und Prozessen, die Zellpolarität, Zelladhäsion und Zellelongation steuern, gelten (Genova, 2000). Im pupalen Flügelepithel kontrolliert Cdc42 die Positionierung der Flügelhaare durch die Aktinpolymerisation am distalen Zellkortex (Eaton, 1995). Die Überexpression von *baz* könnte die Aktivität und/oder die Lokalisation von Cdc42 innerhalb der Zelle verändern und somit den Ort der verstärkten Aktinpolymerisation und damit die Positionierung der Flügelhaare beeinflussen. Um die genetische Interaktion von *Cdc42* und *baz* bei der Ausprägung der PCP-Defekte im Flügel zu untersuchen, sollte auch der Einfluss von Mutationen in *Cdc42* auf die Ausbildung des Überexpressionsphänotyps von *baz* durch Kreuzungsexperimente untersucht werden.

Um zu einer zuverlässigen Aussage über die diskutierten genetischen Interaktion mit *baz* bei den durchgeführten Kreuzungsexperimenten zu gelangen, ist es nötig die Ergebnisse mit verschiedenen Allelen desselben Gens zu bestätigen, da der genetische Hintergrund der verwendeten Stämme Effekte auf die Wiederherstellung der PCP haben kann.

4.2.2 PCP-Komponenten steuern verschiedene morphogenetische Prozesse in *Drosophila*

In den Malpighischen Gefäßen (MG) von *Drosophila* ist sowohl der zygotische Verlust der *baz*-Funktion als auch die Delokalisation des Baz-Proteins in *leo*⁻-Mutanten mit einem fehlerhaften Verlauf der konvergenten Extension assoziiert. Daraus folgt die unvollständige Elongation der MG (diese Arbeit, (Wasserscheid, 2001)).

Ähnliche Defekte der MG treten in mutanten Embryonen auf, in denen die Reorganisation des Zytoskeletts verhindert wird, z. B. durch die Störung der Interaktion von Aktin und Myosin oder durch die Verhinderung der Signaltransduktion über Dpp (Jack and Myette, 1999; Blake et al., 1999). Baz könnte an Prozessen, die durch Umorganisation des Zytoskeletts Zellformveränderungen bewirken, über die im Baz-Komplex lokalisierte kleine GTPase Cdc42 beteiligt sein, da Cdc42 als Aktivator des JNK-Signaltransduktionswege in verschiedenen morphogenetischen Prozessen Zellformveränderung und Zellstreckung bewirkt (Genova et al., 2000).

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Funktion von Baz bei der Ausbildung von PCP geben Anlass zu der Überlegung, ob *baz* die konvergente Extension der MG über die Lokalisation des Proteins Fmi beeinflussen kann. Über die molekularen Grundlagen der konvergenten Extension in den MG ist bisher wenig bekannt. Es wird vermutet, dass die kleinen GTPasen Rho und Rac, die als Regulatoren des Aktinzytoskeletts bekannt sind, an der Elongation der MG beteiligt sind. Außerdem wird die Funktion von NMHC bei der Interkalation der Zellen bei diesem Prozess diskutiert (Jung et al., 2005). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die sog. Hauptkomponenten für PCP in *Drosophila* nicht nur an der Ausbildung von planarer Polarität im Flügel und im Auge sondern auch beim dorsalen Schluss im *Drosophila* Embryo beteiligt sind (Lawrence and Morel, 2003; Mlodzik, 2002; Strutt, 2003). Homologe dieser Proteine sind außerdem in Vertebraten bei der Gastrulation an der konvergenten Extension, die der Verlängerung der Körperachse dient, beteiligt (Axelrod and McNeill, 2002). Allen genannten Prozessen gemeinsam ist die durch den PCP-Signalweg gesteuerte Umorganisation des Aktin- und des Mikrotubulizytoskeletts, die der Polarisierung oder der Elongation von Zellen oder der Ausbildung von Zellfortsätzen dienen kann. Die verschiedenen Beispiele zeigen, dass es sich beim PCP-Signalweg um einen häufig ablaufenden Prozess zur Gewebedifferenzierung handelt. Denkbar ist, dass auch die Umorganisation des Zytoskeletts, die Zellformveränderungen und Zellinterkalation bei der konvergenten Extension der MG

ermöglicht, von PCP Komponenten abhängig ist. Baz könnte in diesem Zusammenhang die Funktion haben, Fmi zur apikolateralen Membran zu rekrutieren. Für das Flügelepithel konnte bereits gezeigt werden, dass Fmi für die apikale Lokalisation aller anderen an der Ausbildung von PCP beteiligten Proteine benötigt wird. Die Tatsache, dass sowohl die Reduktion des Baz-Proteins als auch seine Delokalisation mit Defekten bei der Elongation der MG verbunden ist, könnte somit durch die fehlende apikale Lokalisation aller PCP-Komponenten erklärt werden. Ein Hinweis für die Beteiligung des PCP-Signalweges bei der Morphogenese der MG sind die durch den Funktionsverlust von *dsh* oder *fmi* verursachten Defekte der MG, die ebenfalls die Elongation betreffen (Helen Skaer, persönliche Mitteilung).

Über die apikale Lokalisation von Fmi durch Baz kann wegen der Funktion von Fmi bei der Regulation der Fz-Aktivität eine Verbindung zum Fz-Signalweg hergestellt werden. Durch die Fz-Signaltransduktion wiederum können der JNK-Signalweg und die Signaltransduktion über Dpp reguliert und so Transkription von *zip* und die Fähigkeit des Zip-Proteins, Aktin zu binden, beeinflusst werden. Dass durch die Reduktion von Baz und die Delokalisation von Baz ähnliche Defekten in den MG erzeugt werden, wie durch Störungen der Dpp-Signaltransduktion oder der Aktin-Myosin-Interaktion, könnte ein Hinweis auf eine veränderte Fz-Signaltransduktion in *baz⁻* und *leo⁻*-Mutanten sein.

Um die Zusammenhänge zwischen der apikalen Lokalisation von Baz und einer möglichen Funktion der PCP-Proteine bei der konvergenten Extension der MG zu untersuchen, muss zunächst die Expression und die apikale Lokalisation von Fmi in den MG mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen werden.

4.3 Die Reduktion der *baz* Funktion im Flügelepitel erzeugt nur leichte Defekte in der Morphogenese des Flügels

Durch induzierbare RNAi können keine Defekte in der apiko-basalen Polarität des embryonalen Epidermisepithels erzeugt werden. Durch den RNAi-Effekt wird das Baz-Protein in den untersuchten embryonalen Epithelien nur leicht reduziert. In Flügelimaginalscheiben kommt es hingegen durch induzierte RNAi zu einer deutlichen Reduktion der Menge an Baz-Protein, gleichzeitig bleibt die apiko-basale Polarität des Imaginalscheibenepithels erhalten. In adulten Fliegen führt die Proteinreduktion von Baz durch die Expression des *UASbaz^{ri}* Konstruktes zum Verlust der im Expressionsbereich liegenden Quervene oder zur Ausbildung von ektopischen Campaniformen Sensillen. Defekte in der Ausbildung der PCP sind an Flügeln adulter Tiere nicht festzustellen. Dies kann daran liegen, dass die Reduktion des Baz-Proteins durch den RNAi-Effekt nicht vollständig ist und das restliche Baz-Protein für die postulierte Funktion von *baz* bei der Ausbildung von PCP, etwa für die apikale Lokalisation von Fmi, ausreicht. Um diese Annahme zu untersuchen, müssen *baz⁻*-mutante Zellkone im Flügelepitel auf ihre Fähigkeit PCP auszubilden untersucht werden. Eine andere Erklärung dafür, dass die Reduktion von Baz keine Störungen der PCP hervorruft, kann die Redundanz der *baz*-Funktion zu der Funktion anderer Gene bei der Ausbildung von PCP sein. Trifft diese Vermutung zu, würde erst die Ausschaltung aller an diesem Prozess beteiligten Gene zu Störungen der PCP führen. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die *in vitro* gezeigte Interaktion von Fmi mit Baz *in vivo*, also im pupalen Flügelepitel, nicht besteht und die beobachtete Rekrutierung von Fmi durch Baz nur in der Überexpression aber nicht im wildtypischen Epithel stattfindet. Die durch die Überexpression von *baz* im Flügelepitel hervorgerufenen Störungen der PCP wären somit die Folge einer artifiziellen Interaktion von Baz mit Fmi, und der Funktionsverlust von *baz* würde deshalb keine Defekte der PCP hervorrufen, da Baz keine Funktion bei der Ausbildung von PCP hätte. Für eine Protein-Protein-Interaktion von Baz und Fmi spricht ihre subzelluläre Lokalisation. Fmi ist im Bereich der ZA lokalisiert, während Baz in einem Komplex apikal zur ZA lokalisiert ist und eine partielle Kolokalisation mit Bereichen der ZA zeigt. Die Annahme, dass Baz und Fmi im Wildtyp in einem Komplex vorliegen, sollte daher durch eine Co-Immunopräzipitation überprüft werden.

5 Zusammenfassung

Bazooka (Baz) ist in verschiedenen Epithelien von *Drosophila* an der Etablierung und Aufrechterhaltung epithelialer Zellpolarität beteiligt und dort in einem Proteinkomplex apikal zur ZA lokalisiert. Es besitzt u. a. drei PDZ-Domänen zur Protein-Protein-Interaktion. Die Funktion von *baz* wird außer für die Polarisierung von Geweben auch für die Morphogenese von Epithelien benötigt. Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion von Baz bei der Morphogenese der Malpighischen Gefäße (MG) und des Flügelepithels zu untersuchen. Bekannt war, dass die Reduktion von Baz zu Störungen der Elongation der MG führt, die durch konvergente Extension erreicht wird. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Delokalisation von Baz in *leonardo*⁻-Mutanten ebenfalls mit der fehlerhaften Elongation der MG assoziiert ist. Da die apiko-basale Polarität in den MG bei der Reduktion und bei der Delokalisation von Baz weitgehend erhalten bleibt, kann eine direkte Funktion von Baz bei der Elongation der MG vermutet werden. Im Flügelepithel führt die Überexpression von *baz* zu Zellformveränderungen und Morphogenesedefekten des Flügels und zum Verlust der planaren Zellpolarität (PCP). Die Überexpression von *baz* stört Ausrichtung und Positionierung der Flügelhaare, was auf die Störung der asymmetrischen Verteilung des atypischen Cadherins Flamingo zurückgeführt werden kann. Eine Rekrutierung von Fmi durch Baz ist durch die *in vitro* gezeigte Bindung einer Isoform von Fmi mit einem putativen PDZ-Bindemotiv an die PDZ-Domänen von Baz möglich. Da Fmi für die apikale Lokalisation der an der Ausbildung von PCP beteiligten Proteine Frizzled und Strabismus benötigt wird, kann seine Rekrutierung durch Baz eine wichtige Verbindung zwischen der apiko-basalen Polarität und der planaren Polarität im Flügel herstellen. Durch Kreuzungsexperimente konnte die Interaktion von *baz* und *fmi* auf genetischer Ebene bestätigt werden. Es konnten weitere genetische Interaktionspartner identifiziert werden, die auf der Ebene der PCP-Komponenten wirken (*prickle*, *strabismus*). Zudem konnte die Interaktion mit *dachsous* und *four jointed* festgestellt werden, wodurch die Morphogenesedefekte des Flügels erklärt werden können. Weitere Interaktionspartner bewirken über Signaltransduktionsprozesse oder die Modulation des Aktinzytoskeletts Veränderungen in der Zellform (*thick veins*, *zipper*), was einen funktionellen Zusammenhang zu den durch die Überexpression von *baz* hervorgerufenen Zellformabnormalitäten herstellt. Da PCP-Komponenten in Vertebraten an der konvergenten Extension bei der Gastrulation beteiligt sind, könnten durch eine Interaktion von Fmi mit Baz die Defekte bei der konvergenten Extension der MG bei Reduktion/Delokalisation von Baz erklärt werden.

6 Literatur

- Aberle, H., Schwartz, H. and Kemler, R.** (1996). Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J Cell Biochem* **61**, 514-23.
- Adler, P. N.** (1992). The genetic control of tissue polarity in *Drosophila*. *Bioessays* **14**, 735-41.
- Adler, P. N.** (2002). Planar signaling and morphogenesis in *Drosophila*. *Dev Cell* **2**, 525-35.
- Adler, P. N., Charlton, J. and Liu, J.** (1998). Mutations in the cadherin superfamily member gene *dachsous* cause a tissue polarity phenotype by altering *frizzled* signaling. *Development* **125**, 959-68.
- Adler, P. N., Krasnow, R. E. and Liu, J.** (1997). Tissue polarity points from cells that have higher *Frizzled* levels towards cells that have lower *Frizzled* levels. *Curr Biol* **7**, 940-9.
- Adler, P. N., Taylor, J. and Charlton, J.** (2000). The domineering non-autonomy of *frizzled* and *van Gogh* clones in the *Drosophila* wing is a consequence of a disruption in local signaling. *Mech Dev* **96**, 197-207.
- Affolter, M., Nellen, D., Nussbaumer, U. and Basler, K.** (1994). Multiple requirements for the receptor serine/threonine kinase *thick veins* reveal novel functions of TGF beta homologs during *Drosophila* embryogenesis. *Development* **120**, 3105-17.
- Arora, K., Dai, H., Kazuko, S. G., Jamal, J., O'Connor, M. B., Letsou, A. and Warrior, R.** (1995). The *Drosophila* *schnurri* gene acts in the *Dpp/TGF beta* signaling pathway and encodes a transcription factor homologous to the human MBP family. *Cell* **81**, 781-90.
- Arquier, N., Perrin, L., Manfrulli, P. and Semeriva, M.** (2001). The *Drosophila* tumor suppressor gene *lethal(2)giant larvae* is required for the emission of the Decapentaplegic signal. *Development* **128**, 2209-20.
- Ashburner, M.** (1989). *Drosophila*, A laboratory handbook. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Axelrod, J. D.** (2001). Unipolar membrane association of *Dishevelled* mediates *Frizzled* planar cell polarity signaling. *Genes Dev* **15**, 1182-7.
- Axelrod, J. D. and McNeill, H.** (2002). Coupling planar cell polarity signaling to morphogenesis. *ScientificWorldJournal* **2**, 434-54.
- Bachmann, A.** (2000). Die Kontrolle von Morphogenese und Zellpolarität in Epithelien von *Drosophila melanogaster*. Inaugural-Dissertation. Düsseldorf.
- 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.
- Bastock, R., Strutt, H. and Strutt, D.** (2003). *Strabismus* is asymmetrically localised and binds to *Prickle* and *Dishevelled* during *Drosophila* planar polarity patterning. *Development* **130**, 3007-14.
- Baumann, P. and Skaer, H.** (1993). The *Drosophila* EGF receptor homologue (*DER*) is required for Malpighian tubule development. *Dev Suppl* **1993**, 65-75.
- Baumgartner, S., Littleton, J. T., Broadie, K., Bhat, M. A., Harbecke, R., Lengyel, J. A., Chiquet-Ehrismann, R., Prokop, A. and Bellen, H. J.** (1996). A *Drosophila* *neurexin* is required for septate junction and blood-nerve barrier formation and function. *Cell* **87**, 1059-68.
- Bellaiche, Y., Radovic, A., Woods, D. F., Hough, C. D., Parmentier, M. L., O'Kane, C. J., Bryant, P. J. and Schweisguth, F.** (2001). The Partner of *Inscuteable/Disks-large* complex is

- required to establish planar polarity during asymmetric cell division in *Drosophila*. *Cell* **106**, 355-66.
- Benton, R. and Johnston, D. S.** (2003). A conserved oligomerization domain in *Drosophila* Bazooka/PAR-3 is important for apical localization and epithelial polarity. *Curr Biol* **13**, 1330-4.
- Benton, R., Palacios, I. M. and St Johnston, D.** (2002). *Drosophila* 14-3-3/PAR-5 is an essential mediator of PAR-1 function in axis formation. *Dev Cell* **3**, 659-71.
- Benton, R. and St Johnston, D.** (2003). *Drosophila* PAR-1 and 14-3-3 inhibit Bazooka/PAR-3 to establish complementary cortical domains in polarized cells. *Cell* **115**, 691-704.
- Bilder, D. and Perrimon, N.** (2000). Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature* **403**, 676-80.
- Blake, K. J., Myette, G. and Jack, J.** (1998). The products of ribbon and raw are necessary for proper cell shape and cellular localization of nonmuscle myosin in *Drosophila*. *Dev Biol* **203**, 177-88.
- Blake, K. J., Myette, G. and Jack, J.** (1999). ribbon, raw, and zipper have distinct functions in reshaping the *Drosophila* cytoskeleton. *Dev Genes Evol* **209**, 555-9.
- Brand, A. H. and Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-15.
- Broadie, K., Rushton, E., Skoulakis, E. M. and Davis, R. L.** (1997). Leonardo, a *Drosophila* 14-3-3 protein involved in learning, regulates presynaptic function. *Neuron* **19**, 391-402.
- Brodsky, M. H. and Steller, H.** (1996). Positional information along the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* eye: graded expression of the four-jointed gene. *Dev Biol* **173**, 428-46.
- Bryant, P. J., Huettner, B., Held, L. I., Jr., Ryerse, J. and Szidonya, J.** (1988). Mutations at the fat locus interfere with cell proliferation control and epithelial morphogenesis in *Drosophila*. *Dev Biol* **129**, 541-54.
- Buckles, G. R., Rauskolb, C., Villano, J. L. and Katz, F. N.** (2001). Four-jointed interacts with dachs, abelson and enabled and feeds back onto the Notch pathway to affect growth and segmentation in the *Drosophila* leg. *Development* **128**, 3533-42.
- Campos-Ortega, J. A. and Hartenstein, V.** (1997). *The embryonic Development of Drosophila melanogaster*. Second Edition. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Chae, J., Kim, M. J., Goo, J. H., Collier, S., Gubb, D., Charlton, J., Adler, P. N. and Park, W. J.** (1999). The *Drosophila* tissue polarity gene starry night encodes a member of the protocadherin family. *Development* **126**, 5421-9.
- Clark, H. F., Brentrup, D., Schneitz, K., Bieber, A., Goodman, C. and Noll, M.** (1995). Dachshous encodes a member of the cadherin superfamily that controls imaginal disc morphogenesis in *Drosophila*. *Genes Dev* **9**, 1530-42.
- Cohen, S. M.** (1993). Imaginal Disc Development. In *The Development of Drosophila melanogaster*, vol. 2 (ed. M. Bate and A. Martinez Arias), pp. 747-841: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Cox, R. T., Kirkpatrick, C. and Peifer, M.** (1996). Armadillo is required for adherens junction assembly, cell polarity, and morphogenesis during *Drosophila* embryogenesis. *J Cell Biol* **134**, 133-48.
- Das, G., Reynolds-Kenneally, J. and Mlodzik, M.** (2002). The atypical cadherin Flamingo links Frizzled and Notch signaling in planar polarity establishment in the *Drosophila* eye. *Dev Cell* **2**, 655-66.
- de Celis, J. F.** (1997). Expression and function of decapentaplegic and thick veins during the differentiation of the veins in the *Drosophila* wing. *Development* **124**, 1007-18.
- Drubin, D. G. and Nelson, W. J.** (1996). Origins of cell polarity. *Cell* **84**, 335-44.

- Eaton, S.** (2003). Cell biology of planar polarity transmission in the *Drosophila* wing. *Mech Dev* **120**, 1257-64.
- Eaton, S. and Simons, K.** (1995). Apical, basal, and lateral cues for epithelial polarization. *Cell* **82**, 5-8.
- Fanto, M., Clayton, L., Meredith, J., Hardiman, K., Charroux, B., Kerridge, S. and McNeill, H.** (2003). The tumor-suppressor and cell adhesion molecule Fat controls planar polarity via physical interactions with Atrophin, a transcriptional co-repressor. *Development* **130**, 763-74.
- Fanto, M. and McNeill, H.** (2004). Planar polarity from flies to vertebrates. *J Cell Sci* **117**, 527-33.
- Feiguin, F., Hannus, M., Mlodzik, M. and Eaton, S.** (2001). The ankyrin repeat protein Diego mediates Frizzled-dependent planar polarization. *Dev Cell* **1**, 93-101.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-11.
- Galindo, M. I., Bishop, S. A., Greig, S. and Couso, J. P.** (2002). Leg patterning driven by proximal-distal interactions and EGFR signaling. *Science* **297**, 256-9.
- Genova, J. L., Jong, S., Camp, J. T. and Fehon, R. G.** (2000). Functional analysis of Cdc42 in actin filament assembly, epithelial morphogenesis, and cell signaling during *Drosophila* development. *Dev Biol* **221**, 181-94.
- George, H. and Terracol, R.** (1997). The *vrlle* gene of *Drosophila* is a maternal enhancer of decapentaplegic and encodes a new member of the bZIP family of transcription factors. *Genetics* **146**, 1345-63.
- Glise, B. and Noselli, S.** (1997). Coupling of Jun amino-terminal kinase and Decapentaplegic signaling pathways in *Drosophila* morphogenesis. *Genes Dev* **11**, 1738-47.
- Grawe, F., Wodarz, A., Lee, B., Knust, E. and Skaer, H.** (1996). The *Drosophila* genes *crumbs* and *stardust* are involved in the biogenesis of adherens junctions. *Development* **122**, 951-9.
- Gubb, D. and Garcia-Bellido, A.** (1982). A genetic analysis of the determination of cuticular polarity during development in *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol* **68**, 37-57.
- Gubb, D., Green, C., Huen, D., Coulson, D., Johnson, G., Tree, D., Collier, S. and Roote, J.** (1999). The balance between isoforms of the prickle LIM domain protein is critical for planar polarity in *Drosophila* imaginal discs. *Genes Dev* **13**, 2315-27.
- Gumbiner, B. M.** (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**, 345-57.
- Hanahan, D., Jessee, J. and Bloom, F. R.** (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol* **204**, 63-113.
- Harden, N., Ricos, M., Yee, K., Sanny, J., Langmann, C., Yu, H., Chia, W. and Lim, L.** (2002). *Drac1* and *Crumbs* participate in amnioserosa morphogenesis during dorsal closure in *Drosophila*. *J Cell Sci* **115**, 2119-29.
- Harris, B. Z. and Lim, W. A.** (2001). Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J Cell Sci* **114**, 3219-31.
- Harris, T. J. and Peifer, M.** (2004). Adherens junction-dependent and -independent steps in the establishment of epithelial cell polarity in *Drosophila*. *J Cell Biol* **167**, 135-47.
- Hinz, U., Giebel, B. and Campos-Ortega, J. A.** (1994). The basic-helix-loop-helix domain of *Drosophila* lethal of scute protein is sufficient for proneural function and activates neurogenic genes. *Cell* **76**, 77-87.
- Hoch, M., Broadie, K., Jäckle, H. and Skaer, H.** (1994). Sequential fates in a single cell are established by the neurogenic cascade in the Malpighian tubules of *Drosophila*. *Development* **120**, 3439-50.

- Hong, Y., Stronach, B., Perrimon, N., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (2001). Drosophila Stardust interacts with Crumbs to control polarity of epithelia but not neuroblasts. *Nature* **414**, 634-638.
- Hurd, T. W., Fan, S., Liu, C. J., Kweon, H. K., Hakansson, K. and Margolis, B.** (2003). Phosphorylation-dependent binding of 14-3-3 to the polarity protein Par3 regulates cell polarity in mammalian epithelia. *Curr Biol* **13**, 2082-90.
- Hutterer, A., Betschinger, J., Petronczki, M. and Knoblich, J. A.** (2004). Sequential roles of Cdc42, Par-6, aPKC, and Lgl in the establishment of epithelial polarity during Drosophila embryogenesis. *Dev Cell* **6**, 845-54.
- Hynes, R. O.** (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11-25.
- Jack, J. and Myette, G.** (1997). The genes raw and ribbon are required for proper shape of tubular epithelial tissues in Drosophila. *Genetics* **147**, 243-53.
- Jack, J. and Myette, G.** (1999). Mutations that alter the morphology of the malpighian tubules in Drosophila. *Dev Genes Evol* **209**, 546-54.
- Jacob, L., Opper, M., Metzroth, B., Phannavong, B. and Mechler, B. M.** (1987). Structure of the l(2)gl gene of Drosophila and delimitation of its tumor suppressor domain. *Cell* **50**, 215-25.
- Jung, A. C., Denholm, B., Skaer, H. and Affolter, M.** (2005). Renal tubule development in Drosophila: a closer look at the cellular level. *J Am Soc Nephrol* **16**, 322-8.
- Jürgens, G., Nüsslein-Volhard, C. and Kluding, H.** (1984). Mutations affecting the pattern of larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. II. Zygotic loci on the third chromosome. *Roux'Arch. Dev. Biol.* **193:283-295**.
- Kaltschmidt, J. A., Lawrence, N., Morel, V., Balayo, T., Fernandez, B. G., Pelissier, A., Jacinto, A. and Martinez Arias, A.** (2002). Planar polarity and actin dynamics in the epidermis of Drosophila. *Nat Cell Biol* **4**, 937-44.
- Keller, R.** (2002). Shaping the vertebrate body plan by polarized embryonic cell movements. *Science* **298**, 1950-4.
- Keller, R., Davidson, L., Edlund, A., Elul, T., Ezin, M., Shook, D. and Skoglund, P.** (2000). Mechanisms of convergence and extension by cell intercalation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**, 897-922.
- 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.
- Kennerdell, J. R. and Carthew, R. W.** (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* **95**, 1017-26.
- Kennerdell, J. R. and Carthew, R. W.** (2000). Heritable gene silencing in Drosophila using double-stranded RNA. *Nat Biotechnol* **18**, 896-8.
- Kerber, B., Fellert, S. and Hoch, M.** (1998). Seven-up, the Drosophila homolog of the COUP-TF orphan receptors, controls cell proliferation in the insect kidney. *Genes Dev* **12**, 1781-6.
- Kockel, L., Vorbruggen, G., Jackle, H., Mlodzik, M. and Bohmann, D.** (1997). Requirement for Drosophila 14-3-3 zeta in Raf-dependent photoreceptor development. *Genes Dev* **11**, 1140-7.
- Krasnow, R. E. and Adler, P. N.** (1994). A single frizzled protein has a dual function in tissue polarity. *Development* **120**, 1883-93.
- Kuchinke, U.** (1998). Genetische und molekularbiologische Untersuchungen zur Struktur, Expression und Funktion des Gens *bazooka* von *Drosophila melanogaster*. Köln.
- 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.
- Lamb, R. S., Ward, R. E., Schweizer, L. and Fehon, R. G.** (1998). Drosophila coracle, a member of the protein 4.1 superfamily, has essential structural functions in the septate

- junctions and developmental functions in embryonic and adult epithelial cells. *Mol Biol Cell* **9**, 3505-19.
- Laski, F. A., Rio, D. C. and Rubin, G. M.** (1986). Tissue specificity of Drosophila P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing. *Cell* **44**, 7-19.
- Lawrence, N. and Morel, V.** (2003). Dorsal closure and convergent extension: two polarised morphogenetic movements controlled by similar mechanisms? *Mech Dev* **120**, 1385-93.
- Lee, O. K., Frese, K. K., James, J. S., Chadda, D., Chen, Z. H., Javier, R. T. and Cho, K. O.** (2003). Discs-Large and Strabismus are functionally linked to plasma membrane formation. *Nat Cell Biol* **5**, 987-93.
- Letsou, A., Arora, K., Wrana, J. L., Simin, K., Twombly, V., Jamal, J., Staehling-Hampton, K., Hoffmann, F. M., Gelbart, W. M., Massague, J. et al.** (1995). Drosophila Dpp signaling is mediated by the punt gene product: a dual ligand-binding type II receptor of the TGF beta receptor family. *Cell* **80**, 899-908.
- Liu, X., Kiss, I. and Lengyel, J. A.** (1999). Identification of genes controlling malpighian tubule and other epithelial morphogenesis in Drosophila melanogaster. *Genetics* **151**, 685-95.
- Lopez-Schier, H.** (2003). The polarisation of the anteroposterior axis in Drosophila. *Bioessays* **25**, 781-91.
- Lu, B., Usui, T., Uemura, T., Jan, L. and Jan, Y. N.** (1999). Flamingo controls the planar polarity of sensory bristles and asymmetric division of sensory organ precursors in Drosophila. *Curr Biol* **9**, 1247-50.
- Ma, D., Yang, C. H., McNeill, H., Simon, M. A. and Axelrod, J. D.** (2003). Fidelity in planar cell polarity signalling. *Nature* **421**, 543-7.
- Macara, I. G.** (2004a). Par proteins: partners in polarization. *Curr Biol* **14**, R160-2.
- Macara, I. G.** (2004b). Parsing the polarity code. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 220-31.
- Martin-Blanco, E., Pastor-Pareja, J. C. and Garcia-Bellido, A.** (2000). JNK and decapentaplegic signaling control adhesiveness and cytoskeleton dynamics during thorax closure in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7888-93.
- Matter, K.** (2000). Epithelial polarity: sorting out the sorters. *Curr Biol* **10**, R39-42.
- Mays, R. W., Beck, K. A. and Nelson, W. J.** (1994). Organization and function of the cytoskeleton in polarized epithelial cells: a component of the protein sorting machinery. *Curr Opin Cell Biol* **6**, 16-24.
- Mays, R. W., Nelson, W. J. and Marrs, J. A.** (1995). Generation of epithelial cell polarity: roles for protein trafficking, membrane-cytoskeleton, and E-cadherin-mediated cell adhesion. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **60**, 763-73.
- McKim, K. S., Dahmus, J. B. and Hawley, R. S.** (1996). Cloning of the Drosophila melanogaster meiotic recombination gene mei-218: a genetic and molecular analysis of interval 15E. *Genetics* **144**, 215-28.
- Misquitta, L. and Paterson, B. M.** (1999). Targeted disruption of gene function in Drosophila by RNA interference (RNA-i): a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1451-6.
- Mlodzik, M.** (2002). Planar cell polarization: do the same mechanisms regulate Drosophila tissue polarity and vertebrate gastrulation? *Trends Genet* **18**, 564-71.
- Müller, H. A. and Wieschaus, E.** (1996). armadillo, bazooka, and stardust are critical for early stages in formation of the zonula adherens and maintenance of the polarized blastoderm epithelium in Drosophila. *J Cell Biol* **134**, 149-63.
- Müller, H. A. J.** (2000). Genetic control of epithelial cell polarity: lessons from Drosophila. *Dev Dyn* **218**, 52-67.
- 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.

- Ramrath, A.** (2002). Isolierung und Charakterisierung von Bindungspartnern der PDZ-Domänen-Proteins BAZOOKA aus *Drosophila melanogaster*. Inaugural-Dissertation. Düsseldorf.
- Rawls, A. S. and Wolff, T.** (2003). Strabismus requires Flamingo and Prickle function to regulate tissue polarity in the *Drosophila* eye. *Development* **130**, 1877-87.
- Riggleman, B., Schedl, P. and Wieschaus, E.** (1990). Spatial expression of the *Drosophila* segment polarity gene armadillo is posttranscriptionally regulated by wingless. *Cell* **63**, 549-60.
- Rodriguez-Boulan, E. and Nelson, W. J.** (1989). Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science* **245**, 718-25.
- Roegiers, F., Younger-Shepherd, S., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (2001). Bazooka is required for localization of determinants and controlling proliferation in the sensory organ precursor cell lineage in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14469-74.
- Ruberte, E., Marty, T., Nellen, D., Affolter, M. and Basler, K.** (1995). An absolute requirement for both the type II and type I receptors, punt and thick veins, for dpp signaling in vivo. *Cell* **80**, 889-97.
- Scuderi, A. and Letsou, A.** (2005). Amnioserosa is required for dorsal closure in *Drosophila*. *Dev Dyn* **232**, 791-800.
- Shimada, Y., Usui, T., Yanagawa, S., Takeichi, M. and Uemura, T.** (2001). Asymmetric colocalization of Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, and Dishevelled in planar cell polarization. *Curr Biol* **11**, 859-63.
- Shulman, J. M., Benton, R. and St Johnston, D.** (2000). The *Drosophila* homolog of *C. elegans* PAR-1 organizes the oocyte cytoskeleton and directs oskar mRNA localization to the posterior pole. *Cell* **101**, 377-88.
- Simon, M. A.** (2004). Planar cell polarity in the *Drosophila* eye is directed by graded Four-jointed and Dachshous expression. *Development* **131**, 6175-84.
- Skaer, H. B.** (1993). The Alimentary Canal. In *The Development of Drosophila melanogaster*, vol. 2 (ed. M. a. M. A. Bate, A.), pp. 941-1012: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Skaer, H. B., Maddrell, S. H. and Harrison, J. B.** (1987). The permeability properties of septate junctions in Malpighian tubules of *Rhodnius*. *J Cell Sci* **88 (Pt 2)**, 251-65.
- Smith, D. B. and Johnson, K. S.** (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31-40.
- Spradling, A. C.** (1986). P-element-mediated transformation. In: *Drosophila*, a practical approach. In *IRL Press.*, vol. 175-197 (ed. D. B. Roberts.). Oxford.
- Spradling, A. C., Stern, D., Beaton, A., Rhem, E. J., Laverty, T., Mozdén, 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.
- Strutt, D.** (2003). Frizzled signalling and cell polarisation in *Drosophila* and vertebrates. *Development* **130**, 4501-13.
- Strutt, D., Johnson, R., Cooper, K. and Bray, S.** (2002). Asymmetric localization of frizzled and the determination of notch-dependent cell fate in the *Drosophila* eye. *Curr Biol* **12**, 813-24.
- Strutt, D. I.** (2001). Asymmetric localization of frizzled and the establishment of cell polarity in the *Drosophila* wing. *Mol Cell* **7**, 367-75.
- Strutt, H., Mundy, J., Hofstra, K. and Strutt, D.** (2004). Cleavage and secretion is not required for Four-jointed function in *Drosophila* patterning. *Development* **131**, 881-90.
- Strutt, H. and Strutt, D.** (2002). Nonautonomous planar polarity patterning in *Drosophila*: dishevelled-independent functions of frizzled. *Dev Cell* **3**, 851-63.
- Tada, M., Concha, M. L. and Heisenberg, C. P.** (2002). Non-canonical Wnt signalling and regulation of gastrulation movements. *Semin Cell Dev Biol* **13**, 251-60.

- Tanentzapf, G. and Tepass, U.** (2003). Interactions between the crumbs, lethal giant larvae and bazooka pathways in epithelial polarization. *Nat Cell Biol* **5**, 46-52.
- Taylor, J., Abramova, N., Charlton, J. and Adler, P. N.** (1998). Van Gogh: a new Drosophila tissue polarity gene. *Genetics* **150**, 199-210.
- Tepass, U.** (1997). Epithelial differentiation in Drosophila. *Bioessays* **19**, 673-82.
- Tepass, U., Godt, D. and Winklbauer, R.** (2002). Cell sorting in animal development: signalling and adhesive mechanisms in the formation of tissue boundaries. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 572-82.
- Tepass, U., Gruszynski, D. E., Haag, T. A., Omatyar, L., Török, T. and Hartenstein, V.** (1996). shotgun encodes Drosophila E-cadherin and is preferentially required during cell rearrangement in the neurectoderm and other morphogenetically active epithelia. *Genes Dev* **10**, 672-85.
- Tepass, U. and Hartenstein, V.** (1994). The development of cellular junctions in the Drosophila embryo. *Dev Biol* **161**, 563-96.
- Tepass, U. and Knust, E.** (1993). Crumbs and stardust act in a genetic pathway that controls the organization of epithelia in Drosophila melanogaster. *Dev Biol* **159**, 311-26.
- 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.
- Terracol, R. and Lengyel, J. A.** (1994). The thick veins gene of Drosophila is required for dorsoventral polarity of the embryo. *Genetics* **138**, 165-78.
- Thomas, G. H. and Kiehart, D. P.** (1994). Beta heavy-spectrin has a restricted tissue and subcellular distribution during Drosophila embryogenesis. *Development* **120**, 2039-50.
- Timmons, L., Hersperger, E., Woodhouse, E., Xu, J., Liu, L. Z. and Shearn, A.** (1993). The expression of the Drosophila awd gene during normal development and in neoplastic brain tumors caused by lgl mutations. *Dev Biol* **158**, 364-79.
- Tree, D. R., Shulman, J. M., Rousset, R., Scott, M. P., Gubb, D. and Axelrod, J. D.** (2002). Prickle mediates feedback amplification to generate asymmetric planar cell polarity signaling. *Cell* **109**, 371-81.
- Usui, T., Shima, Y., Shimada, Y., Hirano, S., Burgess, R. W., Schwarz, T. L., Takeichi, M. and Uemura, T.** (1999). Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, regulates planar cell polarity under the control of Frizzled. *Cell* **98**, 585-95.
- Villano, J. L. and Katz, F. N.** (1995). four-jointed is required for intermediate growth in the proximal-distal axis in Drosophila. *Development* **121**, 2767-77.
- Vinson, C. R. and Adler, P. N.** (1987). Directional non-cell autonomy and the transmission of polarity information by the frizzled gene of Drosophila. *Nature* **329**, 549-51.
- Wallingford, J. B., Fraser, S. E. and Harland, R. M.** (2002). Convergent extension: the molecular control of polarized cell movement during embryonic development. *Dev Cell* **2**, 695-706.
- Wasserscheid, I.** (2001). Die Rolle des Gens *bazooka* in der Epithelentwicklung. Diplomarbeit. Düsseldorf.
- Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C. and Jürgens, G.** (1984). Mutation affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. III. Zygotic loci on the X-chromosome and fourth Chromosome. *Roux's Arch Dev. Biol.* **193**:296-307.
- Winter, C. G., Wang, B., Ballew, A., Royou, A., Karess, R., Axelrod, J. D. and Luo, L.** (2001). Drosophila Rho-associated kinase (Drok) links Frizzled-mediated planar cell polarity signaling to the actin cytoskeleton. *Cell* **105**, 81-91.
- Wodarz, A.** (2002). Establishing cell polarity in development. *Nat Cell Biol* **4**, E39-44.
- Wodarz, A., Hinz, U., Engelbert, M. and Knust, E.** (1995). Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of Drosophila. *Cell* **82**, 67-76.

- Wodarz, A., Ramrath, A., Grimm, A. and Knust, E.** (2000). Drosophila atypical protein kinase C associates with Bazooka and controls polarity of epithelia and neuroblasts. *J Cell Biol* **150**, 1361-74.
- Wodarz, A., Ramrath, A., Kuchinke, U. and Knust, E.** (1999). Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in Drosophila neuroblasts. *Nature* **402**, 544-7.
- Wolff, T. and Rubin, G. M.** (1998). Strabismus, a novel gene that regulates tissue polarity and cell fate decisions in Drosophila. *Development* **125**, 1149-59.
- Wong, H. C., Bourdelas, A., Krauss, A., Lee, H. J., Shao, Y., Wu, D., Mlodzik, M., Shi, D. L. and Zheng, J.** (2003). Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. *Mol Cell* **12**, 1251-60.
- Wong, L. L. and Adler, P. N.** (1993). Tissue polarity genes of Drosophila regulate the subcellular location for prehair initiation in pupal wing cells. *J Cell Biol* **123**, 209-21.
- Woods, D. F. and Bryant, P. J.** (1991). The discs-large tumor suppressor gene of Drosophila encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. *Cell* **66**, 451-64.
- Woods, D. F., Hough, C., Peel, D., Callaini, G. and 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.
- Young, P. E., Richman, A. M., Ketchum, A. S. and Kiehart, D. P.** (1993). Morphogenesis in Drosophila requires nonmuscle myosin heavy chain function. *Genes Dev* **7**, 29-41.
- Zallen, J. A. and Wieschaus, E.** (2004). Patterned gene expression directs bipolar planar polarity in Drosophila. *Dev Cell* **6**, 343-55.
- Zeidler, M. P., Perrimon, N. and Strutt, D. I.** (1999). The four-jointed gene is required in the Drosophila eye for ommatidial polarity specification. *Curr Biol* **9**, 1363-72.

7 Anhang

		<div style="background-color: red; width: 100%; height: 10px; margin-bottom: 5px;"></div> LTDTSYLQQHHNKINMPPSILENIRDAREGYEDSLYGRRGEYDPDKYGSYKP 3310 3320 3330 3340 3350 3360
Fmi		LTDTSYLQQHHNKINMPPSILENIRDAREGYEDSLYGRRGEYDPDKYGSYKP 3360
Fmi_{PDZbm}		LTDTSYLQQHHNKINMPPSILENIRDAREGYEDSLYGRRGEYDPDKYGSYKP 3359
		<div style="background-color: red; width: 100%; height: 10px; margin-bottom: 5px;"></div> PSHYGSEKDYPGGGSGSQTIGHMRSFHPDAAAYLSDNIYDKQRTLGGSGYLGAKSESPYLSKDRITPDIYGS 3370 3380 3390 3400 3410 3420 3430
Fmi		PSHYGSEKDYPGGGSGSQTIGHMRSFHPDAAAYLSDNIYDKQRTLGGSGYLGAKSESPYLSKDRITPDIYGS 3430
Fmi_{PDZbm}		PSHYGSEKDYPGGGSGSQTIGHMRSFHPDAAAYLSDNIYDKQRTLGGSGYLGAKSESPYLSKDRITPDIYGS 3429
		<div style="background-color: red; width: 100%; height: 10px; margin-bottom: 5px;"></div> RDGHYSLKRQPAYATDSLHSVHSLKNDYHQQQQQQHHLQDRLSEGSDKNGYHFPYTAEDHLPARKL 3440 3450 3460 3470 3480 3490 3500
Fmi		RDGHYSLKRQPAYATDSLHSVHSLKNDYHQQQQQQHHLQDRLSEGSDKNGYHFPYTAEDHLPARKL 3500
Fmi_{PDZbm}		RDGHYSLKRQPAYATDSLHSVHSLKNDYHQQQQQQHHLQDRLSEGSDKNGYHFPYTAEDHLPARKL 3499
		<div style="background-color: red; width: 100%; height: 10px; margin-bottom: 5px;"></div> SHTQPPSLHGSQMQPPGVGLVNDVNNPGLMGRHTLNNGSRHSSRASPPSTMVAPMQLGPLTSITDTE 3510 3520 3530 3540 3550 3560 3570
Fmi		SHTQPPSLHGSQMQPPGVGLVNDVNNPGLMGRHTLNNGSRHSSRASPPSTMVAPMQLGPLTSITDTE 3570
Fmi_{PDZbm}		SHTQPPSLHGSQMQPPGVGLVNDVNNPGLMGRHTLNNGSRHSSRASPPSTMVAPMQLGPLTSITDTE 3569
		<div style="background-color: blue; width: 100%; height: 10px; margin-bottom: 5px;"></div> SEADDETTV- 3580
Fmi	SEAEY.	3576
Fmi_{PDZbm}	RNIDDETTV.	3580

Abb. 7.1 Zytoplasmatische Anteile von Fmi und Fmi_{PDZbm}. Gezeigt ist die Aminosäuresequenz der zytoplasmatischen Anteile der Fmi-Isoformen Fmi und Fmi_{PDZbm}, die zur Herstellung der GST-Fusionproteine verwendet wurden. Die als Fmi_{PDZbm} bezeichnete Isoform enthält am C-Terminus ein putatives PDZ-Bindemotiv (TTV), das der als Fmi bezeichneten Isoform fehlt. Für die durchgeführten GST-Pull-down Experimente wurden GST-Fusionsproteine von beiden Isoformen hergestellt (GST-Fmi- und GST-Fmi_{PDZbm}). Die zur Herstellung der Fusionproteine verwendeten pGex-Klone wurden mir freundlicherweise von Hendrik Strumpf aus der Arbeitsgruppe von Ulrich Thomas, IfN-Magdeburg, zur Verfügung gestellt.

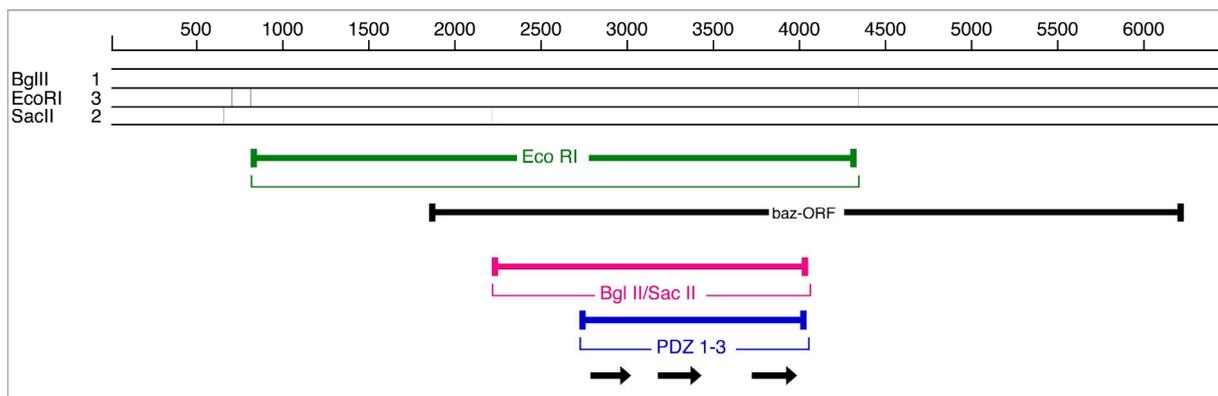


Abb. 7.2 Verwendete Sequenzanteile von baz. In Blau ist das für die *in vitro* Transkription/Translation verwendete Fragment, das die 3 PDZ-Domänen beinhaltet gezeigt. Dieses Fragment lag im pGBT9-Vektor vor (Ramrath, 2002) und wurde in den pGBKT7-Vektor umklontiert. In Grün und Magenta sind die für das RNAi-Kontrukt verwendeten Anteile dargestellt, die im pBluescriptKS(+) vorlagen (Kuchinke, 1998). In Schwarz ist das offene Leseraster dargestellt. Die entsprechenden Sequenzen in Abb. 7.3 gezeigt. Die schwarzen Pfeile markieren die drei PDZ-Domänen.



Abb. 7.3 Verwendete Sequenzanteile von *baz*. Erklärung siehe Seite 113

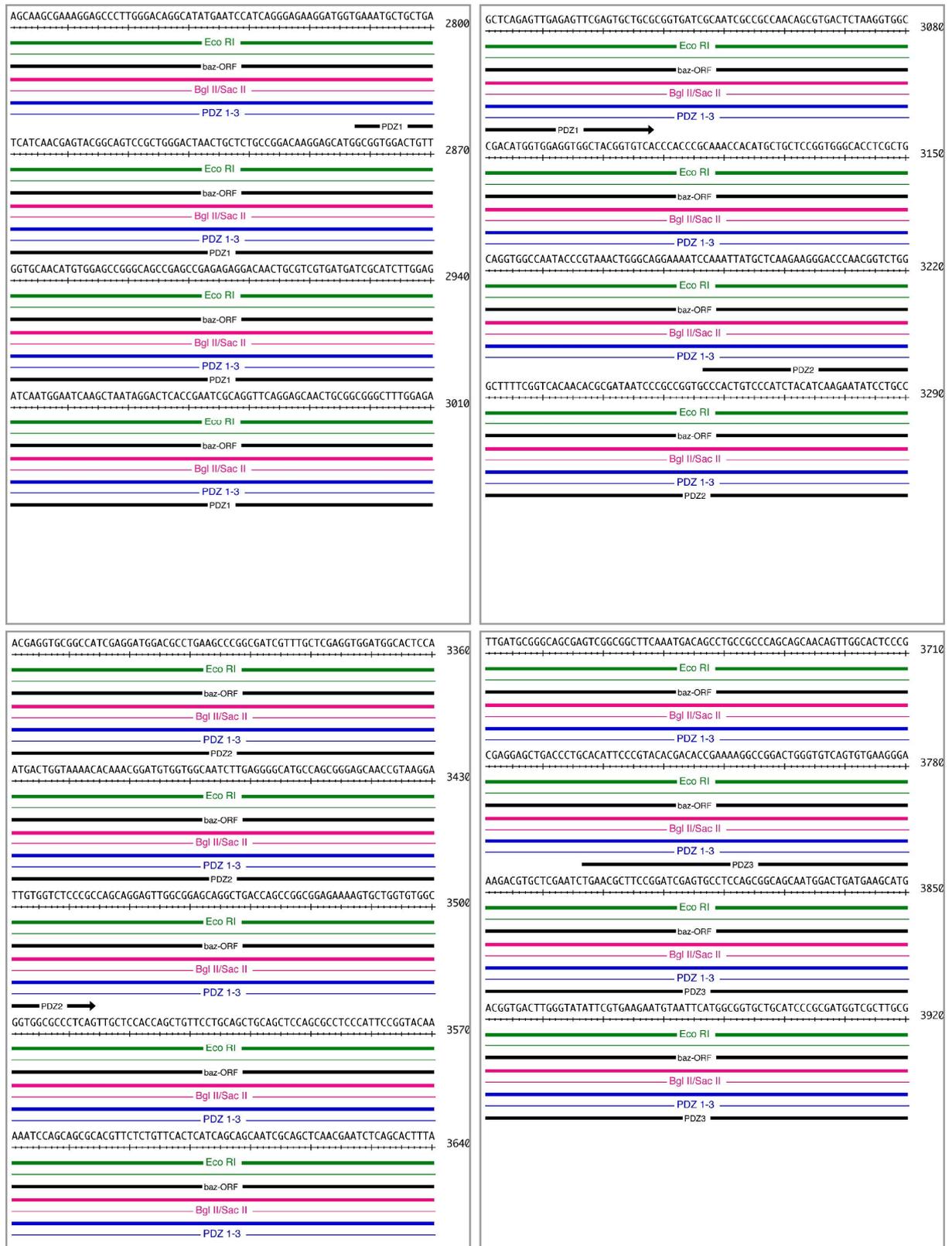


Abb. 7.3 Verwendete Sequenzanteile von *baz*. Erklärung siehe Seite 113

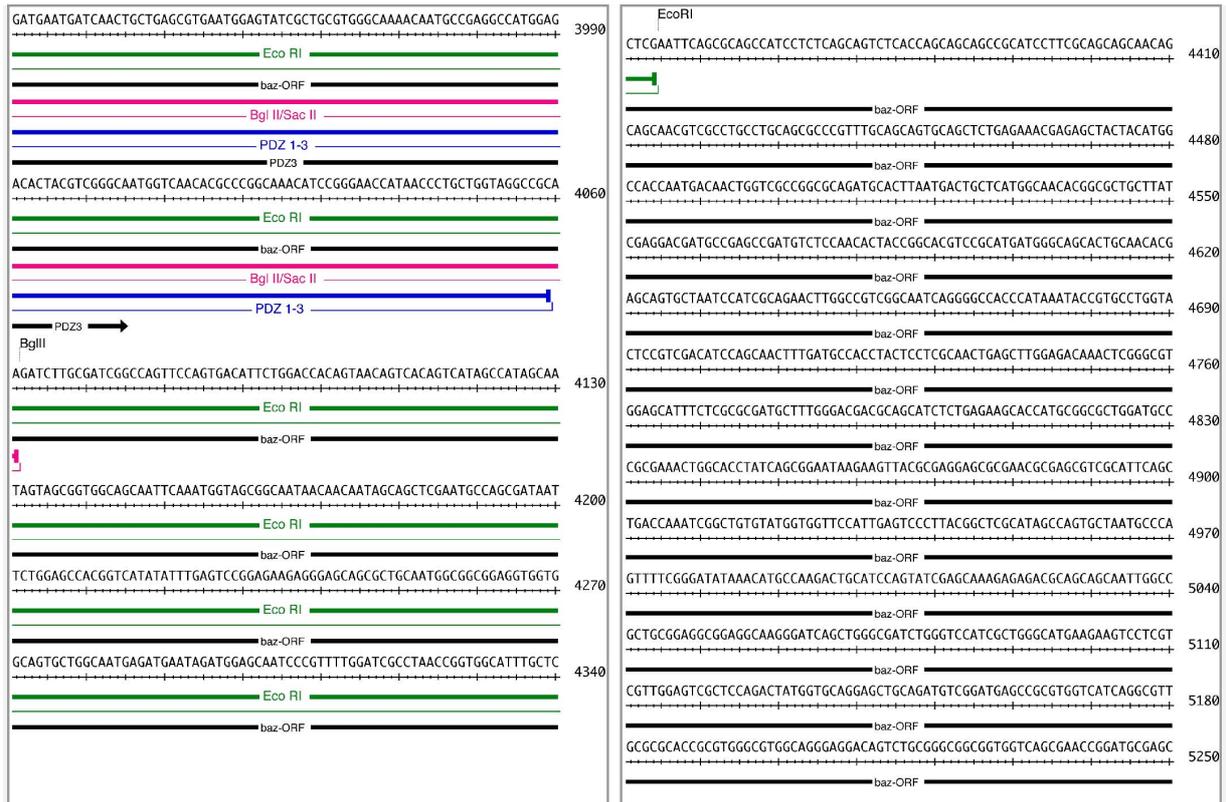


Abb. 7.3 Verwendete Sequenzanteile von *baz*. Magenta und Grün: Fragmente, die für die Herstellung der UAS_{baz}ri-Konstruktes verwendet wurden. Blau: *in vitro* transkribiertes/translatiertes Fragment, das die drei PDZ-Domänen enthält. Schwarz: offenes Leseraster von *baz*. Schwarze Pfeile: PDZ-Domänen.

Abkürzungen:

a-...	anti-...
AS	Aminosäure
Abb.	Abbildung
ähnl.	ähnlich
amp	Ampicillin
Anz.	Anzahl
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Bal.	Balancer-Chromosom
Bez.	Bezeichnung
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	kodierende DNA
CIP	alkalische Phosphatase (Kalb)
Chr.	Chromosom
DAB	Diaminobenzidin
dest.	destilliert
DIG	Digoxygenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
E _{xxx}	Extinktion bei xxx nm Wellenlänge
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
genom.	genomisch
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunden
HRP	Meerrettich-Peroxidase
<i>hsp</i>	heat-shock promoter
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
konz.	konzentriert
konz.-abh.	konzentrationsabhängig
LB-Medium	Luria Bertani Broth-Medium
Lsg.	Lösung
m...	milli...(10 ⁻³)
M	Molarität (mol/l)
MCS	multi-cloning-site (Polylinker)
min	Minuten
μ...	mikro...(10 ⁻⁶)
mRNA	messenger-RNA
n...	nano...(10 ⁻⁹)
ngs	natives Ziegenserum
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

ORF	offenes Leseraster
PBS	phosphatgepufferte NaCl-Lösung
pBsc	Bluescript-Plasmid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pot.	potentiell
Prom.	Promotor
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
St.-Lsg	Stamm-Lösung
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
Taq	Thermophilus aquaticus
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethyl-Ethyldiamin
Temp.	Temperatur
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit
u.a.	unter anderem
UV-Licht	ultraviolettes Licht
ü.N.	über Nacht
V	Volt
vgl.	vergleiche
verm.	vermutlich
Vol.	Volumen
wdh.	wiederholen
ZNS	Zentralnervensystem
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
z.Zt.	zur Zeit

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Genetik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. Elisabeth Knust angefertigt.

Ihr möchte ich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung danken.

Herrn Prof. Dr. J. F. Ernst danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Ulrich Thomas und Hendrik Strumpf möchte ich mich herzlich für die Kooperation und die Überlassung der pGex-Klone bedanken. Außerdem gilt mein Dank Susi und Özlem für die Einführung in die experimentelle Proteinbiochemie; Walter für das Korrekturlesen der Arbeit; André für die kritischen Anmerkungen zu dieser Arbeit und die guten Ideen zur Verbesserung; Olaf für die Hilfe zur Selbsthilfe in Computerfragen, ohne die mich das Word-Programm wohlmöglich besiegt hätte; Wiebke für all die schönen Stunden im Labor, die Unterstützung und die spannenden Reisen; Tanja für die netten Telefongespräche, die gemütlichen Mensagänge und die aufmunternden Worte; Nico für ihre Hilfsbereitschaft; Ferdi für viel Witz und so manche Antikörperfärbung; Sandra für die netten Gespräche und dafür, dass sie immer ihre Schokolade mit mir geteilt hat.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich für das Interesse an der Arbeit danken. Meinen Eltern, Gabriele, Joachim, Henriette und Valentin danke ich für so manchen schönen Sonntagnachmittag.

Mein besonderer Dank gilt Dieter für seine liebevolle Unterstützung und Hilfe während des Zusammenschreibens und der gesamten Zeit der Doktorarbeit.

Erklärung

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