

**Die Rolle des Guanin-Nukleotid-Austauschfaktors Pebble in der
Mesoderm-Morphogenese von *Drosophila melanogaster***

Inaugural – Dissertation

zur

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

vorgelegt von

**Sabine Schumacher
aus Düsseldorf**

2005

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

Referent: PD Dr. H.-Arno J. Müller
Korreferent: Prof. Dr. Joachim Ernst
Tag der mündlichen Prüfung: 29.Juni 2005

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Themenstellung	4
1.1	Die Rolle von Zelladhäsion und Zellbewegung bei der Entwicklung verschiedener Organismen	5
1.2	Mesoderm-Migration bei <i>Drosophila melanogaster</i>	8
1.3	Molekulare Mechanismen zur Regulation der Zellbeweglichkeit	13
1.4	Themenstellung	16
2	Material und Methoden	18
2.1	Der Umgang mit DNA	19
2.1.1	Vektoren	19
2.1.1.1	pBluescript SK	19
2.1.1.2	pUAST - ein UAS-Gal4-Vektor	19
2.1.1.3	pCaSpeR4	19
2.1.1.4	pUCΔ2-3-Helferplasmid zur Transformation von <i>Drosophila</i> -Embryonen	19
2.1.2	Amplifizierung von DNA Fragmenten	19
2.1.2.1	PCR (Polymerase-Kettenreaktion)	19
2.1.2.2	Oligonukleotide zur Amplifizierung von PCR-Fragmenten	20
2.1.3	Sequenzierung der <i>pbl</i> Allele	21
2.1.4	Vervielfältigung von DNA in Bakterien	22
2.1.4.1	Herstellung elektrokompenter Zellen	22
2.1.4.2	Transformation von Bakterien	23
2.1.4.3	Isolierung von DNA aus Bakterienkulturen	23
2.1.5	Isolierung von genomischer DNA	24
2.1.6	DNA-Aufreinigung	25
2.1.6.1	Elektrophoretische Auftrennung und Elution der DNA aus Agarosegelen	25
2.1.6.2	Phenol-Chloroform-Extraktion	26
2.1.7	DNA-Fällung	26
2.1.8	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	27
2.1.8.1	Konzentrationsbestimmung durch Gelelektrophorese	27
2.1.8.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung	27
2.1.9	Manipulation der DNA-Moleküle	27
2.1.9.1	Restriktionsspaltung der DNA-Moleküle	27
2.1.9.2	Dephosphorylierung der 5'-Phosphatenden linearer DNA-Moleküle	28
2.1.9.3	Ligation von DNA-Fragmenten	28
2.1.10	Herstellung der DNA-Konstrukte	29
2.1.10.1	<i>twip</i> ::GFP-Aktin-Reporter-gen-Konstrukt	29
2.1.10.2	Klonierung der <i>pbl</i> cDNAs	29
2.1.10.3	Deletionskonstrukte	32
2.2	Der Umgang mit RNA	32
2.2.1	RT-PCR	32
2.2.2	RNA-Isolierung aus Embryonen	34
2.2.3	Denaturierendes RNA-Gel	34
2.2.4	Konzentrationsbestimmung	35
2.2.5	Northern-Blot-Analyse	35
2.2.6	Herstellung DIG-markierter RNA-Sonden	37
2.2.7	Nachweis der Transkripte auf dem Northern-Blot	38
2.2.8	<i>in situ</i> -Hybridisierung an Embryonen	39
2.3	Proteinchemische Verfahren	40
2.3.1	Isolierung von Proteinen aus Gewebe	40
2.3.2	Konzentrationsbestimmung	40

2.3.3	Protein-Gele.....	41
2.3.4	Western-Blot-Analyse.....	41
2.3.5	Herstellung von GST-Fusionsproteinen.....	41
2.3.6	Induktion und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen.....	42
2.3.7	Herstellung von Immunsereen.....	43
2.3.8	Guanin-Nukleotid-Austausch-Experiment.....	44
2.4	Die Herstellung transgener Fliegen.....	46
2.4.1	Keimbahntransformation von <i>Drosophila melanogaster</i>	46
2.4.2	Isolierung transgener Fliegen.....	48
2.5	Histologische Methoden.....	49
2.5.1	Antikörperfärbungen an Embryonen.....	49
2.5.1.1	Dechorionisierung.....	49
2.5.1.2	Fixierung.....	49
2.5.1.3	Hitze-Fixierung.....	49
2.5.1.4	Devitellinisierung.....	50
2.5.1.5	Antikörper-Färbung.....	50
2.5.2	Verwendete Antikörper.....	51
2.5.3	AP-Färbung.....	52
2.5.4	HRP-Färbung.....	52
2.5.5	Einbettung in Araldit.....	53
2.5.6	Einbettung in Technovit.....	54
2.6	Genetische Methoden.....	55
2.6.1	Fliegenzucht.....	55
2.6.2	Fliegenstämme, Chromosomen und Allele.....	56
2.7	Abkürzungen.....	57
3	Ergebnisse.....	58
3.1	Zellformveränderungen während der mesodermalen Zellwanderung im <i>Drosophila</i> Embryo.....	58
3.2	Funktion des FGF-Rezeptors HTL in der ersten und der zweiten Phase der mesodermalen Zellwanderung.....	61
3.3	Die Identifikation von PBL als wichtige Komponente der Mesoderm-Migration.....	63
3.3.1	PBL ist für mesodermale Zellformveränderungen unentbehrlich.....	64
3.3.2	Funktion von PBL während des Epithel-Mesenchym-Übergangs.....	66
3.3.3	Duale Funktion von PBL in der Mesoderm-Morphogenese.....	67
3.3.4	Die Funktion von PBL in Bezug zum HTL/MAPK Signalweg.....	69
3.3.4.1	Mesodermspezifische Funktion von PBL.....	69
3.3.4.2	PBL agiert unterhalb vom, oder parallel zum HTL/MAPK Signalweg.....	71
3.3.4.3	Die Aktivität von PBL ist für die Funktion von HTL bei der Vermittlung von Zellformveränderungen notwendig.....	72
3.4	Die Regulation der Funktion von PBL während der mesodermalen Zellwanderung.....	74
3.4.1	Nachweis und Expression verschiedener <i>pbl</i> Transkripte.....	75
3.4.1.1	Nachweis von vier verschiedenen, differentiell exprimierten <i>pbl</i> Transkripten.....	76
3.4.1.2	Identifizierung der <i>pbl</i> Transkripte.....	77
3.4.1.3	Lokalisation der <i>pbl</i> Transkripte während der Mesoderm-Morphogenese.....	79
3.4.2	Expression von PBL Protein während der Mesoderm-Morphogenese.....	82
3.4.2.1	Nachweis von PBL mittels Western-Blot.....	83
3.4.2.2	Ektopisch exprimiertes PBL Protein wird im Embryo erkannt.....	84
3.4.2.3	PBL Lokalisierung während der Mesoderm-Morphogenese.....	85
3.4.3	Funktionsanalyse von PBL.....	90
3.4.3.1	Funktionsanalyse verschiedener <i>pbl</i> Allele.....	91

3.4.3.2	Die Substratspezifität von PBL	93
3.4.3.3	Funktionsanalyse mit Hilfe von Deletionskonstrukten	98
4	<i>Diskussion</i>	103
4.1	Frühe Zellformveränderungen während der Mesoderm-Morphogenese.....	103
4.2	Die Funktion von PBL im Hinblick auf den HTL/MAPK-Signalweg.....	105
4.3	Die Funktion von PBL in der Regulation des Zytoskeletts.....	107
4.4	Die Regulation über verschiedene Proteindomänen von PBL	109
4.5	Die Funktion von PBL.....	112
5	<i>Zusammenfassung</i>	113
6	<i>Literatur</i>	114

1 Einleitung und Themenstellung

Jeder Organismus durchläuft während seiner Entwicklung individuelle Formwechsel. Bei den Einzellern wird die Formfaltung durch einzelne Zellen ausgeprägt, während bei vielzelligen Tieren, den Metazoen, Zellvermehrung und Zelldifferenzierung zur Ausbildung einer komplexen Gestalt führen. Während der Entwicklung eines vielzelligen Organismus verändern Zellen einzeln oder als Gruppe ihre Position, um über eine entsprechende Lokalisierung die Funktion von Geweben zu gewährleisten. Der Zellbeweglichkeit zählt daher zu den wichtigsten zellulären Eigenschaften, die bei der Entwicklung eines tierischen Organismus eine Rolle spielen. Die Zellbewegung ist direkt mit der Veränderung der Zellgestalt verknüpft. Diese Formveränderung beruht auf der Umgestaltung des Zytoskeletts einer Zelle und der damit assoziierten Proteine. Sie ermöglichen die Vorwärtsbewegung und die zeitweilige Stabilisierung der wandernden Zelle.

Um innerhalb eines vielzelligen Organismus zu wandern, müssen die Zellen bestimmte Bedingungen erfüllen. Zunächst müssen sich die Zellen aus dem bestehenden, meist epithelialen Gewebeverband lösen, um Zellformveränderungen durchzuführen, die für die Wanderung notwendig sind. Das bedeutet, dass sie ihre Polarität und die adhäsiven Wechselwirkungen zu ihren Nachbarzellen aufgeben müssen. Wenn die Zellen in einer Gruppe wandern, muss der Kontakt der Zellen untereinander dennoch aufrechterhalten werden. Sowohl der Beginn, als auch das Ende des Wanderungsprozesses müssen während der Entwicklung präzise festgelegt sein, um die Differenzierung zu Zellen und Geweben bestimmter Funktion zu ermöglichen. Welche Bedeutung der zeitlichen und räumlichen Regulation des Zellschicksals während der Entwicklung eines Organismus zukommt, erkennt man am Beispiel der Krebszellen. Die Bildung von Metastasen kann letztendlich zum Tod eines Organismus führen. Es ist daher wichtig zu verstehen, welche Signale die Zellwanderung initiieren und wie die Zellwanderung koordiniert wird. Die Identifizierung extrazellulärer Signale zusammen mit ihren Rezeptoren ist dabei ebenso von Bedeutung, wie die Identifizierung von Komponenten, die diese Signale in eine intrazelluläre Antwort umwandeln.

1.1 Die Rolle von Zelladhäsion und Zellbewegung bei der Entwicklung verschiedener Organismen

In dem folgenden Abschnitt soll die Bedeutung von Zellbewegung und Zelladhäsion für den Entwicklungsprozess an verschiedenen Beispielen unterschiedlicher Organismen verdeutlicht werden. Man findet die Zellbeweglichkeit nicht erst in höheren Organismen, sondern auch schon bei Mikroorganismen, wie der kollektiven Amöbe *Dictyostelium*. Bei Nahrungsmangel kommt es zu der Aggregation der Myxamöben des zellulären Schleimpilzes *Dictyostelium*. Dieser Prozess involviert sowohl die Zelladhäsion, als auch die Zellwanderung (Zellmigration) einzelner Amöben. Letztere reagieren auf ein Aggregationssignal, das von einer Gründerzelle in Form des cyclischen Adenosinmonophosphats, cAMP, ausgesandt wird. Einzelamöben nehmen dieses chemotaktische Signal mit Hilfe von spezifischen Oberflächenrezeptoren wahr und bewegen sich gezielt auf die Signalquelle zu. Die Bindung von cAMP führt dabei zur Aktivierung von Zelloberflächenrezeptoren, die das extrazelluläre Signal in eine migratorische Zellantwort umwandeln (Chung et al., 2001; Ijima et al., 2002; Sanchez-Madrid und del Pozo, 1999). Diese Ereignisse führen letztendlich zur Entstehung eines lokalen Signalzentrums an der Zellfront, was sich in diesem System durch einen erhöhten Spiegel von Lipidprodukten, aufgrund der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) Aktivität, zeigt. Vermutlich wird das Signal von Mitgliedern der Familie kleiner GTPasen unverzüglich in eine Antwort auf der Ebene des Zytoskeletts umgewandelt (Etienne-Manneville und Hall, 2002). Fibrillen aus Myosin und Aktin ermöglichen die Bildung von Pseudopodien (Scheinfüßchen), welche die Bewegungspolarität verdeutlichen. Wenn die Zellen das Aggregationszentrum erreichen, heften sie sich an ihren anterioren und posterioren Enden aneinander. Die Adhäsion wird durch Membranglykoproteine an der Zelloberfläche vermittelt. Die angelockten Amöben sind nun selber in der Lage cAMP freizusetzen, was zu einer gerichteten Signalweiterleitung führt. Die Gestaltbildung des Schleimpilzes *Dictyostelium* ist ein gutes Beispiel für die, durch Zellbeweglichkeit und Zelladhäsion vermittelte, Morphogenese bei Mikroorganismen.

Chemoattraktion spielt auch bei der Zellmigration während der Entwicklung multizellulärer Organismen eine entscheidende Rolle. In diesem Zusammenhang muss aber auch verstärkt die Wechselwirkung mit dem Substrat berücksichtigt werden. Dies soll am Beispiel der Migration von primären Mesenchymzellen in der Seeigel-Blastula erläutert werden. Während der Embryonalentwicklung entsteht durch die Furchung die so genannte Blastula, in der eine

Schicht aus Blastomeren (Blastoderm) die innere Furchungshöhle (primäre Leibeshöhle, Blastocoel) umschließt. Aus der Blastula geht bei Metazoen durch den Prozess der Gastrulation eine, aus zwei Schichten oder Keimblättern bestehende Gastrula (Becherkeim) hervor. Niedere Hohltiere bleiben auf der Stufe des Ektoderm-Entoderm-Stadiums stehen. Bei allen übrigen Metazoen entsteht ein drittes Keimblatt, das Mesoderm. Die drei Keimblätter differenzieren sich in der anschließenden Entwicklung zu den verschiedenen Organen. Nach der Bildung der Blastula kommt es nun im Seeigel zu ersten Zellbewegungen der Mesenchymzellen. Bei den primären Mesenchymzellen des Seeigels handelt es sich um Blastomeren, die am vegetativen Pol in das Blastocoel eindringen. Die Ausbildung und Kontraktion von Filopodien ermöglicht ihnen die Wanderung auf der Innenseite der Blastocoelwand. Auf der Suche nach einem stabilen Kontakt, bilden sie an der Grenze zwischen Ekto- und Entoderm einen Ring um den zukünftigen Darm. Entlang der ventralen Seite breiten sie sich an zwei Stellen weiter in Richtung des animalen Pols aus. Es ist noch nicht geklärt, wie der adhäsive Kontakt zwischen den primären Mesenchymzellen und der Basallamina, die das Blastocoel auskleidet, hergestellt wird. Wie Transplantationsexperimente gezeigt haben, scheint die Wanderungsrichtung durch einen Konzentrationsgradienten vorgegeben zu sein. In der Seeigel-Blastula kommt es also zu einer gerichteten Wanderung der primären Mesenchymzellen.

Als ein weiteres Beispiel soll die Zellwanderung in der Taufliege, *Drosophila melanogaster* betrachtet werden. An ihr sind vermehrt Studien im Hinblick auf die Migration von Keimzellen, Follikelzellen, Hämocyten und Tracheenzellen durchgeführt worden. Dabei wurde eine Reihe von Signalwegen beschrieben, die gerichtete Zellmigration unter Berücksichtigung des zellulären Umfeldes regulieren. Die Zellmigration ermöglicht die Gestaltbildung von Organen und Geweben von komplett unterschiedlicher Architektur. Eines der wohl best untersuchten Systeme in der Zellmigration in *Drosophila* ist die Wanderung der Follikelzellen in der *Drosophila* Eikammer. Die Entwicklung eines *Drosophila* Eies beginnt mit der mitotischen Teilung einer Stammzelle im Keimstock, dem Germarium. Vier mitotische Teilungen einer Stammzelle führen zur Bildung von sechzehn Zellen, die durch zytoplasmatische Brücken miteinander verbunden sind. Eine dieser sechzehn Zellen wird zur Oocyte, die restlichen Zellen entwickeln sich zu Nährzellen, welche die Oocyte über Zytoplasmabrücken mit Proteinen und RNAs versorgen. Eine Einzelschicht aus 700 Follikelzellen umgibt diese sechzehn Zellen und bildet damit die Eikammer. Die Follikelzellen können anhand der Expression unterschiedlicher Gene in verschiedene Gruppen, mit verschiedenen Funktionen unterteilt werden. Eine Gruppe von acht Zellen, die

sich am anterioren Rand der Eikammer befindet, wird auch als Grenzzellen bezeichnet. Während der Oogenese lösen sich diese Zellen aus dem einschichtigen Follikelepithel und wandern zwischen den Nährzellen zur posterior gelegenen Oocyte. Wenn sie die Oocyte erreichen, wandern sie - immer noch als eine Gruppe - in dorsaler Richtung, bis sie sich oberhalb des Oocytenzellkerns befinden. Dort verharren die Zellen und bilden die so genannte Mikropyle, die spätere Eintrittsstelle des Spermiums durch die Eischale (Montell, 2001; Rorth, 2002).

Eine Grundlage der Zellmigration der Grenzzellen, ist das Verlassen des Epithelverbandes. Dieser Prozess findet durch die Spezifizierung der anterioren Follikelzellen durch die JAK-STAT-Signalkaskade statt. In dieser Kaskade werden STAT (*signal transducers and activators of transcription*)-Proteine durch Mitglieder der JAK (*janus activated kinase*)-Familie der Tyrosinkinase aktiviert. Die aktivierten STATs dimerisieren und werden in den Zellkern verlagert, um dort die Expression von Zielgenen zu modulieren. Im Prozess der Grenzzell-Wanderung, führt diese Kaskade über die Expression des Transkriptionsfaktors SLOW BORDER CELLS (SLBO), zur Expression von Genen, die für die Migration notwendig sind (Beccari et al., 2002; Montell et al., 1992; Silver und Montell, 2001). Die Wanderung der Zellen ist von der E-Cadherin-vermittelten Adhäsion der Zellen untereinander und zum Substrat abhängig (Niewiadomska et al., 1999). Die gerichtete Wanderung wird über die zwei Rezeptor-Tyrosin-Kinasen PVR (PDGF/VEGF Rezeptor) und EGFR (*epidermal growth factor receptor*) vermittelt (Duchek und Rorth, 2001; Duchek et al., 2001).

Ein weiteres Beispiel für die RTK-vermittelte Zellmigration findet man während der Mesoderm-Morphogenese in *Drosophila*. Auf diesen Prozess wird später noch ausführlicher eingegangen. Die Zellmigration spielt auch in höher entwickelten Tieren, wie den Wirbeltieren, eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung eines Organismus. Als ein Beispiel soll die Wanderung der Neuralleistenzellen im Hühnerembryo aufgeführt werden. Die Neuralleistenzellen von Wirbeltieren stammen aus den Kanten der Neuralwülste und werden während der Neurulation erstmals sichtbar. Der Übergang vom Epithel zum Mesenchym ist auch in diesem Beispiel das Schlüsselereignis, das die Migration der Neuralleistenzellen auf beiden Seiten der Mittellinie des Neuralrohres ermöglicht. Im Rumpf des Hühnerembryos wandern die Neuralleistenzellen vor allem auf zwei Wegen. Eine Gruppe von Zellen wandert unter dem Ektoderm und auf den Somiten in dorsolateraler Richtung um später Pigmentzellen zu bilden, die in der Lage sind in Haut und Federn einzudringen. Die andere Gruppe wandert über das Neuralrohr und dann durch die vordere Hälfte des Somiten. Auch im Hühnerembryo wird die Richtung der Wanderung von den adhäsiven Eigenschaften

des Substrats, auf dem sie wandern, beeinflusst. Unterschiede in der Adhäsionsstärke zwischen den anterioren und posterioren Somiten führen dazu, dass die Wanderung der Neuralleistenzellen auf die anteriore Hälfte des Somiten beschränkt wird. Diese Beschränkung gewährleistet die segmentale Verteilung der zukünftigen Dorsalganglien.

Vergleicht man all diese verschiedenen Migrationsformen in den unterschiedlichen Organismen, werden bestimmte Gemeinsamkeiten deutlich. Zum einen wird die Bedeutung des Substrates, auf dem die Zellen wandern, deutlich. Egal ob es sich dabei um die Wanderung einzelliger Organismen, wie der Myxamöbe *Dictyostelium*, oder die Wanderung von Zellen innerhalb eines Gewebes handelt. Ebenso essentiell sind Membranrezeptoren, die extrazelluläre Signale wahrnehmen und in eine entsprechende Zellantwort umwandeln können. Ein Prozess, der in allen aufgeführten vielzelligen Tieren die Grundlage der Zellmigration bildet, ist der Übergang epithelialer Zellen zum Mesenchym. Auf die molekularen Grundlagen, die der Zelladhäsion und der Zellbeweglichkeit zugrunde liegen, wird in einem späteren Abschnitt noch intensiver eingegangen. Doch zunächst soll noch ein weiteres Beispiel der Zellmigration in *Drosophila* ausführlicher erörtert werden, da es die Grundlage dieser Arbeit darstellt.

1.2 Mesoderm-Migration bei *Drosophila melanogaster*

Die Morphogenese des Mesoderms ist ein weiteres Beispiel für die Zellbewegung während der Entwicklung von *Drosophila*. Nach der Befruchtung der Eizelle findet bei *Drosophila*, die für Insekten charakteristische superfizielle Furchung statt. Während dieser partiellen Furchung durchlaufen die zygotischen Zellkerne neun mitotische Teilungen, bevor sie an den Zellkortex wandern. Auf diese Weise wird das syncytiale Blastoderm gebildet. Nach einer Entwicklungsdauer von ca. 2h 15min findet die Zellularisierung statt. Sie wird durch die Bildung der so genannten Furchungskanäle ermöglicht, die durch das Einstülpen der Plasmamembran zwischen den Zellkernen entstehen. Begleitet wird dieser Prozess von der Umorganisation des Aktinzytoskeletts. Der Aktin-Myosin-Ring unterstützt in der zweiten, schneller ablaufenden Phase der Zellularisierung, die Konstriktion der Furchungskanäle, um die Blastodermzellen basal abzuschließen (Foe et al., 2000; Mazumdar und Mazumdar, 2002; Schejter und Wieschaus, 1993).

Zwei Gene, die maßgeblich an der Gestaltbildung, der Positionierung und an der Stabilisierung der Furchungskanäle beteiligt sind, sind *DRhoGEF2* und *diaphanous (dia)* (Grosshans et al., 2005; Padash Barmchi et al., 2005). *DRhoGEF2* kodiert für einen Guanin-

Nukleotid-Austauschfaktor (guanine nucleotide exchange factor, GEF), der spezifisch die kleine GTPase RHO1, ein Mitglied der kleinen GTPasen der Rho-Familie, aktivieren kann (Grosshans et al., 2005). Zusammen mit *dia* ist *DRhoGEF2* für die korrekte Assemblierung der Aktinfilamente notwendig (Afshar et al., 2000; Grosshans et al., 2005).

Nach der Zellularisierung bilden etwa 6000 Zellen die einschichtige Epithelschicht der Blastula, die bei *Drosophila* als zelluläres Blastoderm bezeichnet wird. Die Determination der Achsen in anterior-posterior, bzw. dorsal-ventral, ist zu diesem Zeitpunkt bereits durch die maternalen Komponenten festgelegt. Für die Determination der dorsalen Seite des Embryos ist eine Gruppe maternaler Gene zuständig, zu der auch das Gen *dorsal* zählt. Es kodiert für einen Transkriptionsfaktor, dessen Transport in den Zellkern - in Abhängigkeit von anderen maternalen Genen - in Form eines Konzentrationsgradienten entlang der dorsoventralen Achse erfolgt. Auf der ventralen Seite lokalisiert das DORSAL Protein in den Zellkernen, während es auf der dorsalen Seite des Embryos im Zytoplasma verbleibt (Roth et al., 1989). In seiner Funktion als Transkriptionsfaktor aktiviert das DORSAL Protein auf der ventralen Seite des Embryos die Expression zygotischer Gene. Zu den Genen, die von *dorsal* reguliert werden, zählen *twist (twi)* und *snail (sna)*. Beide werden innerhalb eines ventralen Zellstreifens exprimiert, der später das Mesoderm bildet. Mit der Aktivierung mesodermaler Gene durch TWI, bzw. der Repression Ektoderm-spezifischer Gene durch SNA, wird letztendlich die Invagination des ventralen Zellstreifens in das Innere des Embryos ermöglicht (Leptin, 1991).

Die Invagination der ventralen Furche stellt die erste Bewegung des Mesoderms während der Gastrulation bei *Drosophila melanogaster* dar. Dieser Prozess findet nach 2h 50min - 3h der Entwicklung statt. Die erste sichtbare Zellformveränderung ist das apikale Abflachen von Zellen entlang des zentralen Streifens der ventralen Mittellinie. Kurz darauf ziehen sich zuerst die peripheren Randzellen, dann die zentralen Zellen apikal zusammen. Ein Prozess, den man als apikale Verjüngung oder Konstriktion bezeichnet. Gleichzeitig werden die Zellkerne der zentralen Zellpopulation basal, die Zellkerne der Randzellpopulation in die Peripherie verlagert. Eine ventrale Furche bildet sich aus, die sich in den Embryo einstülpt (Abb. 1.1A). Die Invagination des Mesoderms beginnt. Lateral zum Mesoderm gelegene Zellen üben vermutlich den nötigen Druck aus, der zur Schließung der ventralen Furche führt (Leptin und Grunewald, 1990). Die invaginierten Mesodermzellen bilden im Innern des Embryos eine röhrenähnliche Struktur. Dabei bilden die zentralen Zellen die Röhre, während die peripheren Zellen eine Art Stiel bilden.

Die Expression der zygotischen Genen *twi* und *sna* ist für den Ablauf dieses Prozesses notwendig, denn in *twi* und *sna* mutanten Embryonen unterbleibt die Invagination des Mesoderms. Während sich bei *twi* mutanten Embryonen vorübergehend eine schmale Furche bildet, findet bei *sna* Mutanten lediglich die Abflachung der zukünftigen Mesodermzellen statt. Die Anzeichen einer Furchenbildung treten in beiden Mutanten im Vergleich zum Wildtyp zudem verzögert auf (Leptin und Grunewald, 1990). Die von diesen Genen kodierten Transkriptionsfaktoren sind also an der Regulation von Genen beteiligt, die für die Umorganisation des Zytoskeletts notwendig sind.

Das Gen *folded gastrulation (fog)*, das für ein putatives sekretiertes Signalmolekül kodiert, stellt ein mögliches Zielgen für TWI und SNA dar (Leptin, 1994; Parks und Wieschaus, 1991). Ein Verlust des *fog* Gens unterbindet die apikale Konstriktion der Randzellpopulation. Die Bildung der ventralen Furche findet verzögert und unregelmäßig statt (Leptin, 1994). Ein weiteres Gen, das die apikale Konstriktion der prä-mesodermalen Zellen koordiniert, ist *concertina (cta)*. *Cta* kodiert für die G_{α} - Untereinheit eines trimeren G-Proteins (Parks und Wieschaus, 1991). Zusammen mit *DRhoGEF2* vermitteln *fog* und *cta* die Invagination des Mesoderms (Barrett et al., 1997; Costa et al., 1994; Hacker und Perrimon, 1998; Leptin, 1994; Parks und Wieschaus, 1991).

Nach einer Entwicklungsdauer von etwa 3h 30min (Stadium 7, Abb. 1.1) ist das Mesoderm vollständig invaginiert. Das Ende der Gastrulation ist durch die Bildung der mesodermalen und der endodermalen Schicht gekennzeichnet. Doch die eigentliche Gestaltbildung des Mesoderms beginnt zu diesem Zeitpunkt erst. Im Stadium 8 der Embryonalentwicklung kommt es zur Abflachung der invaginierten Röhre aus Mesodermzellen. Die Mesodermzellen verlieren ihren epithelialen Charakter und werden zu mesenchymalen Zellen, die auf dem Ektoderm dissoziieren (Abb. 1.1C). Diesen Vorgang bezeichnet man als Epithel-Mesenchym-Übergang. Zu diesem Zeitpunkt kommt es zur ersten mitotischen Zellteilung nach der Gastrulation (Bate et al., 1993; Campos-Ortega und Hartenstein, 1985). Die zukünftigen Neuroektodermzellen behalten ihren epithelialen Charakter und Zell-Zell-Interkalation ermöglicht ihnen die Durchführung der Keimstreifstreckung (Campos-Ortega und Hartenstein, 1985; Irvine und Wieschaus, 1994). Die Mesodermzellen hingegen verlieren ihren epithelialen Charakter. Der mesenchymale Charakter der Mesodermzellen ist eine wichtige Voraussetzung der lateralen Ausbreitung auf dem Ektoderm, die sich im Stadium 9 der Embryonalentwicklung (unterbrochen von einer weiteren Mitosewelle) fortsetzt.

Im Stadium 10 haben sich die Mesodermzellen einschichtig auf dem Ektoderm ausgebreitet (Abb. 1.1D). Die lateral gelegenen Mesodermzellen sind dadurch in der Lage, positionierte

Signale vom Ektoderm wahrzunehmen. Diese ermöglichen die Determination zu Vorläuferzellen bestimmter Mesodermderivate. Zwei Gene, die für ektodermal segregierte Moleküle kodieren, sind *decapentaplegic (dpp)* und *wingless (wg)*. Während DPP kardiale und somatische Mesodermzellschicksale vermittelt, ist WG für die Segregation spezifischer Herzgründerzellen (Perikardialzellen) und somatischer Muskelzellen zuständig (Bate et al., 1993; Baylies et al., 1995; Frasch, 1995; Lawrence et al., 1995; Ranganayakulu et al., 1996; Staehling-Hampton et al., 1994; Wu et al., 1995). Die Differenzierung zu den beiden Mesodermderivaten wird durch die, sich segmental wiederholende Expression des Homeodomänen-Proteins Even-Skipped (EVE) angezeigt. Die *eve* Expression in den Mesodermderivaten, ist im Stadium 10 auf eine Zellgruppe pro Hemisegment beschränkt. Eine solche Zellgruppe setzt sich aus einem Paar Perikardialzellen und einer Muskelvorläuferzelle, dem Dorsal Akut Muskel1, zusammen (Frasch et al., 1987).

Nur die vollständige Ausbreitung des Mesoderms auf dem Ektoderm stellt die Differenzierung zu den Mesodermderivaten sicher. Die Expression des EVE Proteins in den Perikardialzellen, ist somit ein indirekter Marker für die ordentliche Ausbreitung des Mesoderms. Mutanten, in denen die Mesoderm-Morphogenese fehlerhaft abläuft, sind durch die unvollständige, oder sogar fehlende *eve* Expression gekennzeichnet. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass der von *heartless (htl)* kodierte FGF (Fibroblasten-Wachstumsfaktor; *fibroblast growth factor*)-Rezeptor (FGFR) für die Zellmigration und die Differenzierung des Mesoderms notwendig ist (Beiman et al., 1996; Gisselbrecht et al., 1996; Michelson et al., 1998b; Shishido et al., 1993; Shishido et al., 1997). Die fehlende dorsale Ausbreitung des Mesoderms in *htl* Mutanten, verhindert die Induktion der Mesodermderivate durch das DPP Signal. Diesen Embryonen fehlt viszerale und somatische Muskulatur, sowie das Herz, was dem Gen letztendlich seinen Namen verliehen hat.

FGF-Rezeptoren gehören zur Familie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs), die an einer Vielzahl interzellulärer Kommunikationsprozesse beteiligt sind. Die Bindung eines extrazellulären Liganden, führt zur Dimerisierung und Autophosphorylierung zweier RTK-Monomere und damit zur Aktivierung der RTK (Schlessinger et al., 1995). Durch die Phosphorylierung spezieller Tyrosin-Reste werden Bindestellen für zytoplasmatische Adaptorproteine mit Phosphotyrosin-Bindemodulen kreiert (Pawson und Scott, 1997). Die rezeptorvermittelte Phosphorylierung von zusätzlichen Substraten führt zur Stimulation konservierter Signaltransduktionsmoleküle, zu denen die kleine GTPase RAS und die Mitogen-Aktivierte-Protein (MAP)-Kinase (MAPK) zählen (Cobb und Goldsmith, 1995;

Seger et al., 1992). Die MAP-Kinase ist letztendlich dazu in der Lage, die Signale durch die Regulation der Genexpression umzusetzen (Fantl et al., 1993; van der Geer et al., 1994).

Der FGFR vermittelte Signalweg verläuft über das Adaptorprotein DRK, das jedoch nicht direkt an den Rezeptor bindet, über RAS zur Diphosphorylierung der MAPK (Klint et al., 1995; Kouhara et al., 1997; Wasserman et al., 1995). Als eine weitere Komponente dieses Signalwegs konnte ein intrazelluläres, unter den Namen DOF, HEARTBROKEN oder STUMPS bekanntes Protein identifiziert werden (Imam et al., 1999; Michelson et al., 1998a; Vincent et al., 1998), das physikalisch mit dem HTL-Rezeptor interagiert (Battersby et al., 2003; Petit et al., 2004; Wilson et al., 2004). Eine mögliche Funktion von DOF ist die Rekrutierung von Corkscrew (CSW) zum Signalkomplex (Petit et al., 2004; Wilson et al., 2004). *csw* kodiert für eine Tyrosin-Phosphatase mit zwei SH2 Domänen, die als Phosphotyrosin-Bindedomäne fungieren können (Perkins et al., 1992). CSW scheint jedoch nicht spezifisch für den von *htl* kodierten FGFR zu sein, da CSW auch für die FGF-abhängige Bildung des Tracheensystems notwendig ist (Gabay et al., 1997b; Johnson Hamlet und Perkins, 2001). In diesen Prozess ist der zweite, in *Drosophila* identifizierte FGF-Rezeptor Breathless (BTL) involviert (Glazer und Shilo, 1991; Klämbt et al., 1992; Murphy et al., 1995).

Neben dem HTL-FGF-Rezeptor wird auch dessen Adaptormolekül DOF im Mesoderm exprimiert (Imam et al., 1999; Michelson et al., 1998a; Vincent et al., 1998). Die Aktivierung der MAP-Kinase innerhalb des Mesoderms erfolgt in einem dynamischen Muster, wobei die stärkste Expression in den dorsalen Mesodermzellen zu sehen ist (Gabay et al., 1997b). Diese Daten ließen schon die Expression eines HTL-Liganden in einem ebenso dynamischen Muster entlang des Ektoderms vermuten. Im letzten Jahr konnten zwei mögliche Liganden des FGF-Rezeptors HTL identifiziert werden, FGF8-like1/Thisbe und FGF8-like2/Pyramus, deren Expressionsmuster hoch dynamisch in den benachbarten Ektodermzellen zu finden ist (Gryzik und Müller, 2004; Stathopoulos et al., 2004). Die putativen FGF Liganden scheinen sowohl für die Funktion von HTL bei der Zellmigration, als auch für die zweite Funktion von HTL, bei der Differenzierung der Herzvorläuferzellen, notwendig zu sein (Michelson et al., 1998b; Stathopoulos et al., 2004).

Zwei weitere *Drosophila* Gene, *sugarless* (*sgl*) und *sulfateless* (*sfl*) wurden identifiziert, die an einem FGFR-vermittelten-Signalweg beteiligt sind. Sie kodieren für Enzyme, die für die Heparansulfat-Glukosaminylykan - (HS GAG) - Biosynthese erforderlich sind (Lin et al., 1999). HS GAGs bilden die Seitenketten von Heparin-/ Heparan-Sulfat-Proteoglykanen (HSPGs). Dabei handelt es sich um Makromoleküle, die mit der Zelloberfläche und der

extrazellulären Matrix verankert sind (Bernfield et al., 1992; David, 1993; Kjellen und Lindahl, 1991; Yanagishita und Hascall, 1992). HSPGs sind an dem FGF-Signaltransduktionsweg beteiligt, indem sie als Co-Rezeptoren der FGFRs agieren (Schlessinger et al., 1995).

Im vorangehenden Abschnitt wurden eine Reihe von Genen vorgestellt, die für den Prozess der Invagination und der Migration des zukünftigen Mesoderms während der Gastrulation von *Drosophila* notwendig sind. In der folgenden Abbildung 1.1 ist dieser Prozess noch einmal anschaulich dargestellt. Die im Text angegebenen Entwicklungsstadien der Embryonen beziehen sich auf den, im Jahre 1985 von Hartenstein und Campos-Ortega herausgegebenen, Atlas der Embryogenese (Campos-Ortega und Hartenstein, 1985).

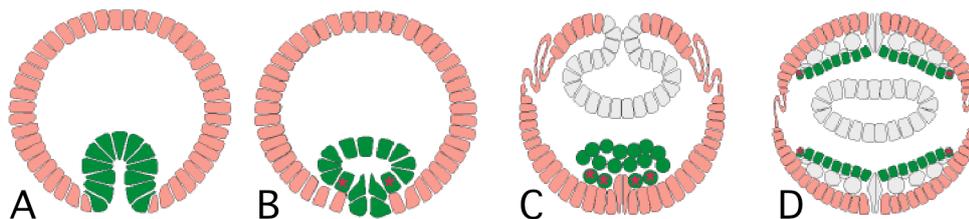


Abb. 1.1. Invagination und Migration des Mesoderms während der *Drosophila* Embryogenese. Schematische Darstellung der Mesoderm-Morphogenese in embryonalen Querschnitten. Die Ektodermzellen sind rosa gefärbt, die Mesodermzellen grün. Mesodermzellen, in denen die MAPK durch den FGFR-Signalweg aktiviert wird, sind mit roten Sternen gekennzeichnet. (A) Stadium 6-7; (B) Stadium 7; (C) Stadium 8; (D) Stadium 9. Alle Querschnitte sind so orientiert, dass die ventrale Seite des Embryos nach unten weist (nach Knust und Müller, 1998).

1.3 Molekulare Mechanismen zur Regulation der Zellbeweglichkeit

Wie das Beispiel der Mesoderm-Migration in *Drosophila* verdeutlicht, muss man bei der Zellwanderung in einem mehrzelligen Organismus immer berücksichtigen, dass sich die Zellen in einem Gewebekontext befinden. Oft müssen die Zellen zunächst die Fähigkeit erlangen, sich aus ihrem zellulären Umfeld zu lösen, um in andere Bereiche eindringen zu können. Das bedeutet, dass alte Zellkontakte gelöst und neue hergestellt werden müssen. Die Zellen wandern häufig auch nicht einzeln, sondern in einer Gruppe. Zelladhäsion spielt bei diesen Prozessen eine entscheidende Rolle. Die Zelladhäsion ist ein charakteristisches Kennzeichen eines vielzelligen Organismus. Man unterscheidet zwischen der Zell-Zell-Adhäsion und der Zell-Matrix-Adhäsion.

Die Zell-Zell-Adhäsion wird sowohl bei Vertebraten, als auch bei Invertebraten, durch Cadherine vermittelt (Steinberg und McNutt, 1999; Tepass, 1999). Ein typisches Cadherin ist das E-Cadherin, das auch als Uvomorulin bekannt ist. Dieses Transmembranglykoprotein etabliert zusammen mit weiteren Komponenten, zu denen auch α - und β -Catenin zählen, in

embryonalen Epithelien die Zell-Zell-Adhäsion an den Adhäsionskontakten (Provost und Rimm, 1999; Steinberg und McNutt, 1999; Yap et al., 1997). In *Drosophila* findet man die entsprechenden Homologe, DE-Cadherin, $D\alpha$ -Catenin und Armadillo (das Homolog von β -Catenin) an den Adhäsionskontakten kolokalisiert (Iwai et al., 1997; Müller und Wieschaus, 1996; Oda et al., 1994; Oda et al., 1993). DE-Cadherin spielt die Hauptrolle bei der frühen Zell-Zell-Adhäsion im *Drosophila* Embryo (Oda et al., 1994; Tepass et al., 1996).

Die Adhäsion zwischen Zellen und der Extrazellulären Matrix (EZM), wird über die Integrin-Familie von Transmembranproteinen vermittelt (Brown et al., 2000; De Arcangelis und Georges-Labouesse, 2000; Gumbiner, 1996). Integrine sind daher an einer Vielzahl von morphogenetischen Ereignissen beteiligt, die zur Gestaltbildung eines komplexen, vielzelligen Organismus notwendig sind (Brown et al., 2000; Gumbiner, 1996). Integrine sind Heterodimere, die aus einer α - und einer β -Untereinheit zusammengesetzt sind. Beide Untereinheiten sind Typ1-Transmembranglykoproteine (Hynes, 2002). Oft wird die Adhäsion der Integrine an die Extrazelluläre Matrix durch die Aktivierung eines intrazellulären Signalwegs ausgelöst. Vermutlich liegen viele Integrine aber auch konstitutiv aktiv vor. Die Bindung von Integrinen an einen extrazellulären Liganden führt zu einer Konformationsänderung der α -Untereinheit. Die zuvor von der α -Untereinheit maskierte intrazelluläre Bindestelle der β -Untereinheit, wird dadurch frei für die Bindung von einer Vielzahl zytoplasmatischer Proteine (Liu et al., 2000). Allein an der Verbindung von Integrinen und Aktin scheinen mehr als sechzig Proteine beteiligt zu sein (Zamir et al., 2000). Integrine sind in viele zellbiologische Prozesse involviert. Der wohl bekannteste ist die Vermittlung eines stabilen Zellkontaktes zum Substrat, wodurch eine physikalische Verbindung zwischen der extrazellulären Matrix und dem Zytoskelett entsteht (Hynes, 2002). Integrine können zusätzlich als signalweiterleitende Rezeptoren agieren (Giancotti und Ruoslahti, 1999; Miranti und Brugge, 2002). Die Signalweiterleitung kann beispielsweise über die kleinen GTPasen der Rho Familie die Organisation des Zytoskeletts regulieren (Schwartz und Shattil, 2000). Ob der Integrin-vermittelte Signalweg auch die Genexpression beeinflussen kann, ist noch nicht geklärt. Möglich wäre aber zumindest eine indirekte Regulation über die (nachgewiesene) Aktivierung der MAPK (Giancotti und Ruoslahti, 1999). Im Hinblick auf Zellformveränderungen und Zellmigration ist die Rolle von Integrinen bei der Zusammensetzung des Substrats, das von den wandernden Zellen erkannt werden muss, von großer Bedeutung (Lauffenburger und Horwitz, 1996).

Während der gerichteten Zellbewegung nehmen wandernde Zellen eine charakteristische Zellform an. Das Zytoskelett ermöglicht als zelluläres Grundgerüst die erforderlichen

Zellformveränderungen. Man unterscheidet drei Klassen von Proteinfilamenten die das Zytoskelett bilden. Intermediärfilamente verleihen der Zelle ihre mechanische Stabilität. Mikrotubuli sind für die zelluläre Organisation, im Rahmen der Aufrechterhaltung der Zellasymmetrie und -polarität, verantwortlich. Die Bewegung einer Zelle ermöglichen die Aktinfilamente (auch als Mikrofilamente bezeichnet) und ihre assoziierten Proteine (Mitchison und Cramer, 1996). Die Polymerisation einzelner globulärer Aktin-Monomere (G-Aktin), ermöglicht die Bildung langer Aktinfilamente (F-Aktin), die sich in einer Vielzahl gut definierter Strukturen organisieren können. Filopodien sind fingerartige Fortsätze, die ein straffes Bündel langer Aktinfilamente enthalten. Man findet sie primär in beweglichen Zellen und neuronalen Wachstumszonen. Lamellipodien sind flache Zellausstülpungen, welche die Ränder von Fibroblasten und vielen beweglichen Zellen säumen. Heben sich die Zellränder vom Substrat ab und falten sich dann wieder zurück, entsteht ein Kräuseln der Membran. Stressfibrillen, werden aus Aktinfilamenten gebildet, welche die Zelle durchsetzen und mit der Extrazellulären Matrix an Punkten der fokalen Adhäsion verbunden sind.

Über die Regulation des Aktinzytoskeletts sind die kleinen GTPasen der Rho Familie, an vielen zellulären Prozessen, wie der Gestaltänderung oder der Adhäsion, beteiligt (Hall, 1998). Untersuchungen an Fibroblasten brachten wichtige Einblicke in die Funktionen der verschiedenen GTPasen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Rho die Assemblierung von kontraktile Aktin-Myosin-Filamenten und die Bildung von fokalen Adhäsionen stimuliert (Ridley und Hall, 1992b), Rac zur Bildung von Lamellipodien und Membran-Kräuseln führt (Ridley und Hall, 1992a) und Cdc42 Filopodien induziert (Kozma et al., 1995). Bei *Drosophila* sind die folgenden sieben Mitglieder der Rho Familie kleiner GTPasen bekannt: RHO1 (RhoA), Rho-like (RhoL), Cdc42, Rac1, Rac2, MIG2-like (MTL) und RhoBTB (Hakeda-Suzuki et al., 2002; Hariharan et al., 1995; Luo et al., 1994; Murphy und Montell, 1996). Die phänotypische Analyse und die Expression konstitutiv aktiver, sowie dominant negativer Formen dieser Proteine in *Drosophila* konnte zeigen, dass diese GTPasen an einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt sind, die auf der Umorganisation des Aktinzytoskeletts beruhen.

Rho GTPasen wechseln zwischen zwei biochemischen Zustandsformen, die sich durch die Assoziation von GDP (inaktive Form) oder GTP (aktive Form) unterscheiden (Symons und Settleman, 2000). Die Aktivierung einer kleinen GTPase durch die Bindung von GTP, führt zu einer Konformationsänderung, die eine Interaktion mit Effektoren der folgenden Signaltransduktionskette erlaubt und somit die Signalweiterleitung ermöglicht. Die Aktivität der kleinen GTPasen wird *in vivo* durch drei Hauptklassen von Proteinen reguliert. Die

Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs; *guanine nucleotide exchange factors*) sind Aktivatoren der GTPasen, da sie den Austausch an gebundenem GDP durch GTP katalysieren. GTPase-aktivierenden-Proteine (GAPs) wirken negativ auf die kleinen GTPasen, da sie deren schwache intrinsische Rate der GTP-Hydrolyse erhöhen. Durch diese irreversible Reaktion wird die Konzentration an gebundenen GDP Molekülen erhöht (Whitehead et al., 1997; Zalzman et al., 1999). Auch die Guanin-Nukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (GDIs) sind negative Regulatoren der kleinen GTPasen, da sie den Austausch von GDP durch GTP unterdrücken (Zalzman et al., 1999). In *Drosophila* sind bisher sieben Regulatoren der Familie der Rho-GTPasen näher charakterisiert worden. Zu ihnen zählen RhoGEF2, RhoGEF3, GEF64C, Pebble (PBL), Trio, RnRacGAP und RacGAP50C (Barrett et al., 1997; Debant et al., 1996; Hacker und Perrimon, 1998; Hicks et al., 2001; Prokopenko et al., 1999; Somers und Saint, 2003).

Für den korrekten Ablauf der Zytokinese in den postblastodermalen Zellen ist der GEF Pebble (PBL) notwendig (Hime und Saint, 1992; Lehner, 1992; Prokopenko et al., 1999). In *pbl* mutanten Embryonen finden ab dem Mitosezyklus 14 keine Zellteilungen mehr statt, was zu embryonaler Letalität führt (Hime und Saint, 1992; Lehner, 1992). Es konnte gezeigt werden, dass PBL für die Bildung des kontraktilen Ringes und die Initiierung der Zytokinese notwendig ist (Prokopenko et al., 1999). PBL ist ein möglicher Austauschfaktor für die GTPase RHO1 und interagiert sowohl genetisch als auch im Zwei-Hybrid-System der Hefe mit RHO1 (Prokopenko et al., 1999). Die Funktionsweise von PBL besser zu verstehen, ist ein Ziel dieser Arbeit.

1.4 Themenstellung

In dieser Arbeit soll der Prozess der Mesoderm-Migration während der Entwicklung von *Drosophila melanogaster* auf der zellulären Ebene untersucht werden. Es soll geklärt werden, ob die Ausbreitung der mesodermalen Zellen das Ergebnis einer gerichteten Zellwanderung ist, oder auf die stärkere Adhäsion der Mesodermzellen zum Ektoderm zurückzuführen ist. Zu diesem Zweck sollen zunächst die mesodermalen Zellformveränderungen im Wildtyp-Embryo untersucht werden. Die vergleichende Analyse von Embryonen, die Defekte in der Ausbreitung des Mesoderms besitzen, soll zum besseren Verständnis der Funktion dieser Komponenten beitragen. So soll zum einen die Beteiligung des mesodermal exprimierten Gens *htl*, das für eine membranständige RTK kodiert, an dem Ausbreitungsprozess untersucht werden. Einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit stellt die Charakterisierung der Funktion

von *pbl*, einer neu identifizierten Komponente der Mesoderm-Migration, dar. Da bisher nur die Funktion von PBL in der Zytokinese von *Drosophila* bekannt ist, soll zunächst geklärt werden, ob die Ausbreitung des Mesoderms in *pbl* mutanten Embryonen aufgrund der Zytokinesedefekte unterbleibt. Erst wenn eine unabhängige Funktion von PBL in der Zytokinese nachgewiesen werden kann, soll diese Funktion genauer untersucht werden. Auch hier sollen zunächst die mesodermalen Gestaltänderungen auf der zellulären Ebene verfolgt werden. Die Untersuchung der Expression von *pbl* im Mesoderm soll Hinweise auf dessen Funktion im Migrationsprozess liefern.

Um Herauszufinden, ob die Funktion von PBL über verschiedene Proteindomänen reguliert wird, sollen bereits existierende *pbl* Allele sequenziert und auf Defekte in der Mesoderm-Morphogenese hin untersucht werden. Die Identifizierung der einzelnen Mutationen soll Hinweise auf die Funktion der betroffenen Domäne geben. Um gezielt die Funktion einzelner Domänen ausschalten zu können, sollen Deletionskonstrukte hergestellt werden, die im Rahmen von Rettungsexperimenten in *pbl* mutanten Embryonen exprimiert werden. Beide Methoden sollen zur Struktur funktionsanalyse von PBL beitragen und Einblicke in die Funktion von PBL in der Mesoderm-Migration bringen.

2 Material und Methoden

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

Alle Lösungen für molekularbiologische Arbeiten wurden mit dH₂O angesetzt und autoklaviert, oder 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.

Photoarbeiten und Bildverarbeitung:

Röntgenfilm: Fuji SuperRX, *Fuji*, Tokyo, Japan

Röntgenfilm-Entwickler: Tenetal Roentogen, *Tenetal*, Norderstedt

Röntgenfilm-Fixierer: Tenetal Roentogen Superfix, *Tenetal*, Norderstedt

Photolichtmikroskop: Zeiss Axiophot 2, *Zeiss*, Oberkochen

Konfokales Mikroskop: Leica TCS NT, *Leica*, Heidelberg

Computersystem: Macintosh PowerPC, *Apple*, Ismaning

Bildverarbeitung: Adobe Photoshop 7, *Adobe Systems*, San Jose, USA

Canvas 8, *Deneba Systems*, Miami, USA

2.1 Der Umgang mit DNA

2.1.1 Vektoren

2.1.1.1 pBluescript SK

In dieser Arbeit wird der Vektor pBlueskript SK (pBS SK) der Firma *Stratagene* (Heidelberg) eingesetzt.

2.1.1.2 pUAST - ein UAS-Gal4-Vektor

Am 5'-Ende der MCS befindet sich die Sequenz von fünf Gal4-Bindestellen, welche die Expression des klonierten Gens mit entsprechenden Helferplasmiden ermöglichen.

2.1.1.3 pCaSpeR4

Um diesen Vektor zu kreieren wurden die Restriktionsschnittstellen zwischen *EcoRI* und *PstI* aus dem Gehring's pW8 Vektor in den pCaSpeR-Vektor kloniert (Thummel, 1992).

2.1.1.4 pUCA2-3 - Helferplasmid zur Transformation von *Drosophila*-Embryonen

Das P-Element-Helferplasmid enthält die Sequenz der Transposase, die zur Integration des P-Elementes notwendig ist. Das P-Element des pUCA2-3-Vektors ist hingegen so modifiziert, dass es selbst nicht in das Genom integrieren kann. Die Deletion des zweiten und dritten Introns im Transposase-Gen ist dafür verantwortlich, dass die Transposase nur in den Keimzellen aktiv ist (Rio, 1991).

2.1.2 Amplifizierung von DNA Fragmenten

Primerpaare, die spezifisch an den entgegengesetzten Strängen der DNA binden, ermöglichen die gezielte Amplifikation bestimmter Gensequenzen mittels Polymerase-Kettenreaktion.

2.1.2.1 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Ausgangspunkt für die enzymatische Vermehrung ist die Hybridisierung der Primerpaare an die zuvor bei 94°C denaturierte DNA. Von dort aus startet die Synthese der komplementären DNA mit Hilfe der DNA-Polymerase. Zur Amplifikation von PCR-Fragmenten, die zur Klonierung eingesetzt werden sollen, empfiehlt sich die Benutzung der so genannten *Pfu*-Polymerase. Im Vergleich zur *Taq*-Polymerase ist die Gefahr des falschen Nukleotid-Einbaus bei der *Pfu*-Polymerase geringer. Man rechnet für die Zeit, welche die *Pfu*-Polymerase zur Verlängerung eines 1kb-langen Fragmentes benötigt, eine Minute Verlängerungszeit ein.

Im Folgenden ist ein Standard-PCR-Programm dargestellt, wie es zur Amplifizierung von PCR-Fragmenten eingesetzt wird.

Schritt	Temperatur	Funktion	Dauer
I.	95°C	Denaturierung	5 min
II.	Primer-abhängig	Annealing	30 sec
III.	72°C	Verlängerung	Polymerase- und Produkt-abhängig
IV.	95°C	Denaturierung	1 min
V.	Primer-abhängig	Annealing	30 sec
VI.	72°C	Verlängerung	Polymerase- und Produkt-abhängig
VII. <i>go to IV. 10x</i>			
VIII.	95°C	Denaturierung	30 sec
IX.	Primer-abhängig	Annealing	30 sec
X.	72°C	Verlängerung	Polymerase- und Produkt-abhängig
XI. <i>go to VIII.</i> 25x			
XII.	95°C	Denaturierung	30 sec
XIII.	Primer-abhängig	Annealing	30 sec
XIV.	72°C	Verlängerung	Polymerase- und Produkt-abhängig
XV.	4°C	Reaktionsende	

Tabelle 2.1.2.1. Standard-PCR-Programm.

Im Folgenden ist ein Pipettierschema aufgeführt, wie es allgemein für PCR-Ansätze gilt: 200 ng DNA werden mit 6 µl dNTP's [10 mM], 1,5 µl 5'Primer [50µmol], 1,5 µl 3'Primer [50 µmol] versetzt und mit dH₂O auf 25µl Volumen aufgefüllt. Im zweiten Ansatz wird die Polymerase mit dem entsprechenden Puffer in dH₂O angesetzt. Die Komponenten aus und II. werden zunächst getrennt auf Eis angesetzt und erst kurz vor dem Starten der Polymerasekettenreaktion zusammengegeben. Für alle PCR-Anwendungen wurde der Thermocycler PTC-200 der Firma *MJ Research*, Watertown, USA, eingesetzt.

2.1.2.2 Oligonukleotide zur Amplifizierung von PCR-Fragmenten

Die Herstellung der Primer, die in dieser Arbeit verwendet werden, erfolgt bei der Firma *Eurogentec* (Belgien). Primer, die zur Klonierung eingesetzt werden sollen, werden häufig so konstruiert, dass sie die Sequenz, der zur Klonierung notwendigen Restriktionsschnittstelle, als Basenüberhang besitzen. Bei der Konstruktion dieser Primer ist es wichtig zu beachten, dass die Erkennungsstelle der Restriktionsendonukleasen über flankierende 5' und 3'-Sequenzen verfügen muss. In dem Katalog der Firma *Biolabs* findet man eine tabellarische

Auflistung verschiedener Enzyme, die zur Spaltung von Oligonukleotiden am Ende von DNA-Fragmenten bestimmte Basenüberhänge benötigen. Diese Tabelle gibt auch Hinweise auf die zu beachtende Reihenfolge beim Einsatz von mehreren Enzymen.

2.1.3 Sequenzierung der *pbl* Allele

Ein Abschnitt dieser Arbeit ist die Sequenzierung der verschiedenen *pbl* Allele. Dazu werden zehn verschiedene Primärpaare so gewählt, dass mit ihrer Hilfe der gesamte kodierende Bereich der *pbl* mRNA abgedeckt wird. Die Primärpaare binden meist in den angrenzenden Intron-Sequenzen, um Mutationen, die zu Spleißdefekten führen, auch identifizieren zu können. Die Primer, die zur Amplifikation der genomischen DNA eingesetzt wurden, sind in Tab.2.1.3 aufgelistet. Die genomische DNA wird zuvor wie in Abschnitt 2.1.5 beschrieben präpariert. Die Amplifikate werden zur Sequenzierung an die Firma *SEQLAB* (Göttingen) geschickt. Da die PCR auf genomischer DNA von Embryonen durchgeführt wird, die heterozygot für das entsprechende *pbl* Allel sind, erlaubt die anschließende Computeranalyse mit dem *EditView*®-Programm (Perlin Elmer), die vom Wildtyp (w^{1118}) abweichenden Sequenzen herauszufinden.

Primer	Sequenz (5'-3')	Größe [bp]	Annealing-Temp. [°C]
pbl 1 upper	GCGCGGCACACTACAGC	574	53,7
pbl 1 lower	TTGGGCGACATTGAAAAA		
pbl 2 upper	AACCCCTTTTGTGATCGACACCTAT	501	57,1
pbl 2 lower	GGGCGGACAGCTGGACACAT		
pbl 3 upper	GAGGAAAAGCGGGGCAGGAG	719	50,6
pbl 3 lower	AATTTTACGTCGTTTTTAGAA		
pbl 8 9 10 upper	TCTAGCACATTCCGCATCTCTTTT	860	55,8
pbl 8 9 10 lower	GACAATCCTCCCGCCAGTTAGCAT		
pbl 10 upper	AAGTTGGAAGAGTTGGCTGAA	718	55,8
pbl 10 lower	CCGTGCTTGGCGATTTT		
pbl 10 11 upper	TGTCCGGCGCATTAGTG	678	55,3
pbl 10 11 lower	CGGCCCGTTTCAGTTTGTT		
pbl 11 12 upper	GGCCAAAACGCGACTCAAG	521	56,0
pbl 11 12 lower	GGCGACCAATGCTCAAGGAA		
exon 7a for	CGGAGTGCTCGCATGTCGTAAG	851	57,5
exon 7a rev	CCGGCAGGGCAAAGGAGTCC		
exon 7b for	TGGATGGCATTGCTTTGGACTTC	951	55,0
exon 7b rev	TGCCGTTCCAAAGCGTGTC		
BRCT for	CGCGGCCGAGATGAAACAGA	806	57,5
BRCT rev	TTGGGCATCACCTGGAAGAC		

Tab. 2.1.3. Primer zur Sequenzierung der verschiedenen *pbl* Allele. Die Größen der zu erwartenden Amplifikate und die optimale Annealing-Temperatur der entsprechenden Primärpaare sind jeweils angegeben.

2.1.4 Vervielfältigung von DNA in Bakterien

2.1.4.1 Herstellung elektrokompenter Zellen

Das rekombinante DNA-Molekül wird mittels Transformation in elektrokompente Zellen der *E.coli* -Bakterienkultur XL1-Blue eingeschleust. Durch die Elektrokompentenz besitzen diese Zellen eine gesteigerte Fähigkeit DNA-Moleküle aufzunehmen.

Im folgenden Abschnitt wird das Protokoll zur Herstellung elektrokompenter Zellen in Anlehnung an *Hanahan et al.* (Hanahan et al., 1991) beschrieben. Wichtig ist, dass jeder Arbeitsschritt im Kühlraum und auf Eis durchgeführt wird. Am Vortag werden 50 ml des autoklavierten SOB-Mediums abgenommen, mit 12,5 µg/ml Tetracyclin versetzt und als Vorkultur mit den XL1-Blue-*E.coli*- Zellen (Bakteriendichte 1×10^8) angeimpft. Zum Wachstum wird die Kultur üN bei 37°C und 140 rpm auf dem Schüttler inkubiert.

Mit der Vorkultur wird dann das restliche, auf 37°C vorgewärmte SOB-Medium angeimpft und bis zum Erreichen der $OD_{600} = 0.6$ weiter auf dem Schüttler inkubiert. Nach dem Erreichen der OD von 0.6 (erfahrungsgemäß nach ca. 4 Stunden), wird die Bakterienkultur auf vier vorgekühlte 400ml *Nalgene*-Zentrifugenbecher aufgeteilt und für 15 min auf Eis gekühlt. Anschließend erfolgt die Zentrifugation für 15 min, 3500 rpm bei 1°C in der *Heraeus Megafuge 1.OR*. Nach dem Abgießen des Überstandes, wird jeweils 10ml autoklaviertes 10%-iges Glycerin auf das Bakterienpellet gegeben. Dieses wird durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert (10ml-Pipetten auch üN bei 4°C vorkühlen). Die Zentrifugenbecher werden bis unter den Rand mit dem Glycerin aufgefüllt und erneut für 15min bei 3500 rpm und 1°C zentrifugiert. Der letzte Schritt der Resuspension wird wiederholt. Nach der erneuten Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen, wird der Überstand vorsichtig abgegossen, das Pellet in 10ml Glycerin aufgenommen und in vier vorgekühlte JA 20- Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zentrifugation in der *Beckmann*-Kühlzentrifuge (Model J2-21) erfolgt bei 1°C und 4000 rpm für 5 min. Nach dem vorsichtigen Abgießen des Überstandes wird auf zwei Röhrchen jeweils 3ml Glycerin gegeben und die Zellen darin resuspendiert. Mit der Resuspension werden auch die Zellen in den verbleibenden Röhrchen aufgenommen. Die resuspendierten Zellen werden in 50µl Aliquots auf Reaktionsgefäße verteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung der elektrokompenten Zellen erfolgt bei -70°C.

Die Transformationseffizienz der elektrokompenten Zellen wird durch die Transformation mit 1µl *pBS*-DNA[~1µg/µl] ermittelt. Die Zellen werden nach der Transformation in 1ml LB-Medium aufgenommen und für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend werden 20µl der

Suspension mit 980µl LB verdünnt. 50ml der 1:50-Verdünnung werden auf Bakterienagar-Platten (Ampicillin 100µg/ml) ausplattiert und üN bei 37°C inkubiert. Die Zahl der erhaltenen Transformanten mal 10^6 genommen, gibt die Transformationseffizienz wieder (ihr Wert sollte zwischen 50×10^6 und 100×10^6 liegen).

2.1.4.2 Transformation von Bakterien

Die Transformation ermöglicht die Vervielfältigung rekombinanter Vektor-DNA. Die Replikation innerhalb einer Bakterienzelle und deren Teilung ermöglicht die Gewinnung größerer Plasmid-DNA-Mengen, die schließlich aus den Bakterienzellen isoliert werden können. Das Protokoll zur Transformation elektrokompenter Bakterienzellen mit Plasmid-DNA wird im Folgenden beschrieben.

Ein 50µl Aliquot elektrokompenter Zellen wird auf Eis aufgetaut. Die DNA (z.B. 1µl einer Midi-Präparation oder 1µl einer 1:10 Verdünnung einer Ligation) wird zu der aufgetauten Bakteriensuspension gegeben und in eine Elektroporations-Küvette gegeben. Diese wird in die dafür vorgesehene Apparatur, den *Gene Pulser* von *Bio Rad* gegeben. Es wird die Spannung von 1,8 kV eingestellt, und die Transformation durch Elektroporation durchgeführt. Im Anschluss daran werden zügig 950 µl LB-Medium in die Küvette gegeben. Die Suspension wird vorsichtig mit der Pipette aufgenommen und in einem neuen Reaktionsgefäß 1h bei 37°C inkubiert. Danach werden 100µl der Bakteriensuspension auf einer, mit Antibiotika versetzten LB-Agarplatte (Antibiotika-Konz. [100µg/ml]) ausplattiert. Der Rest der Kultur wird kurz abzentrifugiert. Der Überstand wird bis auf ein Restvolumen von 100µl abgenommen, in dem das Pellet resuspendiert wird. Die resuspendierte Bakteriensuspension wird ebenfalls auf einer LB-Agarplatte ausplattiert und üN bei 37°C inkubiert.

2.1.4.3 Isolierung von DNA aus Bakterienkulturen

Die so genannte ‚Mini-Präparation‘ ermöglicht es, relativ rasch die Plasmid-DNA vieler Bakterien-Einzelkolonien zu untersuchen. Das auf dem Prinzip der alkalischen Lyse der Bakterienzellwand beruhende Protokoll (in Anlehnung an ein Protokoll von M. Sanicola) ist im Folgenden aufgeführt.

2ml LB-Medium werden mit 50µg/ml des entsprechenden Antibiotikums versetzt, mit einer Einzelkolonie angeimpft und üN bei 37°C inkubiert. Anschließend werden 1,5ml der Bakteriensuspension 15 sec in der Mikrozentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wird entfernt, 100µl kalte GTE-Lösung hinzugefügt und gemischt, bis die Bakterien resuspendiert sind.

GTE-Lsg.: 1 M Tris HCl pH 8; 0,5 M EDTA pH 8; 40% Glukose

Mit der Spitze eines Zahnstochers wird eine kleine Menge Lysozym hinzugefügt und gut gemischt. Es folgt die Inkubation der Suspension für 5min bei RT. Dann werden 200µl frisch angesetzter Lysis-Puffer hinzugefügt, und die Suspension wird zwei bis drei Mal invertiert, bis sie klar und viskos erscheint. Anschließend erfolgt die Inkubation auf Eis für 5min. Es werden 150µl KOAc-Lösung hinzugefügt und die Suspension wird invertiert.

Lysis-Puffer: 10 N NaOH, 20% SDS

KOAc-Lsg.(500 ml): 147,2 g KOAc; 57,5 ml HOAc

Es bildet sich ein weißer Niederschlag. Inkubation für 5min auf Eis. Danach erfolgt die Zentrifugation in der Mikrozentrifuge für 12 min. Anschließend wird der Überstand in ein neues Gefäß überführt, 0.7 Vol. Isopropanol hinzufügt und invertiert. Es folgt die Zentrifugation für 30 min bei 4°C in der Mikrozentrifuge zum Fällen der DNA. Anschließend wird der Überstand vorsichtig abgekippt und das Pellet mit 200µl kaltem 70%-igen Ethanol gewaschen (d.h.10min Zentrifugation bei RT). Der Überstand wird erneut vorsichtig abgekippt, das Pellet bei RT (bzw. 5min unter der Trockenlampe) trocknen gelassen und die DNA in 20µl dH₂O resuspendiert.

Nach der Identifizierung der richtigen DNA wird diese meist in größeren Mengen und höherer Reinheit beispielsweise für Klonierungen, Sequenzierungen oder die Transformation von Fliegen benötigt. Zu diesem Zweck wird auf die Plasmid-Midi-Kits *Nucleobond Applications* der Firma *Machery-Nagel*, Düren, zurückgegriffen. Dabei wurde nach der Anleitung zur Aufreinigung von Plasmiden (modifizierte Alkalische/SDS-Lyse) im AX100-Maßstab zur DNA-Präparation mit den entsprechenden Säulen gearbeitet.

2.1.5 Isolierung von genomischer DNA

Zur Präparation genomischer DNA werden 30 Fliegen betäubt und in einem Reaktionsgefäß für 10 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend werden die Fliegen auf Eis mit einem Biovortexer unter Zugabe von 200 µl Puffer A homogenisiert.

Puffer A: 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.5% SDS

Nach etwa 1 min werden erneut 200 µl Puffer A hinzu gegeben, und es wird weiter homogenisiert, bis nur noch Kutikula-Reste sichtbar sind. Das Homogenisat wird für 30 min

bei 65°C inkubiert. Anschließend werden 800 µl LiCl/KAc-Lösung hinzu gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert.

LiCl/KAc-Lsg.: 1Teil 5 M KAc Stock-Lsg. wird mit 2.5 Teilen 6 M LiCl Stock-Lsg. gemischt. Dabei ist zu beachten, dass das Kalium-Acetat zu dem LiCl pipettiert wird, da sonst das Salz ausfällt.

Das Homogenisat wird nun 15 min bei 13.000 rpm und RT zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird 1 ml des Überstandes in ein neues Gefäß überführt. Es erfolgt die Zugabe von 600 µl Isopropanol. Nach dem Mischen wird die DNA innerhalb einer 15-minütigen Zentrifugation bei 13.000 rpm gefällt. Anschließend wird der Überstand verworfen und die DNA mit kaltem 70%igem Ethanol gewaschen (10 min, 13.000 rpm). Die DNA wird bei RT getrocknet und in 150 µl TE-Puffer (10 mM Tris HCl pH 8; 1 mM EDTA pH8) gelöst (entweder 1 h bei RT oder üN bei 4°C). Die gelöste genomische DNA wird bei -20°C aufbewahrt.

2.1.6 DNA-Aufreinigung

2.1.6.1 Elektrophoretische Auftrennung und Elution der DNA aus Agarosegelen

Die Bausteine der DNA, die Nukleinsäuren sind negativ geladen. Diese Polyanionen wandern daher im elektrischen Feld zur Anode. Verschiedene Parameter beeinflussen die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA in einem elektrischen Feld. Neben der Molekülmasse, -ladung und Raumstruktur, spielen auch die elektrische Feldstärke, Ionenkonzentration des Laufpuffers und die Porengröße der Gelmatrix dabei eine wichtige Rolle. Unter optimalen Bedingungen ist die Laufstrecke dem Logarithmus der Molekülmasse umgekehrt proportional. In Abhängigkeit von der Größe der aufzutrennenden Moleküle werden Gele mit unterschiedlichen Agarosekonzentrationen (0,6-1,5%-ig) in TAE-Puffer gegossen und mit Ethidiumbromid [1µg/ml] versetzt. Der TAE-Puffer ist aus 2M Tris-Acetat und 0,1M EDTA, pH 7,7 zusammengesetzt. Der Probenpuffer (*6xDilution Dye, Boehringer, Mannheim*), welcher der DNA-Probe zugesetzt wird, enthält neben Glycerin, welches das Auftragen in den Geltaschen erleichtert, einen Blaumarker, mit dessen Hilfe sich die Lauffront der DNA beobachten lässt. Das fertige Gel wird unter UV-Licht ($\lambda=312\text{nm}$) betrachtet. Dabei wird die Fähigkeit des Ethidiumbromids ausgenutzt, in die DNA-Moleküle zu interkalieren und diese durch Fluoreszenz sichtbar zu machen. Der Vergleich der Laufstrecke der DNA mit der eines gleichzeitig aufgetragenen Längenstandards (1kb- oder 100bp-Ladder, *Boehringer*)

ermöglicht die Abschätzung der Molekülgröße. Die Elution der gewünschten DNA-Fragmente erfolgt mit Hilfe des Jet Quick-Gel-Elutions-Kits® der Firma *Genomed*, Bad Oeynhausen.

2.1.6.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Aufreinigung von Nukleinsäurelösungen wird eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Die Zugabe von Phenol führt zur Dissoziation der Protein-Nukleinsäure-Komplexe (wie sie beispielsweise nach der Restriktion mit Endonukleasen vorliegen), indem Phenol mit den Aminosäureresten der Proteine hydrophobe Wechselwirkungen eingeht. Die Proteine werden denaturiert und reichern sich in der phenolischen Phase an, während die Nukleinsäuren in die wässrige Phase übergehen. Chloroform erleichtert die Phasentrennung und denaturiert die Proteine.

Zu der mit dH₂O auf 200µl aufgefüllten DNA-Lösung, werden 100 µl Phenol und 100 µl Chloroform hinzugefügt. Das Gemisch wird kräftig gemischt und für 3min bei 13.000upm zentrifugiert. Die obere Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführen und das gleiche Volumen an Chloroform zugegeben. Nach dem erneuten Vortexen und der wiederholten Zentrifugation (1min, 13.000upm), wird die obere Phase nochmals in ein neues Eppendorf-Tube überführt. Es erfolgen die Fällung und die Aufnahme der DNA in 20µl dH₂O.

2.1.7 DNA-Fällung

Zum Aufkonzentrieren von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen wird eine Fällung der DNA in Anwesenheit monovalenter Anionen mittels Ethanol oder Isopropanol durchgeführt. Diese Agenzien entfernen die Hydrathüllen, welche die Nukleinsäuren umgeben, und führen somit zum Ausfällen der DNA-Moleküle.

Die DNA-Fällung erfolgt durch die Zugabe von 2,5 Vol 96%-igem Ethanol oder 1Vol Isopropanol sowie 1/10 Vol Natriumacetat, pH 5.2 zu der DNA-Probe. Anschließend erfolgt die Zentrifugation für 30 min bei 13.000 rpm und 4°C. Der Überstand wird anschließend verworfen, und das Pellet mit 200µl eiskaltem 70%-igem Ethanol und erneuter Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm gewaschen. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird entweder luft- oder unter einer Trockenlampe getrocknet. Die Resuspension der DNA erfolgt in 20µl dH₂O.

2.1.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Der weitere Umgang mit der präparierten DNA erfordert deren Konzentrationsbestimmung. Hier bietet sich das vergleichende Abschätzen der DNA-Konzentration über Gelelektrophorese und die genauere photometrische Konzentrationsbestimmung an.

2.1.8.1 Konzentrationsbestimmung durch Gelelektrophorese

Die parallele Auftrennung der DNA zu einem Längenstandard (λ /*Hind*III von *GIBCO/BRL*, Eggenstein) ermöglicht, über den Vergleich der Intensität der Banden, eine Abschätzung der Konzentration.

2.1.8.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Messung der Extinktion (E) bei 260 nm ermöglicht ebenfalls die Bestimmung der DNA-Konzentration. Dazu wird 1 μ l der DNA-Probe mit 50 μ l dH₂O verdünnt und in die Messküvette gegeben. Von dem *Eppendorf*-Photometer RS 232 wird die Extinktion gemessen und die Konzentration unter Berücksichtigung der Verdünnung berechnet. Für eine Küvette mit 1cm Schichtdicke gilt für doppelsträngige DNA: 1E₂₆₀ entspricht [50 μ g/ml]

Dieser Berechnung liegt die folgende Formel zugrunde: OD₂₆₀ x 0,05xVerdünnung = x μ g/ μ l. Der ebenfalls vom Photometer angegebene Quotient E₂₆₀ /E₂₈₀ gibt Hinweise auf die Reinheit der DNA. Bei einer Extinktion von 280 nm wird die Proteinkonzentration bestimmt. Bei einem Quotienten von 1,8 kann daher von einer nahezu proteinfreien DNA-Lösung ausgegangen werden.

2.1.9 Manipulation der DNA-Moleküle

Die Klonierung von DNA-Fragmenten erfordert die entsprechende Restriktion der präparierten DNA. Die Ligation ermöglicht die Konstruktion rekombinanter DNA-Moleküle.

2.1.9.1 Restriktionsspaltung der DNA-Moleküle

Die enzymatische Spaltung der doppelsträngigen DNA-Moleküle an spezifischen Stellen erfolgt mit Hilfe der bakteriellen Typ II Endonukleasen. Diese erkennen spezifisch bestimmte Sequenz-Motive, an welche sie binden können, und spalten dort die gegenläufigen DNA-Stränge nach immer dem gleichen Muster. Eine Vielzahl spezifischer Schnittstellen kann den entsprechenden bakteriellen Endonukleasen zugeordnet werden.

Die Konzentration eines solchen Restriktionsenzym liegt meist bei 10U/ μ l. Eine Unit (1U) Enzym schneidet 1 μ g DNA pro Stunde (1 μ g/h). In einem Standard-Restriktionsansatz wird meist mit einem vierfachen Überschuss an Enzym gearbeitet. Der Enzym-spezifische Puffer

muss einfach in dem Restriktionsansatz vorliegen. Weiterhin darf der Glycerin-Gehalt in dem Reaktionsansatz nicht mehr als 10% betragen, da ansonsten die Aktivität der Enzyme beeinträchtigt wird.

2.1.9.2 Dephosphorylierung der 5'-Phosphatenden linearer DNA-Moleküle

Die linearisierten DNA-Fragmente werden unter anderem zur Ligation eingesetzt. Wird ein Plasmid mit nur einer Restriktionsendonuklease linearisiert, ergibt sich das Problem der Religation ohne den Einbau eines Inserts. Um dies zu verhindern, bedient man sich der so genannten ‚CIP-Behandlung‘. Dabei wird die 5'-Phosphatgruppe des linearisierten DNA-Fragments durch die alkalische Phosphatase entfernt. Die von der Ligase benötigte 5'-Phosphatgruppe, wird von dem entsprechenden Insert zur Verfügung gestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wird eine Phosphatase verwendet, die aus Kälberdarm gewonnen wird (*calf intestine phosphatase*, CIP; *Boehringer*, Mannheim). Die ‚CIP-Behandlung‘ kann direkt im Anschluss an einen Restriktionsverdau durchgeführt werden. Dazu gibt man 1µl der Phosphatase [1U/µl] zu dem Restriktionsansatz und inkubiert die Probe für 1h bei 37°C. Mit Hilfe der Phenol/Chloroform-Extraktion oder der Gelelektrophorese gewinnt man anschließend die gewünschten Fragmente, um sie zur Ligation einzusetzen.

2.1.9.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Nach dem Verdau mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen sind Moleküle mit kompatiblen Enden entstanden, die mit Hilfe der ATP-abhängigen T4-DNA-Ligase (*Boehringer*, Mannheim) verknüpft werden können. Um rekombinante DNA-Moleküle zu erhalten, muss auf ein bestimmtes Verhältnis von Vektor- zu Insert-DNA geachtet werden. Wenn möglich setzt man das Insert in einem 10-fachen molaren Überschuss ein. Teilweise wurde jedoch dazu übergegangen, gleiche Mengen (beispielsweise je 1µl Probe) der Vektor- und der Insert-DNA auf ein Agarosegel aufzutragen, um die Mengen abzuschätzen, und dann die Insert-DNA im dreifachen Überschuss bei der Ligation einzusetzen. In einem möglichst kleinen Reaktionsvolumen von 10-30µl, sollte zu Vektor und Insert-DNA 1µl der T4-Ligase [1U/µl] gegeben werden. Der entsprechende Ligase-Puffer (beides *Boehringer*, Mannheim) sollte einfach im Reaktionsgemisch vorliegen. Die Ligation erfolgt bevorzugt üN bei 16°C, ist aber auch für 1h bei 25°C möglich.

2.1.10 Herstellung der DNA-Konstrukte

2.1.10.1 *twip*::GFP-Aktin-Reporter-gen-Konstrukt

Das GFP-Aktin-Konstrukt liegt bereits in dem pUAST-Vektor vor (Verkhusha et al., 1999). Dazu wurde die GFP cDNA (*Quantum Biotechnologies*) ohne das Stopp-Kodon amplifiziert und in einem Leseraster mit der Aktin 5C cDNA (Fyrberg et al., 1981) in den pUAST-Vektor kloniert. Zur Klonierung in den pUAST-Vektor wurden 5' die *EcoRI* und 3' die *BglIII*-Schnittstelle verwendet. Die *BglIII*-Schnittstelle kann zur weiteren Umklonierung jedoch nicht mehr verwendet werden, da sie durch das Auffüllen der überhängenden Enden in eine glatte Schnittstelle umgewandelt wurde.

Um das *twip*::GFP-Aktin-Konstrukt herzustellen, wird die *twist*-Promotor (*twip*)-Sequenz über die *NotI* (5') und die *SpeI* (3') Restriktionsendonuklease in den pCaSpeR4-Vektor kloniert (Diplomarbeit, S. Schumacher). Zu Herstellung des *twip*::GFP-Aktin-Konstruktes wird dieser Vektor anschließend wieder mit *SpeI* geöffnet. Die kohäsiven Enden werden durch die Zugabe von dNTPs [1 mM] (*Invitrogen*) und dem Klenow-Enzym (*Roche*) wieder aufgefüllt. Parallel dazu wird der pUAST-Vektor, der das GFP-Aktin-Konstrukt enthält mit *EcoRI* geschnitten. Auch hier werden die kohäsiven Enden in stumpfe Enden umgewandelt. Anschließend wird das GFP-Aktin-Konstrukt mit *XbaI* herausgeschnitten. Auch der *twip*-pCaSpeR4-Vektor wird mit *XbaI* geschnitten, um das GFP-Aktin-Konstrukt zu klonieren. Die aufgefüllte *EcoRI*-Schnittstelle kann nun mit dem glatten Ende der *twip*-Sequenz ligieren, die durch die Restriktion mit dem *SpeI*-Enzym entstanden ist.

Diese Klonierungsschritte sind auch noch einmal schematisch in Abb. 2.1.11.1 dargestellt.

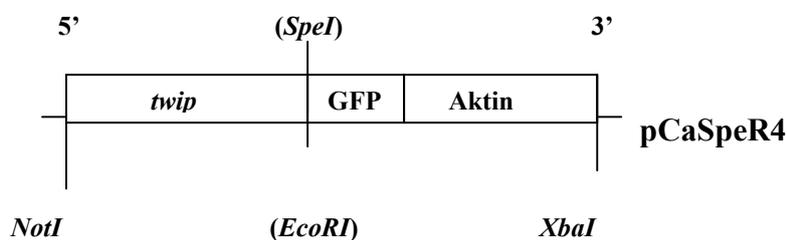


Abb. 2.1.11.1. Schematische Darstellung des *twip*::GFP-Aktin-Konstruktes im pCaSpeR4-Vektor.

2.1.10.2 Klonierung der *pbl* cDNAs

Um die verschiedenen *pbl* cDNAs als HA-markierte Konstrukte in *Drosophila* exprimieren zu können, werden die cDNAs mit einem HA-Epitop gekoppelt. Dieses Epitop wird von einem

spezifischen anti-HA Antikörper erkannt. Das HA-Epitop ist aus drei, sich wiederholenden HA-Sequenzen zusammengesetzt (Lecuit et al., 2002). Die HA-Sequenz liegt in einem pBS SK-Vektor vor. Diese Sequenz von ca. 100 bp wird zunächst über den Restriktionsverdau mit *XbaI* in den pUAST-Vektor kloniert. Die Orientierung des Konstruktes wird über die Sequenzierung mit pUAST-spezifischen Primern getestet. Die Sequenz des HA-Konstruktes im pUAST-Vektor ist in Abb. 2.1.10.2 dargestellt.

```

          EcoRI                               XbaI
GGG AAT TCG TTA ACA GAT CTC CGG CCG CGG CTC GAG GGT ACC TCT AGA TAC CCA TAC
G   N   S   L   T   D   L   R   P   R   L   E   G   T   S   R   Y   P   Y

GAT GTT CCT GAC TAT GCG GGC TAT CCC TAT GAC GTC CCG GAC TAT GCA GGA TCC TAT
D   V   P   D   Y   A   G   Y   P   Y   D   V   P   D   Y   A   G   S   Y

          XbaI
CAA TAT GAC GTT CCA GAT TAC GCT TCT AGA GGA
P   Y   D   V   P   D   Y   A   S   R   G

```

Abb. 2.1.10.2. HA-Sequenz in genomischer und Aminosäure-Sequenz im pUAST-Vektor. Die HA-Sequenz wurde über die *XbaI*-Schnittstelle in den pUAST-Vektor kloniert. Das dreifache HA-Epitop ist **fett** dargestellt. Zur Klonierung der *pbl* cDNAs wird die *EcoRI*-Schnittstelle genutzt.

Die *pbl* cDNAs werden wie in Abschnitt 2.1.1 beschrieben, über Reverse-Transkriptase auf embryonaler poly(A)⁺-mRNA amplifiziert und in den Topo-Vektor® kloniert (*Invitrogen*). Es ist von der Technik her einfach, die Konstrukte aus dem Topo-Vektor über die *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle in den pUAST-Vektor zu klonieren. Dies ist für die *pbl* cDNA A auch so durchgeführt worden. Das Konstrukt wurde auch sequenziert, jedoch nicht injiziert, da zeitgleich der HA-pUAST Vektor hergestellt wurde. Die *pbl* cDNA A wird zur Sequenzierung und zur Herstellung der mRNA-Sonde für den Northern-Blot und die *in situ*-Hybridisierung in den Topo-Vektor® kloniert. Die *pbl* cDNA A wurde bereits von einer anderen Forschergruppe als UAS-Konstrukt hergestellt (Prokopenko et al., 1999). Die *pbl* cDNA B wird zu schwach amplifiziert, um in den Topo-Vektor® umkloniert zu werden. Die *pbl* cDNA D wird hingegen etwas stärker amplifiziert. Doch nach der Gelelution ist die Konzentration zu gering, um zur Ligation eingesetzt zu werden. Daher wird die *pbl* cDNA D in zwei Fragmenten amplifiziert und in den Topo-Vektor kloniert. Die Primer sind so gewählt, dass die beiden Fragmente überlappen (Abb. 2.1.11.2). Beide Fragmente besitzen in dem überlappenden Bereich die *SpeI*-Schnittstelle. Da der Topo-Vektor® keine endogene *SpeI*-Schnittstelle enthält, kann sie zusammen mit der *EcoRI*-Schnittstelle genutzt werden, um beide Fragmente in den HA-pUAST-Vektor zu klonieren.

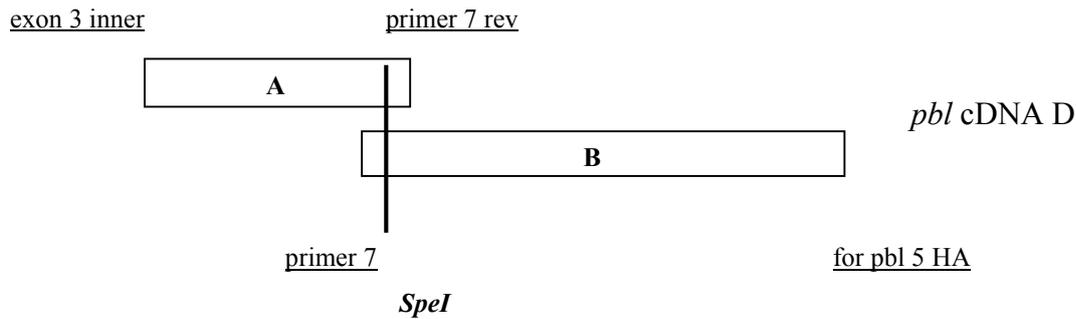


Abb. 2.1.11.2. Amplifikation der *pbl* cDNA D in zwei Teilfragmenten. Die Primer die zur Amplifikation der Teilstücke A und B verwendet wurden sind eingezeichnet. In der überlappenden Sequenz der beiden Teilstücke befindet sich die *SpeI*-Schnittstelle, die später zur Klonierung in den HA-pUAST-Vektor genutzt werden soll.

Bei der Klonierung in den HA-pUAST-Vektor muss darauf geachtet werden, dass die cDNA mit dem Leseraster der C-terminalen HA-Sequenz übereinstimmt. Daher werden zur Amplifikation der cDNAs, die in den HA-pUAST-Vektor kloniert werden sollen, 3'-Primer verwendet, die eine endogene *EcoRI*-Schnittstelle vor dem Stopp-Kodon besitzen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die *pbl* cDNAs A und C in den HA-pUAST-Vektor kloniert. Die Kontrolle, dass sich die cDNAs im richtigen Leseraster befinden, erfolgte über die Sequenzierung mit pUAST spezifischen Primern. Die das *pbl* A-HA-pUAST-Konstrukt wurde zur Injektion verschickt (Injektionsservice des EMBL, Heidelberg). Das *pbl* C-HA-pUAST-Konstrukt ist fertig zur Injektion. Die Primer, die zur Amplifikation der verschiedenen cDNAs verwendet wurden, sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Name	Klonierungs-Vektor	Sequenz (5'-3')	Schnittstelle	Funktion
358069	HA-pUAST	CGGAATTCGTAAGTGCAGAAGATC CATG	<i>EcoRI</i>	5'Primer für <i>pbl</i> A
<i>pbl</i> 5HA	HA-pUAST/ Topo®	CGGAATTCGCGTGGGTTGCACCG	<i>EcoRI</i>	3'Primer für <i>pbl</i> A, <i>pbl</i> C und Fragment B von <i>pbl</i> D
exon3in	HA-pUAST/ Topo®	GAAATGGAGTCAGGGGAGAAAAC		5'Primer für <i>pbl</i> C und Fragment A von <i>pbl</i> D
<i>pbl</i> 7 rev	Topo®	TATGGGCGCGGGGGCTGTTAC	-	3'Primer für Fragment A von <i>pbl</i> D
<i>pbl</i> 7 for	Topo®	ATCGCAGGCGGGGAAGAA	-	5'Primer für Fragment B von <i>pbl</i> D

Tab. 2.1.11.2. Primer zur Herstellung der *pbl* cDNA-Konstrukte.

2.1.10.3 Deletionskonstrukte

Zur Herstellung des Δ N-PBL-Konstruktes wird eine PCR-Reaktion auf dem EST-Klon durchgeführt, der die *pbl* cDNA A (SD01796) enthält. Der zur Amplifikation genutzte 3' Primer wird so gewählt, dass eine N-terminal trunke Version der *pbl* cDNA A entsteht. Die verwendeten Primer sind in der folgenden Tabelle aufgelistet. Der Primer pbl 327 bindet zwar noch vor der PEST-Sequenz, doch da sich das erste endogene Start-Kodon erst am 5' Ende der DH-Domäne befindet, wird ein Protein exprimiert, das die DH- und die PH-Domäne, sowie den C-Terminus von PBL enthält. Die verwendeten Primer besitzen einen Oligonukleotid-Überhang, in dem die Sequenz der *EcoRI*-Schnittstelle liegt (Tab. 2.1.11.3).

Name	Bindestelle	Sequenz	Schnittstelle
pbl 327	5' vor PEST	5'-CGGAATTCATCCAGCTGGAGGGTAC-3'	<i>EcoRI</i>
pbl 854	3' hinter Stopp	5'-TCGAATTCTCTA <u>AA</u> TGCGGCCCAACG-3'	<i>EcoRI</i>

Tab. 2.1.11.3. Primer die zur Herstellung des Δ N-PBL-Konstruktes verwendet wurden.

Der 5' Primer schließt das Stopp-Kodon von *pbl* ein (unterstrichene Sequenz).

Nach der Amplifikation wird das Fragment von ca. 1,6 kb in den pUAST-Vektor kloniert und durch Sequenzierung überprüft. Das Konstrukt wird anschließend, wie in Abschnitt 2.4 beschrieben, zur Herstellung transgener Fliegen eingesetzt.

2.2 Der Umgang mit RNA

2.2.1 RT-PCR

Für die Amplifikation der RNA ist es notwendig, die RNA zunächst in eine DNA umzuschreiben, da die Ausgangs-RNA nicht sofort als Matrize von der *Taq*-Polymerase genutzt werden kann. Dies geschieht in der so genannten Reversen Transkription, bei der RNA-abhängige DNA-Polymerasen genutzt werden, um zunächst eine komplementäre DNA, die cDNA herzustellen. In dieser Arbeit werden für die RT-PCR bereits sequenzspezifische Primer verwendet, die auf isolierter poly(A)⁺-mRNA eine entsprechende cDNA herstellen.

Die Methode der RT-PCR wird in dieser Arbeit genutzt, um die *pbl* Transkripte zu amplifizieren und um *pbl*-spezifische Sonden herzustellen, die für *in situ*-Hybridisierungen an Embryonen und Northern-Blot-Analysen eingesetzt werden. Da die RT-PCR prinzipiell jedoch eine schlechtere Gesamteffizienz als eine PCR aufweist, werden die Amplifikate, die zur Sequenzierung der *pbl* Transkripte dienen, noch durch eine weitere PCR amplifiziert. Dabei wird ein zweites Primerpaar verwendet, das weiter im Inneren des zu amplifizierenden Bereiches bindet. Werden zwei Primerpaare zur Amplifikation genutzt, spricht man auch von

einer verschachtelten, oder *nested* PCR. Die Primer, die in dieser Arbeit für die RT-PCR und die *nested* PCR eingesetzt wurden, sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Primer	Bindestelle	Sequenz (5'-3')	Funktion
pbl 7 for	5' in Exon 7	ATCGCAGGCGGGGGAAGA A	5' innerer Primer <i>nested</i> PCR/ Sonde <i>pbl</i> Exon 7
pbl 7 rev	3' in Exon 7	TATGGGCGCGGGGCTGTT AC	3' innerer Primer <i>nested</i> PCR/ Sonde <i>pbl</i> Exon 7
exon3out	5' in Exon 3	CCTCCGGCTAGATGTCTCA AC	5' äußerer Primer <i>pbl</i> RT-PCR
exon3in	5' in Exon 3 (inkl. ATG)	GAAATGGAGTCAGGGGAG AAAAC	5' innerer Primer <i>nested</i> PCR/ Sonde <i>pbl</i> cDNA A; <i>pbl</i> cDNA B,D
pbl 5	5' in Exon 1	TGTGTTTCCAGTTCTGTTG GTGTG	5' äußerer Primer <i>pbl</i> RT-PCR
358069	5' in Exon 1 (inkl. 1.ATG)	CGGAATTCGTAAGTGCAGA AGATCCATG	5' innerer Primer <i>nested</i> PCR; Sonde <i>pbl</i> cDNA A; <i>pbl</i> cDNA A,C
pbl 3	3' in Exon 13	CTGGTTGTGTTGTGAGATT ACGAA	3' äußerer Primer <i>pbl</i> RT-PCR
pbl 854	3' in Exon 13 (hinter Stop)	TCGAATTCTCTAAATGCGG CCCACAACG	3' innerer Primer <i>nested</i> PCR; Sonde <i>pbl</i> cDNA A; <i>pbl</i> cDNA A,B,C,D

Tab. 2.1.1. Primer die zur RT-PCR und zur *nested* PCR eingesetzt wurden. Die Primer wurden zur Amplifikation der *pbl* Transkripte und zur Herstellung der *pbl* spezifischen Sonden genutzt (siehe Funktion).

Die RT-PCR wird mit dem *One Step RT-PCR Kit*® (*Qiagen*, Hilden) durchgeführt. Als RNA-Matrize werden 150 ng poly(A)⁺-RNA eingesetzt, die aus Wildtyp-Embryonen-Lysat isoliert wurde (siehe Abschnitt 2.2.2). Um auch große *pbl* Transkripte amplifizieren zu können, wird die Verlängerungszeit am *Thermocycler* auf 6 Minuten eingestellt.

Zur Amplifikation der DNA, die später zur Herstellung der RNA-Sonden verwendet werden soll, wird eine Standard-PCR mit *Taq*-Polymerase (Roche) durchgeführt. Die *Taq*-Polymerase hängt automatisch die für die Topo®-Klonierung notwendigen Adenosin-Reste an das 3'-Ende der Transkripte. Die Amplifikate können daher direkt nach der Gelaufreinigung zur Topo®-Klonierung verwendet werden. Die DNA-Amplifikate, die zur Identifizierung der *pbl*-Transkripte dienen, werden in der Standard-PCR allerdings mit der *Pfu*-Polymerase amplifiziert, da die Konstrukte später noch in Fliegen exprimiert werden sollen, und daher möglichst fehlerfrei sein sollten.

2.2.2 RNA-Isolierung aus Embryonen

Zur Isolierung von poly(A)⁺-Embryonen werden Embryonen nach einer Entwicklungsdauer von 0-6 Stunden mit Natriumhypochlorit dechorionisiert und in Aliquots von 50 µl erst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -70°C aufbewahrt. Die Isolierung der mRNA aus den Embryonen erfolgt mit Hilfe des *µMACS mRNA Isolierungs Kits* der Firma *Miltenyi Biotec*, Bergisch Gladbach. Bei dieser Methode wird die poly(A)⁺-RNA magnetisch markiert und über Oligo (dT) gekoppelte Mikroperlen an speziellen MACS[®]-Säulen aufgereinigt. Bevor mit der Präparation der RNA begonnen wird, werden Mörser und Pistill mit Wasser und Ethanol gereinigt und bei -20°C vorgekühlt. Flüssiger Stickstoff wird immer nur in kleinen Mengen (am besten mit einem Löffel) während der Präparation zugegeben, um zu verhindern, dass das zerriebene Gewebe mit dem flüssigen Stickstoff aus dem Mörser spritzt. Ergänzend zum Protokoll, wird nach der Aufreinigung der isolierten mRNA noch 0.5 µl RNase-Inhibitor (*Boehringer*) zugegeben.

2.2.3 Denaturierendes RNA-Gel

Zur Auftrennung und Identifizierung von RNA benutzt man so genannte Denaturierende Gele. Das Formaldehyd in diesen Agarose-Gelen löst die Sekundärstrukturen der RNA und ermöglicht daher die Auftrennung der RNA Moleküle entsprechend ihrer Ladung.

Der Agaroseanteil variiert in den Gelen, je nach der Größe der zu erwartenden RNA Fragmente. In dieser Arbeit wird eine 1%ige (w/v) Agarose-Konzentration verwendet. Das Gießen der Formaldehyd-Agarose (FA)-Gele erfolgt unter dem Abzug, da Formaldehyd-Dämpfe giftig sind. Während der Arbeit sind Handschuhe zu tragen und es ist Vorsicht im Umgang mit den Chemikalien geboten.

Mini-Gel (10x14x0,7 cm): 51.3 ml dH₂O, 6 ml MOPS 10fach, 0.6 g Agarose

Die Gel-Lösung wird aufgekocht und nach dem Abkühlen auf 70°C werden 3,2 ml 37%iges Formaldehyd hinzu gegeben.

Als Elektrophorese-Puffer wird 1M MOPS (3-[N-morpholino]propansulfonsäure) verwendet. 10fach MOPS-Puffer: 0.2 M MOPS, 0.05 NaCl, 0.01 M Na₂EDTA (*Titriplex*). Der pH-Wert wird mit 10N NaOH auf 7.0 eingestellt. Der fertige Puffer wird anschließend autoklaviert (danach nimmt er eine gelbliche Farbe an).

Zur Probenvorbereitung wird sowohl die zu analysierende RNA, als auch der RNA-Längenstandard (*Promega*) mit deionisiertem Formamid und mit Formaldehyd behandelt, um Sekundärstrukturen zu lösen. Zu 3 µl RNA-Probe werden 5 µl deionisiertes Formaldehyd, 2 µl 37%iges FA, 1.5 µl 10fach MOPS und 1µl Ethidiumbromid einer [Stockkonzentration von 0.4 mg/ml] gegeben. Die Proben werden für 5 min bei 65°C erhitzt und anschließend auf Eis gelagert. Nach dem Abkühlen werden 3 µl RNA-Ladepuffer zu den Proben gegeben. Die Proben sind nun fertig zum Gelauftrag und werden bis dahin bei 4°C aufbewahrt.

Der Gellauf eines Mini-Gels erfolgt bei 80-100V (große Gele bei 140V) unter dem Abzug, bis das Bromphenolblau zu 2/3 durch das Gel gelaufen ist.

Inwieweit die Gesamt-RNA noch intakt ist, kann anhand der RNA Färbung unter UV-Licht beobachtet werden. Bei *Drosophila* erwartet man zwei scharfe Banden ribosomaler RNA. Die Bande der 28S rRNA sollte von der Intensität her, in etwa doppelt so stark sein, wie die 18S rRNA.

2.2.4 Konzentrationsbestimmung

Die Messung der Extinktion (E) bei 260 nm ermöglicht ebenfalls die Bestimmung der RNA-Konzentration. Dazu wird 1µl der DNA-Probe mit 100µl dH₂O verdünnt und in die Messküvette gegeben. Das *Eppendorf*-Photometer RS 232 misst die Extinktion und die Konzentration wird unter Berücksichtigung der Verdünnung berechnet. Für eine Küvette mit 1cm Schichtdicke gilt für einzelsträngige RNA, dass eine Einheit E₂₆₀ 40 µg/ml H₂O entsprechen. Die Reinheit der RNA kann aus dem Quotient von E₂₆₀ /E₂₈₀ abgeleitet werden. Der Wert sollte größer oder gleich zwei sein.

2.2.5 Northern-Blot-Analyse

Die ihrer Ladung entsprechend aufgetrennten RNA-Moleküle werden nun durch Kapillarkräfte auf eine Nitrozellulose/Nylon Membran übertragen. Die RNA kann anschließend durch Hybridisierung mit chemilumineszenten Sonden identifiziert werden und durch Photographie sichtbar gemacht werden. Da DNA-Blotting allgemein als Southern-Blotting, nach dem Begründer E.M. Southern, bezeichnet wird, hat sich in Analogie dazu der Terminus Northern-Blotting für RNA-Blotting Prozesse etabliert.

Als Blotting-Membran wird die Nylonmembran *Hybond N⁺* verwendet, da sie sich im Hinblick auf die folgende Chemilumineszenz-Reaktion gut bewährt hat. Im Umgang mit der Membran sind immer Handschuhe zu tragen. Als Transfer-Puffer wird der stark salzhaltige 20fach SSC-Puffer verwendet.

20xSSC: 3 M NaCl, 0.3 M Natrium-Citrat

Der pH-Wert wird mit NaOH auf 7.0 eingestellt. Die Lösung wird anschließend autoklaviert. Für ein 100 ml Gel sollte 1.2 l an 20fachem SSC-Puffer angesetzt werden.

Als Vorbereitung zum Northern-Botting, werden eine Nylon-Membran und zwei *Whatman*-Papiere 1mm länger, als jede Gelseite zurechtgeschnitten. Zusätzlich werden zwei *Whatman*-Papiere so zurechtgeschnitten, dass sie zwar so breit, wie das Gel sind, aber in ihrer Länge so weit überstehen, dass sie unter dem Gel den Boden der Schale berühren, in die der Laufpuffer gefüllt wird. Die Nylonmembran wird zunächst in dH₂O angefeuchtet. Anschließend werden die Nylonmembran und die *Whatman*-Papiere für 1-2 min in 20fachem SSC-Puffer inkubiert. Zum Aufbau des Northern-Blots wird eine Schüssel mit einem Liter 20fach SSC gefüllt. Eine Glasplatte wird quer über die Schüssel gelegt. Die *Whatman*-Papiere mit den überstehenden Rändern werden so auf die Glasplatte gelegt, dass die Enden in Kontakt zum Boden stehen. Luftblasen zwischen dem Filterpapier werden entfernt, indem man eine Glaspipette über die Glasplatte hin und her rollt.

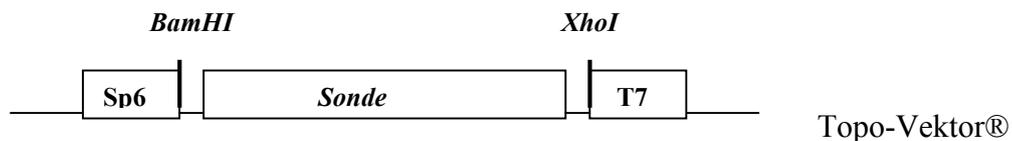
Direkt nach der Gelelektrophorese wird das Gel zunächst für 10 min in 200 ml dH₂O, dann für 15 min in 200 ml 0.05 M NaOH auf dem Taumler geschwenkt. Nun wird das Gel mit der Oberseite nach unten, auf dem Filterpapier platziert. Rings um das Gel werden *Parafilm*-Streifen gelegt. Sie sollen später sicherstellen, dass die Kapillarkräfte nur über das Gel und nicht von der Membran zum Blottingpapier verlaufen. Jetzt wird die inkubierte Nylon-Membran so auf das Gel gelegt, dass sie die gesamte Oberfläche bedeckt. Die Membran sollte nicht mehr verschoben werden, wenn sie einmal aufliegt. Luftblasen werden erneut durch das Auf- und Abrollen einer Glaspipette entfernt. Nun wird das getränkte *Whatman*-Papier auf die Nylon-Membran gelegt, und die Luftblasen erneut entfernt. Auf das Filterpapier wird ein etwa 15-20 cm hoher Stapel aus trockenen Papierhandtüchern gelegt. Es ist darauf zu achten, dass die Papiertücher nicht in Kontakt mit dem Transferpuffer kommen. Zum Beschweren wird eine Glasplatte aufgelegt, die ein Gewicht, beispielsweise eine Glasflasche, gefüllt mit einem Liter Wasser, trägt. Der Transfer erfolgt für 12-18 h bei RT.

Nach dem Transfer werden das Gewicht, die Papiertücher und die zwei Lagen Filterpapier entfernt. Das Gel wird zusammen mit der Nylonmembran, mit der Gelseite nach oben, auf ein trockenes Filterpapier gelegt. Mit einem Kugelschreiber, oder einem weichen Bleistift werden die Laufspuren des Gels, am besten unter Kennzeichnung der Markerspür, eingezeichnet. Das Gel wird von der Membran gelöst und verworfen. Nun wird die Nylon-Membran für 1 min in 100-200 ml 20fachSSC gewaschen.

Die Fixierung der RNA auf dem Blot erfolgt durch UV-Crosslinking. Dazu wird der Blot auf einem trockenen Filter in den UV *Stratalinker*TM2400 von *Stratagene* gegeben. Das *Crosslinking* erfolgt bei 120 mJ. Falls der Blot nicht sofort benötigt wird, kann er, in einer Plastikfolie verpackt, bei 4°C gelagert werden.

2.2.6 Herstellung DIG-markierter RNA-Sonden

Die DNA-Fragmente, die zur Herstellung der RNA-Sonden verwendet werden sollen, werden zunächst über PCR-Reaktionen auf der *pbl* cDNA, als *template* DNA, amplifiziert und mit Hilfe des *Topo-Klonierungs-Kits*® (*Invitrogen*, Groningen, Niederlande) in den *Topo-Vektor*® subkloniert. Zur Herstellung der markierten RNA-Sonden wird das *RNA-DIG-Labeling-Kit* von *Boehringer* verwendet.



Sonde	Probe	Enzym zur Linearisierung des Topo-Vektors	Promotor zur Amplifikation der RNA-Fragmente
<i>pbl</i> Exon 7	<i>sense</i> <i>antisense</i>	<i>XhoI</i> <i>BamHI</i>	Sp6-Promotor T7-Promotor
<i>pbl</i> cDNA A	<i>sense</i> <i>antisense</i>	<i>BamHI</i> <i>XhoI</i>	T7-Promotor Sp6-Promotor

Abb. 2.2.6. Verwendung des *Topo-Vektors*® zur Herstellung der DIG-markierten RNA-Sonden.

Zur Herstellung der RNA-Sonden dient die *pbl* cDNA A als Matrize, die über RT-PCR auf poly(A)⁺-RNA amplifiziert und in eine cDNA umgeschrieben wird. Eine anschließende PCR mit inneren Primern (*nested* PCR), erhöht die Produktausbeute (siehe Abschnitt 2.2.1). Für die PCR wird die *Taq*-Polymerase verwendet, da nicht auf eine fehlerfreie Amplifizierung geachtet werden muss, und da sie die nötigen Voraussetzungen für die Klonierung in den *Topo-Vektor*® mitbringt. Der *Topo-Vektor*® erlaubt die einfache Klonierung von DNA-Fragmenten, ohne vorherige Restriktion. Da die *Taq*-Polymerase automatisch den Poly(A)-Überhang an die Amplifikate knüpft, ist auch diese Voraussetzung erfüllt.

Die Klonierung der Amplifikate erfolgt entsprechend den Vorgaben des *Topo-Klonierungs-Kits*® (*Invitrogen*).

Zur Linearisierung der Vektor-DNA werden in einen Gesamtansatz von 30 µl, 5µg DNA, 20 U Enzym und der entsprechende Restriktionspuffer einfach eingesetzt und für 30 min bei

37°C inkubiert. Die Aufreinigung der DNA erfolgt über die Gelelution mit Hilfe des *Machery-Nagel-Kits*®.

Die *in vitro*-Transkription erfolgt mit Hilfe des *Boehringer-Kits*, entsprechend den dortigen Vorgaben. Pro Reaktion wird 1 µg der linearisierten Vektor-DNA eingesetzt. Die amplifizierte RNA wird anschließend mit 1 µl RNase-freier DNase (*Boehringer*) für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Fällung der RNA erfolgt unter Zugabe von 2 µl 0.2 M EDTA, 2.5 µl 4M LiCl und 75 µl 100%igem Ethanol üN bei -70°C. Am nächsten Morgen erfolgt die Zentrifugation für 30 min und 13.000 rpm bei 4°C. Die RNA wird mit kaltem 70%igen Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in 30 µl DEPC-Wasser (unter Zugabe von 0.5 µl RNase-Inhibitor (*Boehringer*)) gelöst. Zur Kontrolle der erfolgreichen *in vitro*-Transkription, wird ein RNA-Gel gefahren, bei dem 3 µl RNA-Probe aufgetragen werden.

2.2.7 Nachweis der Transkripte auf dem Northern-Blot

Zur einfacheren Handhabung werden alle Inkubationsschritte des Northern-Blots durchgeführt, indem er in eine Plastikfolie eingeschweißt wird. Zur Vorhybridisierung inkubiert man den Northern-Blot mit 15 ml der Hybridisier-Lsg. für 30 min bei 68°C im Wasserbad.

Hybridisier-Lsg.: 5x SSC, 50% deionisiertes Formamid, 0.1% (w/v) Na-Laurylsarcosin, 0.02% SDS, 2% Blockier-Lsg. (*Boehringer/Roche*) mit dH₂O auffüllen.

Zur Denaturierung wird die Sonde für 5 min bei 100°C inkubiert. Dazu werden 100 µl der späteren Hybridisier-Lsg. abgenommen und zusammen mit der Sonde in ein Reaktionsgefäß im Heizblock gegeben. Die Sonde soll später in einer Konzentration von 100 ng/ml in der Hybridisier-Lsg. eingesetzt werden. Man berechnet 1 ml Hybridisier-Lsg. auf 20 cm² Blot. Die Hybridisier-Lsg. wird auf 68°C vorgewärmt und zusammen mit der denaturierten Sonde üN bei 68°C inkubiert. Am nächsten Tag wird die Membran zwei Mal 5 min in je 50 ml 2x SSC/0,1% (w/v) SDS bei RT und zwei Mal 15 min in je 50 ml 0,1x SSC/0,1% (w/v) SDS bei 68°C gewaschen.

Zur Detektion der markierten Sonden wird die Membran in 10 ml Waschpuffer äquilibriert.

Wasch-Puffer: 100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl

Der pH-Wert wird auf 7.5 eingestellt. Anschließend werden 0.3% Tween-20-Lsg. zugegeben.

Anschließend wird die Membran auf dem Taumler für 1 h in 50 ml Blockier-Lsg. inkubiert.

Blockier-Lösung: 100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl. Der pH-Wert wird auf 7.5 eingestellt. Anschließend wird 1% Blockierlösung (*Böhringer/Roche*) zugesetzt.

Der HRP-markierte anti-DIG Antikörper (Roche) wird 1:10.000 in 30 ml Blockier-Lsg. verdünnt und 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wird zwei Mal 15 min mit Waschpuffer gewaschen. Für die Chemilumineszenz-Reaktion werden 3 ml POD-Substrat mit 30 µl Starter (*Böhringer/Roche*) gemischt und 10-15 min bei RT inkubiert. Parallel dazu wird in der Dunkelkammer die Quecksilberlampe angeschaltet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Lösung auf den Filter geträufelt und eine Minute inkubiert. Man lässt die Lösung anschließend vom Filter abtropfen. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgt in der Dunkelkammer.

2.2.8 *in situ*-Hybridisierung an Embryonen

Etwa 75 µl Embryonen werden mit 500 µl Xylol und mit 500 µl Ethanol für 30 min auf dem Taumler inkubiert. Im Anschluss daran wird 5 Mal mit Ethanol, zwei Mal mit Methanol und drei Mal mit PBT gewaschen. Die Fixierung der Embryonen erfolgt unter Zugabe von 5% Formaldehyd in PBS für 25 min auf dem Taumler. Nach fünfmaligem Waschen mit PBT findet die Proteinase K-Behandlung (4 µg/ml Proteinase K (*Böhringer Roche*) in PBT) für 8 min bei RT. Nach viermaligem Waschen mit PBT erfolgt die Nachfixierung für 25 min mit 5% FA in PBS. Es wird zunächst fünf Mal mit PBT, ein Mal mit PBT/Hybridisier-Lsg. (1:1) und dann drei Mal mit Hybridisier-Lsg. gewaschen.

Hybridisier-Lsg.: 5x SSC, 50% deionisiertes Formamid, 100 µg/ml denaturierte Lachsspermien-DNA (*Boehringer Roche*), 100 µg/ml Heparin, 0.1% Tween-20®

Die Vorhybridisierung erfolgt eine Stunde bei 55°C. Zur Hybridisierung werden 75 µl Embryonen mit 1-2 µl der RNA-Sonde versetzt und üN (> 12 h) bei 55°C inkubiert. Die RNA-Sonde wird zuvor in der Hybridisier-Lsg. für 5 min auf 65°C erhitzt, um die Sekundärstrukturen zu lösen.

Am nächsten Morgen werden die Embryonen über einen Zeitraum von 90 min vier Mal mit Hybridisier-Lsg. gewaschen. Anschließend wird einmal mit PBT/Hybridisier-Lsg. (1:1) und dann vier Mal über eine Stunde mit PBT gewaschen. Der im Folgenden verwendete anti-DIG

Antikörper ist mit einer alkalischen Phosphatase konjugiert, die später den Nachweis über die Spaltung der β -Galaktosidase ermöglicht. Der anti-DIG Antikörper wird in einer Verdünnung von 1:2000 in PBT eingesetzt und für 1 h inkubiert. Anschließend wird vier Mal für 15 min mit PBT gewaschen. Als Vorbereitung zur Färbereaktion mit der Alkalischen Phosphatase, wird drei Mal 5 min mit AP-Puffer gewaschen. Die AP-Reaktion erfolgt wie im Abschnitt Antikörperfärbung an Embryonen beschrieben. Die Einbettung der gefärbten Embryonen erfolgt in Araldit-Aceton (siehe Abschnitt 1.5.5.3).

2.3 Proteinchemische Verfahren

2.3.1 Isolierung von Proteinen aus Gewebe

Embryonen, die zur Protein-Isolierung verwendet werden sollen, werden dechorionisiert, mit kaltem PBT gewaschen und in 50 μ l Aliquots aufgeteilt. Falls man sie nicht sofort zur Präparation verwendet, werden sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -70°C aufbewahrt. Die Homogenisierung der Embryonen erfolgt auf Eis, unter Zugabe von 0.5 ml Lysis-Puffer pro Aliquot.

Lysis-Puffer: 25 mM Hepes pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2

Der Lysis-Puffer wird entsprechend angesetzt und autoklaviert. Vor Gebrauch des Lysis-Puffers werden 1% Triton-X-100 und die Protease-Inhibitoren zugegeben.

Protease-Inhibitoren: 1 μ M Pefabloc, 5 μ M Leupeptin, 1 μ M Pepstatin, 0.3 μ M Aprotinin

Die Embryonen werden mit dem Biovortexer (*Biospec Products*, Bartlesville, USA) drei Mal für 20 sec im fertigen Lysis-Puffer homogenisiert. Das Homogenisat wird anschließend zwei Mal für $\frac{1}{2}$ h bei 4°C zentrifugiert. Zwischendurch und nach der letzten Zentrifugation wird jeweils die proteinhaltige Interphase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Protein-Extrakte werden nun entweder experimentell verwendet, oder bei -70°C eingefroren.

2.3.2 Konzentrationsbestimmung

Zur Proteinbestimmung werden 800 μ l H_2O mit 200 μ l *RotiQuant* (*Roth*, Karlsruhe) gemischt und mit 2 μ l Embryonen-Lysat versetzt. Die Bestimmung der Optischen Dichte erfolgt bei OD_{595} . Die $\text{OD}_{595}=1$ entspricht ca. 1mg/ml Gesamtprotein.

2.3.3 Protein-Gele

Die Auftrennung der Proteine erfolgt entsprechend ihrer Größe, auf einem SDS-Gel. Ein Verfahren, das man auch als SDS-PAGE (SDS Polyacrylamid Gel Elektrophorese) bezeichnet. Im Rahmen dieser Arbeit wird der *Mini-Trans-Blot* der Firma *Biorad* (München) verwendet. Zunächst wird das Trenn-Gel gegossen. Man lässt es 30 min aushärten, bevor man das Sammel-Gel gießt.

Trenn-Gel (10%): 2.5 ml 30% Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1); 2,8 ml 1M Tris pH 8,8; 38 µl 20% SDS; 2,1 ml H₂O; 30 µl 10% APS; 8 µl TEMED

Sammel-Gel: 310 µl 30% Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1); 235 µl 1M Tris pH 6.8 , 10 µl 20% SDS , 1,3 ml H₂O , 10 µl 10% APS , 5 µl TEMED

2.3.4 Western-Blot-Analyse

Beim Western-Blot werden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran (*Schleicher und Schüll*, Dassel) übertragen. Der erfolgreiche Transfer wird durch eine Ponceau S-Färbung überprüft. Zur Detektion der Proteine wird die Nitrozellulose-Membran zunächst für 1 h in Blockier-Lsg. inkubiert.

Blockier-Lsg.: 1x TBST; 3% Milchpulver; 1% BSA

TBST: 1xTBS mit 0,2% Tween

Nun wird der erste Antikörper (rat- α -PBL, 1:1000) in der Blockier-Lsg. verdünnt und die Membran wird 1x auf dem Taumler geschwenkt. Am nächsten Tag wäscht man 4x 15 min in 1x TBST. Der Zweit-Antikörper wird ebenfalls in der Blockier-Lsg. angesetzt (goat- α -rabbit HRP, 1:10000). Man inkubiert die Membran darin für 2 h bei RT auf dem Taumler. Anschließend wird die Membran erneut 4x 15 min in 1x TBST gewaschen. Die Detektion des Proteins erfolgt durch die Chemilumineszenz-Reaktion (BM Chemiluminiscence Blotting Substrate, POD) der Firma *Boehringer/Roche Diagnostics*, Mannheim.

2.3.5 Herstellung von GST-Fusionsproteinen

Im Rahmen dieser Arbeit werden GST-Fusionsproteine zur Herstellung des DH-PBL-Konstruktes für das G unin-Nukleotid-Austausch-Experiment und für die Herstellung des PBL benötigt. Die Herstellung der GST-Fusionsproteine erfolgt über die Klonierung der DNA-Fragmente in den entsprechenden pGex-Vektor (*Amersham Biosciences*). Bei diesem Vektor handelt es sich um einen Expressionsvektor, mit dessen Hilfe die Proteine als GST-

Fusionsproteine in Bakterien exprimiert werden können. Die Herstellung der jeweiligen Fusionsproteine ist in den Abschnitten 2.3.7 und 2.3.8 beschrieben.

2.3.6 Induktion und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Nachdem die zu exprimierende DNA-Sequenz in einen pGEX-Expressionsvektor kloniert wurde, transformiert man das Konstrukt in chemokompetente *E. coli* M15 Bakterien. Diese werden in Aliquots von 100 µl bei -70°C aufbewahrt. Zur Transformation taut man ein Aliquot auf Eis auf. Es werden ca. 300 ng DNA zugegeben und für 20-30 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgt der Hitzeschock für 2 min bei 42°C im Wasserbad. Anschließend wird die Probe erneut für 5 min auf Eis inkubiert. Die Probe wird nun mit LB-Medium auf 1 ml aufgefüllt und für 40 min bei 37°C inkubiert. Anschließend werden 100 µl (10% Platte) und der Rest der Probe (abzentrifugieren, Überstand bis auf 100 µl verwerfen, Pellet darin resuspendieren) auf Agar-Platten mit Ampicillin und Kanamycin ausplattiert. Diese inkubiert man üN bei 37°C. Am nächsten Tag impft man mit einer Einzelkolonie 20 ml LB-Medium (mit Ampicillin versetzt) an und lässt die Kultur üN bei 37°C auf dem Schüttler anwachsen. Am nächsten Morgen nimmt man 500 µl der Kultur ab und verdünnt sie 1:1 mit Glycerin. Man mischt die Probe und friert sie bei -70°C ein, um fortan einen Glycerin-Stock der Bakterienkultur zu besitzen. Der Rest der Kultur wird auf eine $OD_{600} = 0,2$ mit LB-Medium, beispielsweise auf 110 ml, verdünnt. Man lässt die verdünnte Kultur auf eine OD_{600} von 0,6-1,0 nachwachsen. Nun nimmt man die Null-Probe (beispielsweise 10 ml ab), die genau wie die zu induzierende Probe weiterbehandelt wird. Zur Induktion wird die Kultur mit 0,1 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktosid) versetzt und für 3 h bei 30°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Zellen werden anschließend abzentrifugiert (10 min, 5000g). Der Überstand wird verworfen. Falls die Probe nicht sofort weiterverarbeitet wird, ist hier die Möglichkeit gegeben, das Pellet bei -20°C einzufrieren und zu einem späteren Zeitpunkt weiter zu arbeiten. Ansonsten wird zum Lösen des Pellets 1/20stel Volumen der Ausgangsmenge an PBS zugegeben. Das PBS wird zuvor mit den vier Protease-Inhibitoren (Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin, Pefabloc (jeweils [2µg/ml])) versetzt. Das Lösen der Pellets erfolgt auf Eis mit einer Glaspipette. Die resuspendierten Zellen werden nun durch Ultraschall aufgeschlossen (3x 40 Sekunden; Programm 51). Anschließend soll soviel Triton-X-100® zugegeben werden, dass es 10%ig in der Probe vorliegt. Falls die Proteine löslich sind, gehen sie nun in den Überstand. Dazu wird die Probe für 30 min bei RT auf den Taumler gegeben. Anschließend wird die Probe 15 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen. Zum Gelauftrag wird der Überstand mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt.

Um die erfolgreich Induktion zu kontrollieren, sollte bei obigem Ansatz eine Menge von 30 µl Überstand reichen. Auf das Pellet gibt man 200 µl 1x SDS-Probenpuffer (in PBS). Beide Ansätze werden für 5 min auf 95°C erhitzt. Anschließend werden die Proben kurz abzentrifugiert, bevor jeweils 20 µl auf ein Proteingel aufgetragen werden.

Falls sich das GST-Fusionsprotein gut in Bakterienzellen induzieren lässt, kann die Induktion in einem größeren Ansatz durchgeführt werden, um die Proteine nachher aufzureinigen. Bei einem großen Ansatz geht man beispielsweise von einer 500-600 ml Kultur aus. Diese Kultur wird am besten in Proben von 100 ml angesetzt. Die Induktion erfolgt entsprechend den obigen Angaben. Zu dem induzierten Überstand werden 20-30 µl GST-Beads (GSTTM4B, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) gegeben. Dabei handelt es sich Perlen, die mit Glutathion-Sepharose gekoppelt sind. Die Glutathion-S-Transferase (GST) der induzierten Fusionsproteine bindet an das GST. Die spätere Elution ermöglicht die Aufreinigung der Fusionsproteine. Die GST-Beads werden zusammen mit dem Überstand für 30-45 min bei RT auf dem Taumler inkubiert. Anschließend werden die Beads bei 1500 rpm für 5 min herunter zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen. Er kann später als Kontrolle verwendet werden, um zu sehen, ob die Bindung des Proteins an die Beads erfolgreich war. Die Beads werden nun mit 3x mit PBS gewaschen. Bei jedem Waschschrift werden 200 µl PBS zugegeben, 5 min im Kühlraum getaumelt und abzentrifugiert. Die Elution der Proteine erfolgt mit Elutionspuffer für jeweils 10 min auf dem Taumler. Der Überstand wird jeweils mit einer Spritze abgezogen.

Elutionspuffer: 50 mM Tris-HCl, 10 mM reduziertes Glutathion, pH 8

2.3.7 Herstellung von Immunsereen

Um die Lokalisation von PBL in immunhistologisch untersuchen zu können, wird ein anti-PBL Immunsereum hergestellt (*Eurogentec*, Seraing, Belgien). Das Fragment, das zur Immunisierung einer Ratte eingesetzt wird, wird zunächst über PCR auf dem *pbl* EST Klon (SD01796), der die *pbl* cDNA A enthält, amplifiziert. Anschließend wird dieses Fragment in den pGEX-Vektor (*Amersham Biosciences*) kloniert, um es als GST-Fusionsprotein aufzureinigen zu können (siehe Abschnitt 2.3.5 und 2.3.6). Die Primer die zur Amplifikation des *pbl* Epitops genutzt wurden, sind in der folgenden Tabelle 2.3.7 aufgelistet.

Name	Bindestelle	Sequenz (5'-3')	Schnittstelle	Funktion
358069	5'vor 1.ATG	CGGAATTCGTAAGTGCAGAAAGATCCATG	<i>EcoRI</i>	5'PBL-pGex
pbl 3	innerhalb DH	GGGAATTCCTGAACTGGACGG	<i>EcoRI</i>	3'PBL-pGex

Tab. 2.3.7. Primer zur Herstellung des anti-PBL Immunserums.

Mit diesen Primern wird ein Fragment von ca. 1,6 kb amplifiziert und über die *EcoRI*-Schnittstellen in den pGEX-4T-2-Vektor (*Amersham Biosciences*) kloniert. Das Protein wird aufgereinigt und zur Immunisierung einer Ratte an die Firma *Eurogentec* (Seraing, Belgien) geschickt. Im Rahmen dieser Arbeit wird nur die zweite Blutung zur Immunmarkierung eingesetzt.

2.3.8 Guanin-Nukleotid-Austausch-Experiment

Um das Substrat des PBL Guanin-Nukleotid-Austauschfaktors zu identifizieren, werden sechs *Drosophila* Rho GTPasen in einem *in vitro* GDT-GTP-Austausch-Experiment getestet.

Die sechs GTPasen (Rho1, RhoL, Cdc42, Rac1, Rac2 und Mtl1; Newsome et al., 2000) werden zunächst mit ³H-markiertem GDP beladen und zu dem GEF gegeben. Man misst vor und nach der Inkubation die Menge an gebundenem GDP durch dessen Radioaktivität. Dieser Wert gibt an, an welcher GTPase der GEF den Austausch von ³H-GDP durch GTP (unmarkiert) katalytisch fördert.

Die sechs Rho GTPasen (Rho1, RhoL, Cdc42, Rac1, Rac2 und Mtl1) (Newsome et al., 2000) und die erste GEF-Domäne von Trio wurden als GST-Fusionsproteine zusätzlich zum GST-Protein freundlicherweise von H.-M. Herz (ZMBH der Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Die DH-Domäne von PBL wurde auf der *pbl* cDNA im EST Klon SD01769 mit den folgenden Primern amplifiziert:

Primer	Sequenz	Schnittstelle
5DH GST EI	5'-GCCAAGAATTCGATGCGC-3'	<i>EcoRI</i>
pbl PH	5'-GTTGGAATTCACTTAATGCGCCGGACATCC-3'	<i>EcoRI</i>

Tab. 2.3.8. Primer zur Amplifikation der DH-Domäne von PBL zur Klonierung in den pGex-4T-3-Vektor.

Die Primer sind so konstruiert, dass sie einen 5'-Überhang besitzen, der eine interne *EcoRI*-Schnittstelle enthält (kursiv dargestellt). Der Einbau der Schnittstellen ermöglicht die Restriktion des Amplifikates (650 bp), das über Standard-PCR mit der *Pfu*-Polymerase (*Roche*) amplifiziert wird. Parallel dazu wird der pGEX-4T-3-Vektor mit der *EcoRI*-Restriktionsendonuklease geschnitten. Sowohl Vektor als auch Insert werden über Gelelektion aufgetrennt und mit dem *Machery-Nagel-Kit*® aufgereinigt. Die Ligation erfolgt mit der T4-

Ligase (*Fermentas*) für eine Stunde bei 22°C. Nach der Inaktivierung der Ligase bei 65°C (10 min) erfolgen die Phenol-Chloroform-Aufreinigung und die anschließende Transformation durch Elektroporation. Die Expression des GST-Fusionsproteins erfolgt wie in Abschnitt 1.3.4 beschrieben.

Bevor die GTPasen und die GEFs im Austausch-Experiment eingesetzt werden, erfolgt eine Dialyse, bei der eventuell enthaltene Mg^{2+} -Ionen durch EDTA ersetzt werden. Dieser Austausch verhindert, dass das GDP, das später gebunden wird, leicht von der dissoziiert. Es ist darauf zu achten, dass alle erforderlichen Geräte und Lösungen auch bei 4°C vorgekühlt werden. Den Dialyse-Puffer gibt man in ein Becherglas. Die Dialyse erfolgt in einem Röhrchen mit einem Nitrozellulosefilter (Kapazität max. 100 μ l). Dieses Röhrchen wird in einem Schwimmpad gesetzt, das auf Oberfläche des Dialyse-Puffers schwimmt. Das Becherglas wird mit einem Rührfisch versetzt und auf einen Rührgerät (300rpm) gestellt. Die Dialyse erfolgt zwei Mal für eine Stunde bei 4°C (nach einer Stunde wird der Dialyse-Puffer ausgetauscht).

Dialyse-Puffer: 50 mM Tris pH 7,5; 50 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1 mM DTT

Das Laden der GTPasen mit 3H -GDP erfolgt im Isotopenlabor! Dazu werden die GTPasen und die GEFs aus den Zentrikons in ein 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die GTPasen (0,2 μ M) werden zunächst mit [3H]GDP (426 GBq/mmol; *Amersham*) beladen. Dazu werden 17,5 μ g der GST-GTPase mit 3,5 μ l 3H -GDP in 45 μ l Austauschpuffer versetzt.

Austausch-Puffer: 50 mM Tris pH 7,5; 50 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1 mM DTT; 1 mg/ml BSA (wird vor dem Gebrauch zugesetzt).

Das Beladen erfolgt für 20 min bei RT im Isotopenlabor. Der Ladevorgang wird durch die Zugabe von 45 μ l Mg^{2+} -haltigem Puffer abgestoppt.

Stopp-Austausch-Puffer: 50 mM Tris pH 7,5; 10 mM $MgCl_2$; 1mM DTT

Die Zugabe von GTP-haltigem Puffer erfolgt durch die Verdünnung des Ansatzes mit 750 μ l eiskaltem Reaktions-Puffer.

Reaktions-Puffer: 50 mM Tris pH 7,5; 1 mM GTP; 2 mM $MgCl_2$

Daraus ergibt sich ein Gesamtvolumen von 840 µl beladener GTPase ergibt. Dieser Ansatz ist ausreichend für 20 Experimente. Die beladene GTPase sollte auf Eis gelagert werden. Die GTPase ist am stabilsten vor der Verdünnung mit dem Reaktions-Puffer. Erst einmal verdünnt, sollte sie so schnell wie möglich (in weniger als zwei Stunden) gebraucht werden.

Die Austausch-Reaktion wird für jeden Versuchsansatz für 20 min durchgeführt. Das Ausmaß an gebundenem ^3H -GDP wird zu einem Zeitpunkt $t=0$ min und $t=20$ min über den Auftrag auf einem Filter gemessen. Das durch die GEF-Aktivität gelöste ^3H -GDP wird vom Filter gewaschen. Die Austausch-Aktivität wird dann als Quotient aus dem Austausch nach 20 min durch den Austausch nach 0 min dargestellt.

Zur Austausch-Reaktion wird die ^3H -GDP-beladene GTPase zusammen mit dem Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor in GTP-freiem Reaktions-Puffer in einem Gesamtvolumen von 160 µl angesetzt. Sofort werden zwei Mal 40 µl von diesem Ansatz abgenommen und auf einen Nitocellulose-Filter (*Schleicher Schuell NC45 Membran-Filter 0,45 µm Ø 25 mm*) gegeben. Dieser wird zwei Mal mit 5 ml Stopp-Puffer gewaschen.

Stopp-Puffer: 50 mM Tris pH 7,5; 10 mM MgCl_2

Ungebundenes ^3H -GDP wird anschließend über eine Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die Filter werden auf einem Papier getrocknet. Nach einer Inkubationszeit von 20 min werden erneut zwei Mal 40 µl aus dem Reaktions-Ansatz entnommen, auf einem Filter aufgetragen, mit Stopp-Puffer gewaschen und über die Wasserstrahl-Pumpe abgesaugt. Nach dem Trocknen werden die Filter mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und das Maß an gebundenem ^3H -GDP wird am Szintillations-Gerät für eine Minute gemessen. Das Guanin-Nukleotid-Austausch-Experiment wurde zweifach durchgeführt. Die im Ergebnisteil angegebenen Daten beziehen sich auf den entsprechenden Mittelwert, der in beiden Versuchen als Quotient aus dem Messwert t_0 / t_{20} über Standard-Division berechnet wurde. Die Daten werden in eine *Excel*-Tabelle eingetragen und als Balkendiagramm dargestellt.

2.4 Die Herstellung transgener Fliegen

2.4.1 Keimbahntransformation von *Drosophila melanogaster*

Die Keimbahntransformation ermöglicht die Erzeugung transgener Fliegenstämme, die ein gewünschtes DNA-Konstrukt tragen und somit zur *in vivo*- Expression bringen können. Die Transformation gelingt mit Hilfe so genannter P-Elemente. Dabei handelt es sich um transponierbare Elemente, die in das Genom integrieren, aber auch herausgeschnitten und an

anderer Stelle erneut integriert werden können. Dieses geschieht mit Hilfe eines Enzyms, der Transposase, welche die flankierenden Bereiche des P-Elementes (die so genannten *inverted repeats*) erkennt und schneidet.

Die Fremd-DNA, welche in die Keimbahn integriert werden soll, kloniert man daher in entsprechende P-Element-Transformationsvektoren. Die MCS wird in diesen Vektoren bereits von den *inverted repeats* flankiert. Zusätzlich muss ein anderes Plasmid transformiert werden, das die Transposase zur Verfügung stellt. Man bezeichnet es daher auch als Helfer-Plasmid (pUCA Δ 2-3).

Zur Herstellung des Injektionsmixes werden 4 μ g P-Element-Transformationsvektor und 1 μ g Helfer-Plasmid (pUCA Δ 2-3) zusammen mit 1 μ l 10x Injektionspuffer (5 mM KCl, 0,1 mM Na-Phosphatpuffer, pH-Wert 6,8) und 1 μ l 2% Phenolrot in ein Reaktionsgefäß gegeben. Der Ansatz wird mit autoklaviertem dH₂O auf 10 μ l Gesamtvolumen aufgefüllt (d.h. Endkonzentration der Plasmid-DNA 400 bzw. 100ng/ μ l). Die Aufbewahrung des Injektionsmixes erfolgt bei -20°C.

Die Glaskapillaren aus Sodaklarglas (*Hilgenberg*, Malsfeld) werden mit Hilfe des Mikroelektrodenziehgerät *Sutter Instrument* Model P-97 (Programm: 32; Heat: 375; Vel: 30) gezogen. Anschließend entfernt man die geschlossene Spitze der Kapillare mit einer Rasierklinge und schleift sie mit Hilfe einer Schleifscheibe (*Bachofer*, Reutlingen) in einem Winkel von 35° scharf. Nach Einspannen in den *Leitz*-Mikromanipulator, wird 3S-Voltalef Fluorocarbon Öl (*Lehmann* und *Voss*, Hamburg) in die Nadel aufgezogen. In dem Injektionsmix vorhandene Schwebeteilchen müssen vor dem Füllen der Injektionsnadel abzentrifugiert werden (10 min bei 13.000upm). Zum Füllen der Nadel gibt man 2 μ l des Injektionsmixes auf ein silikonisiertes Deckglas (mit einem Tropfen Öl auf dem Objektträger befestigt) und zieht den Mix unter mikroskopischer Kontrolle auf. Anschließend bewahrt man die Nadelspitze bis zur Injektion in einen Tropfen 3S Öl auf.

Die Injektion der rekombinanten DNA erfolgt in w^- -Embryonen der Linie w^{1118} . Auf dem P-Element-Transformationsvektor ist ein w^+ -Gen lokalisiert, das bei der Integration in das Fliegen-genom zur Ausprägung einer rötlichen Augenfarbe (je nach Integrationsort) führt und somit als Selektionsmarker dient. Zur Integration der injizierten DNA in das Genom der Fliege, ist eine Keimbahntransformation erforderlich. Zu diesem Zweck erfolgt die Injektion der DNA in den posterioren Pol der Embryonen, denn dort findet die Bildung der Keimzellen statt. Es ist daher wichtig, dass die Injektion in Embryonen im Stadium des syncytialen Blastoderms erfolgt, in denen die Zellularisierung noch nicht stattgefunden hat. Dieses Stadium findet man ca. 1,5 h nach der Befruchtung (*Campos-Ortega* und *Hartenstein*, 1985).

In der Praxis werden w^- -Fliegen bereits zwei Tage vor Beginn der Injektion zur Eiablage auf beheizte Apfelsaft-Agarplatten gesetzt, die häufig gewechselt werden. Dadurch erreicht man eine synchrone Eiablage. Fliegen, deren Embryonen man zur Injektion verwenden will, werden für 10-20 min auf beheizte Apfelsaft-Agarplatten gesetzt. Die in diesem Zeitraum abgelegten Eier werden chemisch mit Natriumhypochlorit dechorionisiert (5 min in einem 1:1 Gemisch aus 17% Natriumhypochlorit und dH₂O). Nun werden die dechorionisierten Embryonen in der gleichen Orientierung parallel zueinander auf einem, mit Kleber bestrichenen Deckglas ausgerichtet, so dass das posteriore Ende zur Injektionsnadel hinweist. Der Kleber wird aus *tesa*-Packband (*Beiersdorf*, Hamburg) gewonnen, das zuvor einige Tage in Heptan eingeweicht und dann für 30 min abzentrifugiert wurde. In Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur lässt man die ausgerichteten Embryonen 5-10 min lang antrocknen, bis sie beim Entlangstreifen mit einer Präpariernadel Falten werfen. Anschließend fixiert man das Deckglas auf einem Objektträger und überschichtet die Embryonen mit 10S-Voltalef-Öl. Die Injektion erfolgt unter mikroskopischer Kontrolle mit Hilfe des vorbereiteten *Leitz*-Mikromanipulators. Das Einfließen des Injektionsmixes wird über die Mikrometerschraube kontrolliert. Sie sollte so eingestellt werden, dass der Injektionsmix erst beim Eindringen in den Embryo heraus fließt. Dies kann über den Phenolrot-Zusatz kontrolliert werden. Nach der Injektion werden die Embryonen auf dem Deckglas in 3S-Voltalef-Öl überführt und bis zum Schlüpfen bei 18°C in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Nach 2 Tagen werden die geschlüpften L1-Larven abgesammelt und bis zu 50 Individuen in ein beheiztes Röhrchen mit Futterbrei überführt, der zuvor etwas aufgelockert wurde. Dort werden sie bis zum Schlüpfen der adulten Fliegen bei 18°C gehalten.

2.4.2 Isolierung transgener Fliegen

Eine erfolgreiche Insertion der DNA in die Keimbahnstammzellen kann den geschlüpften ‚Gründertieren‘ (G₀) noch nicht angesehen werden. Daher wird jedes G₀-Tier gegen 3-5 Fliegen mit dem Genotyp $w/w; Gla/CyO$ (weißäugig mit zweitchromosomalem Balancer) gekreuzt. Bei einer erfolgten Keimbahntransformation finden sich unter den Nachkommen der G₀-Tiere (in der so genannten F1-Generation) rotäugige Tiere. Um eine Aussage über den Integrationsort des P-Elements auf den entsprechenden Chromosomen machen zu können und das P-Element dann auch balanciert halten zu können, sind weitere Kreuzungen gegen erst-, zweit- und drittchromosomale Balancerchromosomen erforderlich. Zu diesem Zweck werden die rotäugigen Nachkommen des G₀-Tieres (möglichst mit dem *CyO*-Balancer markierte F1-Männchen) jeweils gegen 3-5 Tiere mit dem Genotyp $w/w; Gla/CyO$ gekreuzt. Die in der

nachfolgenden F2-Generation auftretenden Phänotypen erlauben oftmals schon eine Aussage über den Integrationsort des P-Elements (siehe Tabelle 2.4.2).

Genotyp F1 Genotyp	F2-Fliege <i>CyO</i> , rot		F2-Fliege <i>Gla</i> , rot		F2-Fliege <i>Gla/CyO</i> , weiß		F2-Fliege <i>Gla/CyO</i> , rot		F2-Fliege <i>CyO</i> , weiß m w		F2-Fliege <i>Gla</i> , weiß m w		Insertions- ort
	m	w	m	w	m	w	m	w			m	w	
m, <i>CyO</i> ,r				X	X			X	X			X	1. Chr.
m, <i>CyO</i> ,r	X	X	X	X	X	X							2. Chr
m, <i>CyO</i> ,r	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	3. Chr.
w, <i>CyO</i> ,r													1./3.Chr.
w, <i>CyO</i> ,r	X	X	X	X									2. Chr.

Tab. 2.4.2. Tabelle zu einer ersten Bestimmung des P-Element-Insertionsortes am Beispiel von bestimmten Genotypen. (m = Männchen, w= Weibchen, r/rot = variabler Rot-Ton der Augenfarbe).

Etablierte Stämme, die homozygot nicht lebensfähig sind, werden balanciert gehalten. Im Falle von Mehrfachinsertionen wird versucht, diese zu trennen, auszukreuzen und zu etablieren.

2.5 Histologische Methoden

2.5.1 Antikörperfärbungen an Embryonen

2.5.1.1 Dechorionisierung

Um das Chorion, die den Embryo umgebende Eihülle, zu entfernen, werden die Embryonen zunächst mit 17% Natriumhypochlorit für 5 min dechorionisiert.

2.5.1.2 Fixierung

Anschließend werden sie gut mit dH₂O gewaschen und in einem Glasröhrchen, das ein 1:1 Gemisch aus 4ml Fixierlösung (4% FA in PBS) zu 4ml Heptan enthält, überführt. Darin werden sie für 20-25 min auf dem Taumler fixiert.

2.5.1.3 Hitze-Fixierung

Zur Hitze-Fixierung werden 4 ml einer 1x Triton-Salz-Lsg. in ein Szintillationsröhrchen gegeben und in einem Wasserbad in kochendem Wasser erhitzt. Der Deckel des Röhrchens sollte dabei nicht vollständig geschlossen sein.

10x Triton-Salz-Lsg.: 1 l dH₂O, 3 ml Triton®, 40 g NaCl

Die dechorionisierten Embryonen werden zusammen mit dem Metall-Netz, in dem sie zuvor gewaschen wurden, in die heiße Triton-Salz-Lsg. gegeben. Der Deckel wird schnell verschlossen. Die Embryonen werden in der Lsg. drei Mal über Kopf geschwenkt. Das Röhrchen wird geöffnet und mit kalter 1x Triton-Salz-Lsg. aufgefüllt. Man stellt die Triton-Salz-Lsg. am besten in einer Spritzflasche in den Kühlschrank. Nun wird das Metall-Netzchen mit einer Pinzette herausgefischt. Die Triton-Salz-Lsg. wird vorsichtig abgeschüttet, bis die Embryonen nur noch in einem kleinen Restvolumen auf dem Boden verbleiben. Die Devitellinisierung erfolgt in 3 ml Heptan und 3 ml Methanol und wird entsprechend dem Protokoll in Abschnitt 2.5.1.4 fortgesetzt.

2.5.1.4 Devitellinisierung

Zur Devitellinisierung der Embryonen wird anschließend die wässrige, untere Phase abgezogen und 4ml Methanol zugegeben. Das Gemisch wird für 30 sec kräftig geschüttelt. Anschließend sollten die devitellinisierten Embryonen absinken. Sie werden vom Boden abgesaugt und in ein *Eppendorf*-Gefäß überführt. Dort werden sie noch 2x mit Methanol gewaschen. In Methanol können die Embryonen bei -20°C gelagert werden, bis sie für Antikörperfärbungen verwendet werden.

2.5.1.5 Antikörper-Färbung

Dazu nimmt man dann das Methanol ab, und wäscht die Embryonen 3x 20 min in PBT. Danach werden sie 1h in 10%-igem NHS (Normales Pferde-Serum) in 1xPBT geblockt. Die Inkubation des ersten Antikörpers (in 10% NHS und 1xPBT) erfolgt üN bei 4°C auf dem Taumler. Am nächsten Morgen wird der erste Antikörper abgezogen. Es folgen drei Waschschritte für je 20 min. Anschließend erfolgt die Inkubation des zweiten Antikörpers (in 10%NHS in 1xPBT) für 2h bei RT auf dem Taumler (für Immunofluoreszenz-Färbungen empfiehlt sich die Abdunkelung des Reaktionsgefäßes). Danach wird die Antikörper-Lösung abgenommen und die Embryonen werden erneut 3x 20 min mit PBT gewaschen, bevor sie in Mowiol mit DABCO (Antibleichmittel; *Sigma-Aldrich*, Steinheim) eingedeckelt werden. Die Aufbewahrung der immunefärbten Präparate erfolgt bei 4°C.

Da die Aktinfilamente Methanol-empfindlich sind, wird abweichend zum obigen Protokoll das Entfernen der Vitellinmembran per Hand mit einer Glaskapillare durchgeführt. Die Fixierung der Embryonen erfolgt in *para*-Formaldehyd, da diese Substanz in Pulverform vorliegt, und direkt in PBS (ohne Methanolzusatz) gelöst werden kann. Zur Aktin-Färbung

mit Phalloidin-Rhodamin werden die Embryonen zunächst mit dH₂O gewaschen, mit Natriumhypochlorit dechlorionisiert und erneut gewaschen. Danach werden sie in eine Fixierlösung aus 4%igem *para*-Formaldehyd in PBS und Heptan (1:1) überführt. Die Fixierung erfolgt auf dem Taumler für 30-45 min. bei RT. In der Zwischenzeit wird doppelseitiges Klebeband in einer Petrischale vorbereitet. Nach Ablauf der Zeit werden die Embryonen mit einem Netzchen aus der Fixierlösung geholt und das Heptan abgeblottet. Nun werden die Embryonen zügig mit dem Pinsel auf das Klebeband übertragen und mit 1x PBT überschichtet. Die Embryonen werden mit einer Glaskapillare aus der Vitellinmembran entfernt und in einem *Eppendorf*-Gefäß mit 10% NHS/BSA in 1x PBT gesammelt. Zum ‚Blocken‘ werden sie für mindestens 1h in eine Lösung aus 0,5 % Triton-X-100® und 10% NHS in PBS gegeben. Falls an den Embryonen eine weitere Antikörpervermittelte Fluoreszenzfärbung durchgeführt werden soll, erfolgt diese entsprechend dem oben aufgeführten allgemeinen Protokoll. Ansonsten wird direkt zur Aktin-Färbung übergegangen. Dazu werden pro Ansatz 10µl der Phalloidin-Rhodamin-Lsg. in Methanol [300U/1,5ml Methanol] abgenommen. Die Zentrifugation in der Vakuum-Zentrifuge führt zum Verdampfen des Methanols. Die Resuspension des Farbstoffs erfolgt in 50 µl 1xPBS, womit die Färbereaktion für 2h bei RT auf dem Taumler durchgeführt wird.

2.5.2 Verwendete Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Primär- und Sekundär-Antikörper sind in den folgenden Tabellen 2.5.2a und 2.5.2b aufgelistet.

1.Antikörper	Verdünnung	Referenz
mouse- α - β -GAL	1:1000	<i>Promega, Madison USA</i>
rabbit- α - β -GAL	1:5000	<i>Cappel</i>
rabbit- α -TWI	1:1000	S. Roth, Köln
rat- α -PBL	1:500	<i>s. Abschnitt 2.3.7</i>
mouse- α -rat-CD2	1:500	<i>Biozol</i>
mouse- α -NRT	1:10	<i>DSHB</i>
Mouse- α -dpERK	1:100	<i>Sigma</i>
Mouse- α -EVE	1:50	<i>DSHB</i>
Rat- α - α Catenin	1:30	<i>Santa Cruz, Californien, USA</i>
Rat- α -DE-Cadherin	1:50	<i>Santa Cruz, Californien, USA</i>

Tab. 2.5.2.a Verwendete Primär-Antikörper

2.Antikörper / Phalloidin	Verdünnung	Referenz
goat- α -mouse Cy2	1:200	<i>Dianova</i>
donkey- α -rabbit Cy2/Cy5	1:200	<i>Dianova</i>
donkey- α -mouse Cy3	1:200	<i>Dianova</i>
Phalloidin-Rhodamin	pro Probe: 10 μ l der Stamm-Lsg. [300U/1,5ml Methanol]	<i>Eugene, Origon, USA</i>
goat- α -rabbit AP / HRP	1:800	<i>Dianova</i>
goat- α -mouse AP / HRP	1:800	<i>Dianova</i>
donkey- α -rabbit Biotin	1:200	<i>Camon, Wiesbaden</i>
donkey- α -mouse Biotin	1:200	<i>Camon, Wiesbaden</i>

Tab. 2.5.2.b. Verwendete Sekundär-Antikörper

2.5.3 AP-Färbung

Die AP-Färbung beruht auf dem Prinzip, dass die alkalische Phosphatase (AP) in einer enzymatischen Reaktion dazu in der Lage ist, 5-Brom-4-Chlor-indolylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT) nach der Phosphatabspaltung in einer gekoppelten Redox-Reaktion zu blauvioletten Präzipitaten umzuwandeln. Der sekundäre Antikörper muss daher mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt sein. Nach der Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper wäscht man die Embryonen 2 x 15 min mit PBT und dann 2 x 10 min mit AP-Puffer.

AP-Puffer: 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 0.1% Tween-20®.

Die Zugabe von 0,1% Tween-20 erfolgt erst kurz vor dem Gebrauch der AP-Puffer-Lösung.

Zur AP-Färbung wird 1 ml AP-Puffer mit 3,4 μ l BCIP und 3,0 μ l NBT versetzt und gemischt. Pro Färbung ist ein Reaktions-Volumen von 500 μ l ausreichend. Die AP-Färbelösung wird auf die Embryonen gegeben. Die Färbereaktion wird unter dem Binokular beobachtet. Das Abstoppen der Färbereaktion erfolgt mit PBT. Nachdem 3 x 10 min mit PBT gewaschen wurde, wird die Alkoholreihe (30 %, 50 %, 70 %, 95 %, 100 % Ethanol) für jeweils 5 min durchgeführt. Der letzte Schritt wird in 100% Aceton durchgeführt. Die Einbettung in Araldit erfolgt wie in Abschnitt 2.5.5 beschrieben.

2.5.4 HRP-Färbung

Die HRP-Färbung beruht auf dem Farbnachweis durch die enzymatische Farbreaktion der Meerrettich-Peroxidase (*horse radish peroxidase*; HRP) mit DAB (3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid, *Aldrich*, Steinheim) [1mg/ml], die zum Ausfall eines braunen Präzipitats

führt. In dieser Arbeit wird zur HRP-Färbung das Biotin-Avidin-Verstärkersystem (*Vectastain ABC Kit*) der Firma *Vector Laboratories* (Burlingame, CA) verwendet. Das Verstärkersystem beruht auf der Bindung von Peroxidase-gekoppeltem Biotin, an ein Avidin-Molekül. Die Bindestellen von Avidin werden durch das vorgegebene Verhältnis von Biotin zu Avidin nicht vollständig abgesättigt. Daher können biotinierte Avidin-Moleküle auch noch an den Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper binden. Das Peroxidase-vermittelte Signal um ein Vielfaches verstärkt.

Nach der Inkubation mit dem zweiten Antikörper werden die Embryonen 3 x 15 min mit PBT gewaschen. Nach dem ersten Waschschrift wird das AB-Verstärkergemisch angesetzt und 1/2 h bei RT vorinkubiert. Dazu gibt man auf 1 ml PBT 10 µl Lsg. A, mischt gut und gibt erst dann 10 µl der Lsg. B hinzu und mischt nochmals. Nach der Inkubationszeit gibt man das AB-Gemisch auf die Embryonen und gibt sie für eine 3/4 h bei RT auf den Taumler. Anschließend wird 3 x 15 min mit PBT gewaschen. Während dem letzten Waschschrift taut man das DAB (giftig!) auf, das bei -20°C gelagert wird. Zur HRP-Färbung mischt man DAB und PBS 1 zu 1 und gibt zu 1 ml dieses Reaktionsgemisches 2 µl 10%iges H₂O₂. Pro Färbung ist ein Volumen von 500 µl ausreichend. Nun wird die DAB-Färbelösung auf die Embryonen geben. Die Färbereaktion wird im Blockschälchen unter dem Binokular beobachtet. Dazu werden einige Embryonen mit einer abgeschnittenen gelben Spitze in ein Blockschälchen überführt. Läuft die Färbereaktion nur langsam ab kann man noch 1 µl Wasserstoffperoxid zugeben. Das Abstoppen der Färbereaktion erfolgt durch das Waschen der Embryonen mit PBT. Dazu überführt man sie erneut in 1,5 ml Reaktionsgefäße. Der DAB-Abfall gehört in den Giftabfall und muss entsprechend entsorgt werden.

Falls im Anschluss an die HRP-Färbung keine AP-Färbung mehr durchgeführt werden soll, wäscht man 3 x 10 min mit PBT. Dann führt man eine Entwässerungsreihe, die so genannte Alkoholreihe durch. Man beginnt mit 30 % und geht über 50 %, 70 % und 95 % bis hin zu 100 % Ethanol. Man wäscht jeweils 5 min. Im Anschluss daran wäscht man noch 5 min in 100 % Aceton. Dies dient der Vorbereitung auf die Einbettung in Araldit-Aceton. Die Embryonen werden wie in Abschnitt 2.5.5 beschrieben in Araldit eingebettet.

2.5.5 Einbettung in Araldit

Nach einer AP- oder HRP-Färbung werden die Embryonen in Araldit eingebettet. Um sie in der Gesamtansicht zu untersuchen, auf einem Objektträger und für Querschnitte in einem Blöckchen, das geschnitten werden kann. Auf die gefärbten Embryonen wird nach der

Alkoholreihe und der Inkubation in Araldit, ein 1:1-Gemisch aus Araldit-Aceton gegeben. Die Embryonen stellt man üN auf 4°C (nicht Schütteln!). Am nächsten Tag überführt man die Embryonen mit einer abgeschnittenen gelben Spitze auf einen Objektträger. Falls man bestimmte Regionen der Embryonen in der Gesamtansicht beobachten möchte, werden sie entsprechend mit einer Wimper orientiert. Sollen die Embryonen auch zur Herstellung von Querschnitten verwendet werden, werden sie in ein Förmchen überführt, das anschließend mit Araldit aufgefüllt wird. Bei 65°C verdampft das Aceton üN im separaten Heizschrank. Auf die Embryonen, die sich auf den Objektträgern befinden, wird nun Araldit gegeben. Nach dem Auflegen des Deckglases wird der Objektträger erneut üN in den Heizschrank gegeben. Die Araldit-Blöckchen sind nach spätestens zwei Tagen ebenfalls ausgehärtet und können mit dem *Reichert*-Michrotom *OmU2* in einer Schichtdicke von 5 µM geschnitten werden. Anzumerken ist noch, dass alle Gegenstände, die mit Araldit in Berührung gekommen sind (z.B. Handschuhe oder Spitzen) auch bei 65°C üN gebacken werden müssen. Anschließend können sie mit dem allgemeinen Abfall entsorgt werden!

Araldit (50 g): 27,175 g Durcupan Komponente A/M und 23,705 g Durcupan Komponente B werden zusammen 1 Stunde über Kopf geschüttelt. Dann gibt man 1,75 g Durcupan Komponente C und 1,00 g Durcupan Komponente D hinzu und schüttelt noch mal 1 Stunde über Kopf.

2.5.6 Einbettung in Technovit

Die Einbettung in Technovit ermöglicht es, Querschnitte von fluoreszenzgefärbten Embryonen herzustellen. Es ist möglich, die Embryonen zunächst einer AP-Färbung zu unterziehen, um beispielsweise homozygote Embryonen von heterozygoten Embryonen zu trennen. Im Anschluss daran, werden die Embryonen noch einmal nachfixiert (für eine Phalloidin-Färbung in 8% PFA in PBS für 10 min, sonst in 4% FA in PBT für 20 min).

Nun werden die Embryonen 3 x 10 min in PBT gewaschen. Nach der Entwässerungsreihe in 30%, 50%, 70%, 96%, 100% Ethanol für jeweils 5 min, erfolgt die Präinfiltration. Dazu wird eine 1:1 Gemisch aus EtOH:Technovit-Infiltrationslsg. (ohne Starter) zu den Embryonen gegeben und für 30 min bei RT zu auf dem Schüttler inkubiert. Die Lösung wird durch 100% Infiltrationslsg. (ohne Starter) ersetzt und noch mal für 30 min RT auf dem Schüttler inkubiert. Die 100%ige Infiltrationslsg. (ohne Starter) wird erneuert, und die Embryonen

werden üN bei 4°C auf dem Schüttler gelagert. Parallel werden die Vorbereitungen für die Einbettung getroffen.

Weißer Förmchen werden mit Metallbügeln bestückt. In diese werden pro Einbettungskammer 1,5 ml Infiltrationslösung (mit Starter) eingefüllt. Auf 1 ml Infiltrationslsg. (4°C) kommen 66µl Starter (RT). Die Lösung sollte zügig eingefüllt werden, damit sie nicht schon vorher polymerisiert. Man lässt sie üN bei RT (vor Staub geschützt) auspolymerisieren.

Am nächsten Tag schneidet man *Parafilm*-Stücke aus, die das ganze Förmchen bedecken. Die Embryonen werden mit einer abgeschnittenen gelben Spitze in die vorpolymerisierten Förmchen überführt (jedem Stadium sollte ein eigenes Förmchen zugeordnet werden). Die Embryonen werden nebeneinander in der Form orientiert (möglichst nah am Rand und zentriert). Für jede Form wird einzeln 2,5 ml Infiltrationslösung mit Starter (66µl/ml) vorbereitet. Man lässt die 2,5 ml Infiltrationslsg plus Starter langsam in das Förmchen fließen. Die Förmchen werden mit einem Stück *Parafilm* abgedeckt. Diesen Vorgang wiederholt man für alle Förmchen. Wenn alle Embryonen eingebettet sind, wird die Form das üN auf 4°C gestellt.

Am nächsten Tag wird das *Technovit*-Blöckchen mit Hilfe einer Zange und dem Metallbügel aus der Form geholt und in eine Trocknungskiste überführt. Die Kiste bleibt auf 4°C bis das *Technovit* geschnitten wird.

Die *Technovit*-Blöckchen werden mit einem *Reichert Jung*-Mikrotom geschnitten. Die 7µm dünnen Schnitte werden anschließend für 20 min in 50mM DABCO in PBS inkubiert und dann in MOWIOL/DABCO eingedeckelt.

2.6 Genetische Methoden

2.6.1 Fliegenzucht

Die Haltung der Fliegen erfolgte im Wesentlichen wie von Ashburner (Ashburner et al., 1990) beschrieben auf Maisstandardmedium bei 18°C, RT und 25°C. Eiablagen werden auf Apfelsaft-Agarplatten angesetzt, die zur Stimulation der Eiablage mit Hefe versehen wird.

Das Standardmedium besteht aus den folgenden Komponenten:

356g Maisschrot, 47,5g Sojamehl, 84g Trockenhefe, 225g Malzextrakt, 75ml 10% Nipagin, 22,5ml Propionsäure, 28g Agar, 200g Zuckerrübensirup und 4,9l dH₂O.

2.6.2 Fliegenstämme, Chromosomen und Allele

In den folgenden Tabellen sind die, in dieser Arbeit verwendeten Fliegenstämme (Balancer-Chromosomen und mutante Fliegenstämme) zusammengefasst.

Chromosom	Bezeichnung	Bemerkung	Referenz
1.	<i>w¹¹¹⁸</i>	Oregon R	Lindsley und Zimm, 1992
1.	<i>FM7</i>	Balancer-Chromosom	Lindsley und Zimm, 1992
2.	<i>CyO</i>	Balancer-Chromosom	Lindsley und Zimm, 1992
2.	<i>Gla</i>	Balancer-Chromosom	Lindsley und Zimm, 1992
	<i>If</i>	Balancer-Chromosom	Lindsley und Zimm, 1992
3.	<i>TM3</i>	Balancer-Chromosom	Lindsley und Zimm, 1992
3.	<i>TM3</i> <i>P[ftz::lacZ]</i>	TM3-Balancer mit P-Element, das β -Gal unter der Kontrolle des <i>ftz</i> -Promotors exprimiert	Lindsley und Zimm, 1992
3.	<i>TM6b</i>	Balancer-Chromosom	Lindsley und Zimm, 1992
3.	<i>MKRS</i>	dominanter Marker	Lindsley und Zimm, 1992
3.	<i>htl^{AB42}</i>	Punktmutation	Gisselbrecht et al., 1996
3.	<i>UAS::λhtl</i>	Konstitutiv aktive Form von <i>htl</i> unter UAS Kontrolle	(Greig und Akam, 1993)
3.	<i>UAS::htl^M</i>	cDNA von <i>htl</i> unter UAS Kontrolle	(Michelson et al., 1998a)
3.	<i>stg^{7M}</i>	Punktmutation im <i>stg</i> Gen	Tearle und Nüsslein-Volhard, 1987
3.	<i>pbl¹</i>	Punktmutation im <i>pbl</i> Gen	Tearle und Nüsslein-Volhard, 1987
3.	<i>pbl³</i>	Punktmutation im <i>pbl</i> Gen	Tearle und Nüsslein-Volhard, 1987
3.	<i>pbl⁵</i>	Punktmutation im <i>pbl</i> Gen	Rob Saint, Canberra, Australien
3.	<i>pbl^{11D}</i>	<i>pbl</i> Allel	Tearle und Nüsslein-Volhard, 1987
3.	<i>pbl^{NR}</i>	Defizienz (3L)	Tearle und Nüsslein-Volhard, 1987
3.	<i>pbl^{E091}</i>	<i>pbl</i> Allel	Christian Klämbt, Münster
3.	<i>pbl^{E312}</i>	<i>pbl</i> Allel	Christian Klämbt, Münster
3.	<i>pbl^{E315}</i>	<i>pbl</i> Allel	Christian Klämbt, Münster
3.	<i>UAS::pbl^{3.2}</i>	<i>pbl</i> cDNA A unter UAS-Kontrolle	Prokopenko et al., 1999
2.	<i>twi::CD2</i>	<i>CD2</i> -Transgen aus der Ratte unter der Kontrolle des <i>twist</i> -Promotors	(Dunin-Borkowski und Brown, 1995)
2.	<i>twi::Gal4</i>	Mesodermaler Treiberstamm	Ranganayakulu et al., 1996
2.	<i>Dmef2::Gal4</i>	Mesodermaler Treiberstamm	Ranganayakulu et al., 1996
3.	<i>UAS::Rho1^{N19}</i>	Dominant negative Form von Rho1	M. Mlodzik, New York, USA
3.	<i>UAS::Ras^{V12}</i>	Konstitutiv aktive Form von Ras1	M. Mlodzik, New York, USA

Tab. 1.6.2. Verwendete Fliegenstämme

2.7 Abkürzungen

α -...	anti-...
AS	Aminosäure
Abb.	Abbildung
Bal.	Balancer-Chromosom
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	kodierende DNA
Chr.	Chromosom
dest.	destilliert
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
E_{xxx}	Extinktion bei xxx nm Wellenlänge
FGF	Fibroblasten-Wachstums-Faktor
FGFR	Fibroblasten-Wachstums-Faktor-Rezeptor
GEF	Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor
h	Stunden
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
Konz.	Konzentration
Lsg.	Lösung
m...	milli...(10 ⁻³)
M	Molarität (mol/l)
MAPK	Mitogen-Aktivierte-Protein-Kinase
MCS	multi-cloning-site (Polylinker)
min	Minuten
μ ...	mikro...(10 ⁻⁶)
mRNA	messenger-RNA
n...	nano...(10 ⁻⁹)
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
Prom.	Promotor
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
sec	Sekunden
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
Temp.	Temperatur
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit
UV-Licht	ultraviolettes Licht
üN	über Nacht
V	Volt
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel

3 Ergebnisse

3.1 Zellformveränderungen während der mesodermalen Zellwanderung im *Drosophila* Embryo

Die Mesodermzellen breiten sich nach der Invagination als ein einschichtiges Gewebe auf dem Ektoderm aus. Es sind zwei Modelle vorstellbar, die eine solche Ausbreitung ermöglichen. Zum einen ist es vorstellbar, dass die Affinität der Mesodermzellen zum Ektoderm größer ist, als untereinander. Dies würde zu einer flächenförmigen Ausbreitung der Mesodermzellen auf dem Ektoderm führen. Die andere Möglichkeit ist eine gerichtete Zellwanderung der Mesodermzellen, die aufgrund eines richtungweisenden Signals erfolgt. In diesem Fall sollten die Mesodermzellen während der Ausbreitung eine charakteristische Zellform annehmen, die durch die Ausbildung von Zellfortsätzen und die Zellstreckung gekennzeichnet ist. Um das Verhalten des Mesoderms während der Ausbreitung auf der zellulären Ebene verfolgen zu können, werden Embryonen untersucht, die das membranlokalisierte CD2 Protein spezifisch im Mesoderm exprimieren. Zu diesem Zweck wurde das *CD2* Transgen aus der Ratte unter die Kontrolle des *twi* Promotors gestellt (*twip::CD2*) (Dunin-Borkowski und Brown, 1995). Die Expression des TWI Proteins erfolgt bereits in prä-mesodermalen Zellen und wird während der Mesoderm-Ausbreitung aufrechterhalten (Leptin, 1991). Daher ist die Expression des *CD2* Transgens unter der Kontrolle des *twi* Promotors ein gutes Hilfsmittel, die Gestalt der Mesodermzellen zu beobachten.

Die Ausbreitung der Mesodermzellen lässt sich mit Hilfe dieser Marker in drei Phasen charakteristischer Zellformveränderungen unterteilen (Abb. 1). Nach der Invagination bildet das Mesoderm eine röhrenähnliche Struktur aus epithelialen Zellen (Abb. 1A,D). In diesem Stadium, welches dem Gastrulationsstadium 7 entspricht, sind im Querschnitt Kontaktpunkte zwischen Mesoderm und Ektoderm erkennbar (Abb. 1A). Wie in der lateralen Ansicht zu sehen ist, besitzen die Mesodermzellen eine abgerundete, glatte Zellform (Abb. 1D). Nachdem die epitheliale Röhre aus Mesodermzellen zerfallen ist, und die Mesodermzellen Mitosen durchlaufen haben, werden im Stadium 8 der Embryonalentwicklung Zellausstülpungen sichtbar, die in dorsolaterale Richtung weisen (Abb. 1B,C). In dieser zweiten Phase der mesodermalen Zellwanderung breitet sich das Mesoderm in Form eines Zellaggregates auf der Innenseite des Ektoderms aus. Dabei bilden nicht nur die führenden

Zellen, das heißt, die am weitesten dorsal gelegenen Zellen, solche polarisierten Fortsätze aus, sondern auch die direkt nachfolgenden Zellen. Diese filopodalen and lamellipodalen Zellfortsätze erreichen eine Länge von 10-15 µm in fixierten Proben, was dem Durchmesser einer Mesodermzelle zu Zwei-Dritteln beziehungsweise zur Hälfte entspricht. Die Zellform erscheint zu diesem Zeitpunkt ebenfalls in laterale Richtung gestreckt, was den Eindruck einer aktiven, gerichteten Zellwanderung in der zweiten Phase der Ausbreitung des Mesoderms unterstützt. Diese Dynamik ist während des gesamten Ausbreitungsprozesses zu beobachten. Erst im späten Stadium 9 der Gastrulation, zu einem Zeitpunkt, an dem das Mesoderm sich einschichtig auf dem Ektoderm ausgebreitet hat, nehmen die Mesodermzellen erneut eine abgerundete Zellform an, und die Ausbildung von Zellfortsätzen unterbleibt (Abb. 1C,F). Dies entspricht der dritten Phase der mesodermalen Zellausbreitung, in der die Mesodermzellen ihre Endposition erreicht haben und nun zu viszeralen, somatischen und kardialen Vorläuferderivaten innerer Organe differenziert werden.

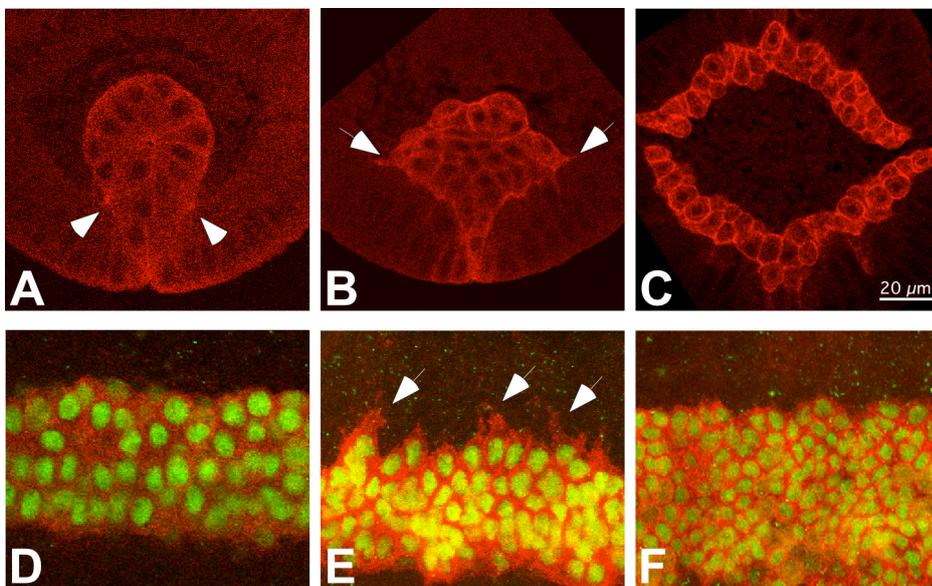


Abb. 1. Die drei Phasen charakteristischer Zellformveränderungen während der Mesoderm-Migration. Wildtyp-Embryonen, die *twi::CD2* exprimieren werden mit anti-CD2 Antikörpern (rot) und anti-TWI Antikörpern (grün) gefärbt und entweder als Querschnitte (A-C) oder in der Ganzkörperansicht eines Embryos nach der optischen Sektionierung durch konfokale Mikroskopie (D-F) gezeigt. (A,D) Phase 1; Kontaktpunkte der epithelialen Röhre zum Ektoderm sind in A mit Pfeilköpfen markiert. (B,E) Phase 2; laterale Zellfortsätze sind in B und E mit Pfeilen markiert. (C,F) Phase 3.

Die Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien ermöglicht vielen embryonalen Zellen die Wanderung auf einem Substrat. Diese temporären Zellausstülpungen enthalten gebündelte Aktinfilamente als Grundgerüst. Um zu klären, ob die Zellformveränderungen der Mesodermzellen auch auf der Umgestaltung des Aktinzytoskeletts beruhen, wird letzteres während der Zellwanderung genauer untersucht.

Zunächst wird daher eine Aktinfärbung mit Phalloidin durchgeführt. Das Pilzgift Phalloidin bindet an F-Aktin und verhindert dessen Depolymerisation. Durch die Kopplung mit einem Fluoreszenzfarbstoff, können die Aktinfilamente sichtbar gemacht werden. Die Untersuchung des Aktinzytoskeletts zeigt, dass die Mesodermzellen in Phase 1 und 3 von einer Aktinhülle gesäumt werden. In der zweiten Phase der Mesoderm-Migration ist dieses kontinuierliche Muster an der lateralen Zellfront unterbrochen. Es erscheint, als ob es an den Kontaktpunkten der Zellausläufer zum Ektoderm zu einer Anhäufung des Aktins kommt (Abb. 6D). Da innerhalb der Zellfortsätze jedoch keine gerichteten Aktinbündel sichtbar sind, wird zur Untersuchung des Aktinzytoskeletts ein weiteres Transgen genutzt, das Aktin als grün fluoreszierendes Fusionsprotein (green fluorescent protein, GFP) unter der Kontrolle des *twi* Promotors exprimiert (*twi::actin-GFP*). Wie die Abbildung 2 zeigt, lassen sich mit Hilfe des Aktin-GFP-Reportergenkonstruktes ebenfalls die charakteristischen Zellformveränderungen beobachten, wie sie auch schon mit dem *CD2*-Transgen gezeigt wurden. Die Expression des GFP markierten Aktins erfolgt zytoplasmatisch und ist sowohl in den abgerundeten Zellen in Phase 1 und 3, als auch in den Zellfortsätzen in Phase 2 der Mesoderm-Migration sichtbar (Abb. 2A-C). Die mesoderm-spezifische Expression des Aktin-GFP-Reportergenkonstruktes unterstützt somit die Beobachtungen charakteristischer Zellformveränderungen, zeigt jedoch keine gerichteten Aktinfilamente innerhalb der Zellfortsätze. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Aktinfilamente durch die Fixierung zerstört werden.

Dieses Konstrukt hat jedoch den Vorteil, dass es zur Lebendbeobachtung von Embryonen unter dem Fluoreszenzmikroskop genutzt werden kann. In Zukunft wird es mit Hilfe von diesem Aktin-GFP-Konstrukt möglich sein, die Wanderung der Mesodermzellen und die damit verbundene Veränderung der Zellgestalt während der Wanderung verfolgen zu können.

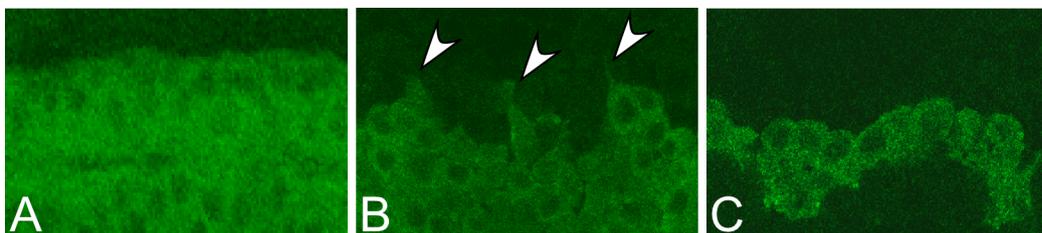


Abb. 2. Zellformveränderungen sind mit der Umorganisation des Aktinzytoskeletts verbunden. Embryonen, die das *twip::GFP*-Aktin Konstrukt exprimieren, werden fixiert und unter dem Konfokalen Mikroskop betrachtet. (A) Phase 1. (B) Phase 2; aktinreiche Zellfortsätze sind durch Pfeilspitzen markiert. (C) Phase 3.

Die Untersuchungen der Ausbreitung des Mesoderms auf der zellulären Ebene ermöglichen somit eine Unterteilung dieses Prozesses in drei Phasen charakteristischer Zellformveränderungen. In der ersten Phase wird der Kontakt vom Mesoderm zum Ektoderm hergestellt, die Zellen der invaginierten Röhre zeigen eine abgerundete Gestalt. In der zweiten

Phase verändert sich die Zellgestalt. Die Zellen strecken sich in lateraler Richtung aus und bilden gerichtete Zellfortsätze. Beide Zellformveränderungen sind charakteristische Zeichen einer gerichteten Zellwanderung. Erst wenn die Mesodermzellen ihre laterale Endposition erreicht haben, nehmen sie erneut die abgerundete Zellform an. Es scheint sich bei der Ausbreitung des Mesoderms auf dem Ektoderm somit tatsächlich um einen gerichteten Wanderungsprozess zu handeln.

3.2 Funktion des FGF-Rezeptors HTL in der ersten und der zweiten Phase der mesodermalen Zellwanderung

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist die Mesoderm-Morphogenese in *htl* mutanten Embryonen gestört (Beiman et al., 1996; Gisselbrecht et al., 1996; Michelson et al., 1998a; Shishido et al., 1993; Shishido et al., 1997). Einen ersten Hinweis auf die Funktion von HTL liefert die Beobachtung des invaginierten Mesoderms in einem *htl* mutanten Embryo. Von der lateralen Seite aus betrachtet, fällt zunächst auf, dass sich die Zellen des invaginierten Mesoderms selten in einer Fokus-Ebene befinden (Abb.4D). Eine genauere Untersuchung dieser ersten Phase zeigt, dass in *htl* mutanten Embryonen der erste Kontakt zwischen den basalen Zellen des invaginierten Epithels und den Ektodermzellen nicht hergestellt wird (Abb. 3A,C). Diese fehlende Verankerung ist auch in der ventralen Ansicht des Embryos zu erkennen. Während man im Wildtyp-Embryo die lineare Anordnung der invaginierten Mesodermzellen entlang der ventralen Mittellinie findet, ist diese Anordnung in *htl* mutanten Embryonen gestört (Abb. 3B,D). Das invaginierte Mesoderm scheint in *htl* mutanten Embryonen wahllos zu einer der beiden lateralen Seiten des Embryos zu kippen, was den Eindruck einer ‚schlangenförmigen‘ Struktur erweckt und die unterschiedlichen Fokus-Ebenen erklärt.

Der von *htl* kodierte FGF-Rezeptor ist somit bereits für die Anheftung der basalen Zellen des invaginierten Mesoderms an das Ektoderm in der ersten Phase der mesodermalen Zellwanderung notwendig ist.

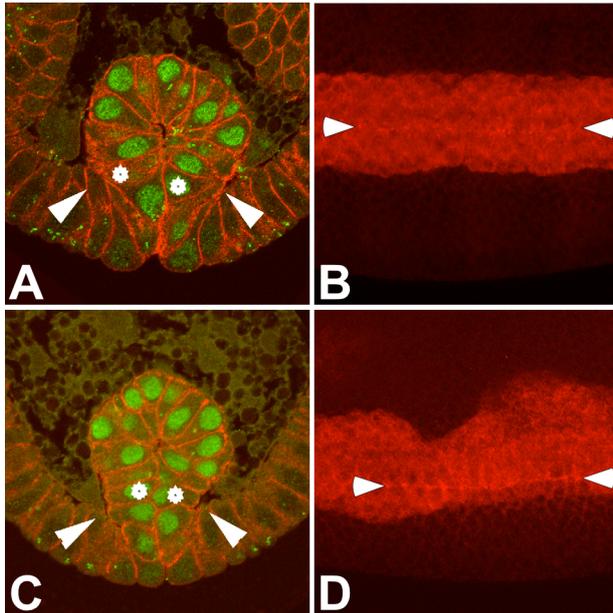


Abb. 3. HTL ist für die Anheftung des Mesoderms an das Ektoderm notwendig. Wildtyp-Embryonen (A,B) und *htl*^{AB42} mutante Embryonen (C,D) (Stadium 7; Phase 1 der Mesoderm-Migration) werden mit anti-Neurotactin (NRT) (rot), als Membranmarker, und anti-TWI (grün) Antikörpern (A,C) oder mit anti-CD2 (rot) Antikörpern gefärbt (B,D). (A) Kontaktpunkte der basalen Mesodermzellen (Sternchen) zum Ektoderm sind mit Pfeilspitzen markiert. (B) Die ventrale Mittellinie ist mit Pfeilspitzen markiert. (C) Pfeilspitzen weisen auf fehlende Kontaktpunkte der basalen Mesodermzellen (Sternchen) zum Ektoderm. (D) Die unregelmäßige Anordnung der Mesodermzellen entlang der Mittellinie ist durch Pfeilspitzen markiert. (B,D) Konfokale Schichtaufnahmen über eine Tiefe von 25 µm, beginnend auf der ventralen Seite in das Innere des Embryos gehend.

Auch in der darauf folgenden zweiten Phase der mesodermalen Zellwanderung kommt es zu Störungen der Mesoderm-Morphogenese (Abb. 4B,E). Die charakteristischen Zellformveränderungen unterbleiben in *htl* mutanten Embryonen. Auch die Zellen, die sich nach dem Zerfall des Epithels in direktem Kontakt zum Ektoderm befinden, behalten ihre abgerundete Gestalt bei. In der dritten Phase liegt das Mesoderm nicht einschichtig vor (Abb. 4C). Interessanterweise finden sich in dieser Phase aber Zellfortsätze (Abb. 4F). Die gebildeten Fortsätze erscheinen jedoch ungerichtet und werden zu einem Zeitpunkt gebildet, an dem die Mesodermzellen eigentlich schon ihre Endposition erreicht haben.

Diese Untersuchungen zeigen einerseits, dass der FGF-Rezeptor HTL zwar für die Zellformveränderungen während der zweiten Phase notwendig ist, andererseits scheint HTL aber nicht generell für Zellformveränderungen erforderlich zu sein. Dennoch sind die verzögerte Ausbildung der Zellfortsätze und die damit verbundene Ausbreitung des Mesoderms nicht ausreichend, um die Mesoderm-Differenzierung zu ermöglichen. Letzteres ist vermutlich auf die zweite Funktion von HTL während der Differenzierung der Mesodermzellen zurückzuführen (Michelson et al., 1998b).

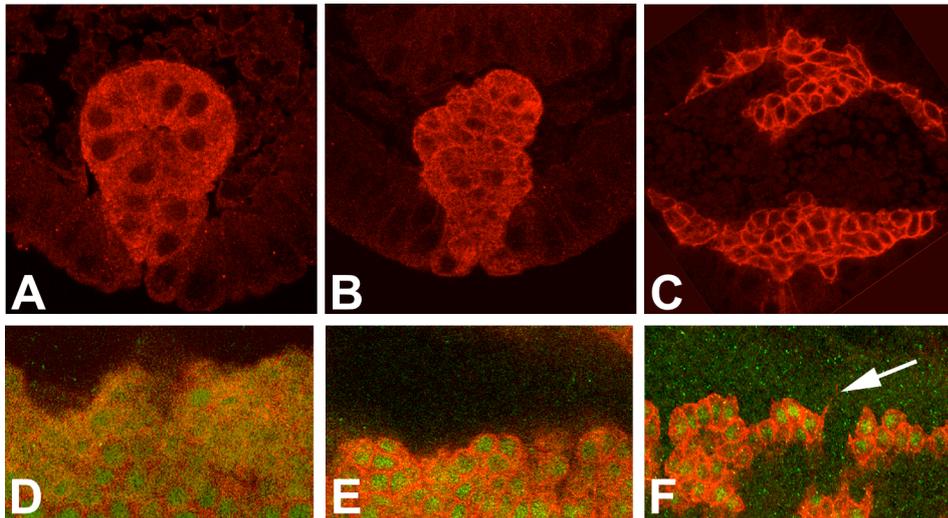


Abb. 4. HTL ist für Zellformveränderungen während der zweiten Phase der Mesoderm-Migration notwendig. Embryonen, die homozygot mutant für *htl*^{AB42} sind und *twi::CD2* exprimieren, werden mit anti-CD2 Antikörpern (rot) und anti-TWI Antikörpern (grün) gefärbt und entweder als Querschnitte (A-C), oder in der Ganzkörperansicht nach der optischen Sektionisierung durch konfokale Mikroskopie (D-F) gezeigt. (A,D) Phase 1. (B,E) Phase 2. (C,F) Phase 3; Ausbildung vereinzelter Zellfortsätze (Pfeil in F).

Die Analyse auf zellulärer Ebene zeigt, dass der HTL-FGF-Rezeptor während den ersten beiden Phasen der Mesoderm-Migration erforderlich ist. Zunächst ist er in Phase eins an der Herstellung des Kontaktes zwischen Mesoderm und Ektoderm notwendig. Es scheint sich hierbei um eine Art Initialisierungsschritt zu handeln, in dem die symmetrische Kontaktaufnahme entlang der ventralen Mittellinie, als Ausgangspunkt der Migration erfolgt. Auch in der darauf folgenden Wanderung der Mesodermzellen in Phase 2 scheint der von HTL vermittelte Signalweg für den Wanderungsprozess erforderlich zu sein. Vermutlich können die Mesodermzellen ohne den HTL-FGF-Rezeptor extrazelluläre Signale, die eine Gestaltveränderung auslösen, nicht mehr wahrnehmen.

3.3 Die Identifikation von PBL als wichtige Komponente der Mesoderm-Migration

Um weitere Gene zu finden, deren zygotische Expression für die Mesoderm-Morphogenese notwendig ist, wurde ein genetischer Screen durchgeführt (Gryzik und Müller, 2004). In diesem Screen konnten drei Regionen auf dem dritten Chromosom identifiziert werden, in denen Gene lokalisiert sind, deren zygotische Expression für die Mesoderm-Migration notwendig ist. Neben *htl* und *dof* konnte *pbl* als eine neue Komponente in der mesodermalen Zellwanderung identifiziert werden. Das Gen *pbl* liegt im genomischen Intervall 61A-68 (basierend auf den Bruchpunkten der chromosomalen Translokation *T(2;3)C309*). Der Phänotyp, der durch das Fehlen dieses chromosomalen Abschnitts entsteht, ist in Abbildung 5A gezeigt. Mit Hilfe von kleineren überlappenden chromosomalen Deletion gelang es, den

Phänotyp auf das Fehlen eines einzelnen Gens, *pbl*, zurückzuführen. Der Phänotyp einer starken Funktionsverlust-Mutation in *pbl*, *pbl³*, zeigt, dass *pbl* für die korrekte Ausbreitung des Mesoderms notwendig ist (Abb. 5B,C). In *pbl* mutanten Embryonen erreichen nur vereinzelte Mesodermzellen ihre dorsale Endposition. Die Differenzierung zu Herzvorläuferzellen, den so genannten Perikardialzellen, findet daher nur vereinzelt statt. Die Differenzierung zu Perikardialzellen ist durch die Expression des EVE Proteins gekennzeichnet. Die Expression EVE-positiver Perikardialzellen wird daher als sekundärer Marker für die korrekte Ausbreitung des Mesoderms genutzt (Carmena et al., 1998; Halfon et al., 2000; Knirr und Frasch, 2001). Während im Wildtyp 22 EVE-positive Hemisegmente gezählt werden, findet man in *pbl³* mutanten Embryonen im Durchschnitt nur ein Hemisegment, das EVE-positive Perikardialzellen zeigt (Abb. 5D,E; siehe auch Tab.1). PBL konnte auf diese Weise als neuer Faktor in der Mesoderm-Morphogenese identifiziert werden.

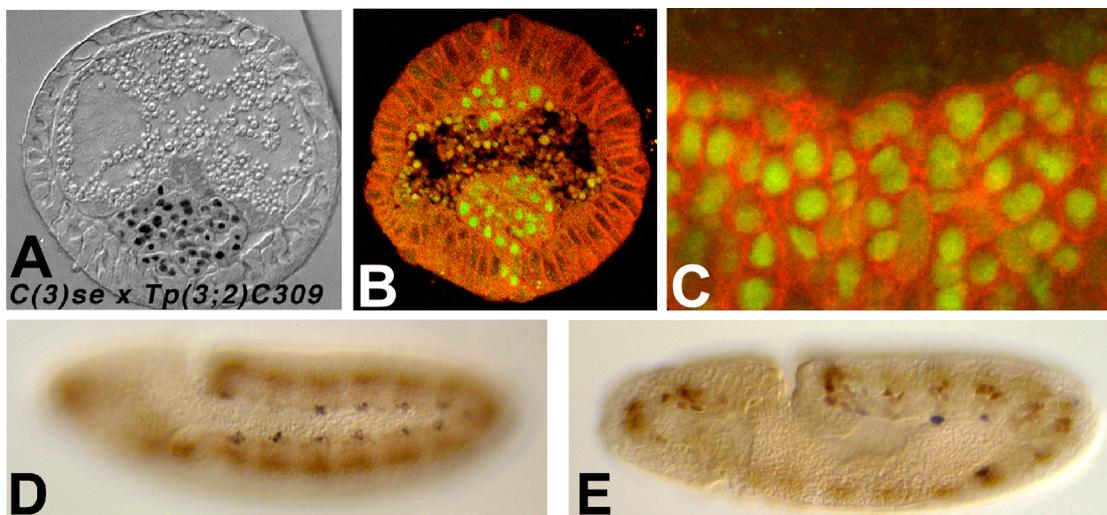


Abb. 5. Identifikation von PBL als neue Komponente der Mesoderm-Migration. (A) Querschnitt eines Embryos, zum Zeitpunkt der Keimstreifstreckung, der die künstlich erzeugte chromosomale Deletion (Tp(3;2)C309) trägt, welche die *pbl* Region einschließt. (B,C) Querschnitt (B) und laterale Ansicht (C) eines *pbl³* mutanten Embryos, der mit anti-TWI (grün) Antikörpern und anti-NRT (rot, B), bzw. mit anti-CD2 Antikörpern (rot, C) gefärbt wurde. (D,E) Laterale Ansicht eines Wildtyp (D) und eines *pbl³* mutanten Embryos (E), der mit anti-TWI Antikörpern (braun) und anti-EVE (blau) Antikörpern gefärbt wurde.

3.3.1 PBL ist für mesodermale Zellformveränderungen unentbehrlich

Um herauszufinden, ob die Defekte in der Mesoderm-Morphogenese in *pbl* mutanten Embryonen auf Migrationsdefekte zurückzuführen sind, wurden die drei Phasen der mesodermalen Zellwanderung genauer betrachtet (Abb.6). Die Invagination des Mesoderms verläuft in *pbl³* mutanten Embryonen normal. Ähnlich wie in *htl* Mutanten, unterbleibt jedoch die Herstellung des Kontaktes zwischen den basalen Mesodermzellen und den Ektodermzellen (Abb. 6A). In der zweiten Phase stehen die Mesodermzellen in direktem

Kontakt zum Ektoderm, bilden aber dennoch nicht die charakteristischen Zellfortsätze aus (Abb. 6B). Im Gegensatz zu *htl* mutanten Embryonen, ist in *pbl* Mutanten die dorsolaterale Ausbreitung des Mesoderms auch in der dritten Phase blockiert. Der mesodermale Zellverband bleibt als ein kompaktes Zellaggregat bestehen (Abb. 6C). *pbl* scheint daher eine essentielle Rolle während der Mesoderm-Migration zu spielen.

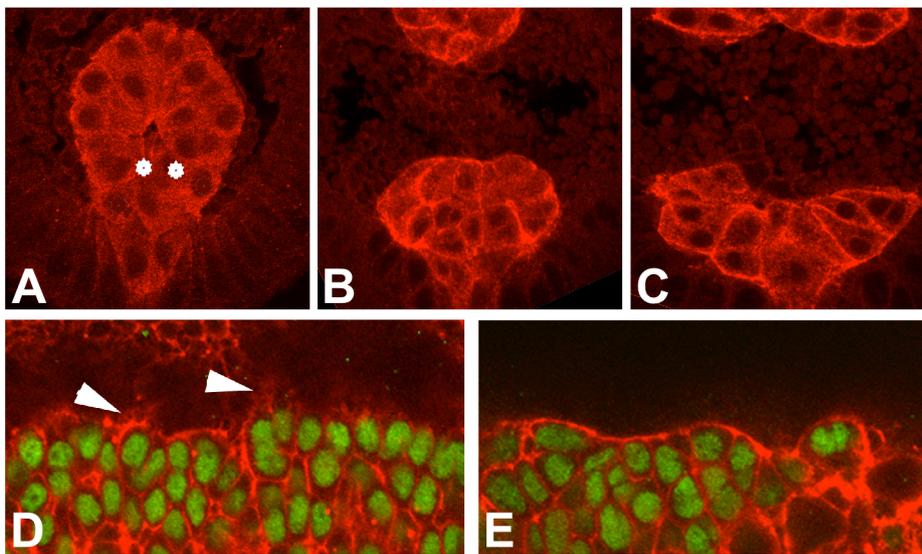


Abb. 6. PBL ist essentiell für mesodermale Zellformveränderung. (A-C) Querschnitte homozygot mutanter *pbl*³ Embryonen, die *twi::CD2* exprimieren und mit anti-CD2 (rot) Antikörpern gefärbt sind. (D,E) Laterale Ansichten eines Wildtyp-Embryos (D) und eines *pbl*³ mutanten Embryos (E), die mit einer F-Aktin (rot) Färbung und einer anti-TWI (grün) Antikörperfärbung gefärbt wurden. (D) Das Aktinnetzwerk in den Zellfortsätzen ist mit Pfeilspitzen gekennzeichnet; die basalen Mesodermzellen sind mit Sternchen markiert.

Wie bereits in Abschnitt 3.1 geschildert, findet man während der Migration an der führenden Zellfront mesodermaler Zellen ein aufgelockertes Aktinzytoskelett, mit vereinzelt Anhäufungen in Regionen, die vermutlich als Kontaktpunkte zwischen Mesoderm und Ektoderm dienen. Die Umorganisation des Aktinzytoskeletts ermöglicht der Zelle vermutlich den Übergang von der abgerundeten Zellform zur Ausbildung von Zellfortsätzen. Um herauszufinden, ob in *pbl* Mutanten die Umorganisation des Aktinzytoskeletts als Grundlage für Zellformveränderungen unterbleibt, werden Phalloidin-Färbungen von Wildtyp- und *pbl* mutanten Embryonen in Phase 2 verglichen (Abb. 6D,E). In der zweiten Phase der Zellwanderung findet man in Wildtyp-Embryonen in den Mesodermzellen der führenden Zellfront, ein diffus erscheinendes Aktinzytoskelett (Abb. 6D). Wie in Abbildung 6E zu erkennen ist, kleidet das Aktinzytoskelett in *pbl* mutanten Embryonen die abgerundeten Mesodermzellen aus, wie es im Wildtyp nur in den Phasen 1 und 3 zu beobachten ist. Es ist daher denkbar, dass PBL an der Umorganisation des Aktinzytoskeletts während der Mesoderm-Migration beteiligt ist.

3.3.2 Funktion von PBL während des Epithel-Mesenchym-Übergangs

Bevor sich die Mesodermzellen auf dem Ektoderm auszubreiten, durchlaufen sie den so genannten Epithel-Mesenchym-Übergang. Der Verlust der epithelialen Zellpolarität ist dadurch gekennzeichnet, dass $D\alpha$ -Catenin, Armadillo und DE -Cadherin nicht mehr an den adhäsiven Kontaktpunkten lokalisiert sind. Um auszuschließen, dass in *pbl* mutanten Embryonen der Übergang vom epithelialen zum mesenchymalen Zellcharakter nicht stattfindet, und dies zu den Defekte in der Zellmigration führt, wird diese Phase genauer untersucht (Abb. 7). Zu diesem Zweck wird die Verteilung von $D\alpha$ -Catenin und DE -Cadherin während dem Epithel-Mesenchym-Übergang in Wildtyp-Embryonen und *pbl* Mutanten verglichen. Sowohl im Wildtyp, als auch in den *pbl* mutanten Embryonen, sind diese beiden Zelladhäsionsmarker in Phase 1 zunächst an den apikalen Grenzen der invaginierten Röhre konzentriert (Abb. 7A,C,E). In der zweiten Phase, in der sich die invaginierte Röhre abgeflacht hat, findet man in beiden Fällen, sowohl α -Catenin, als auch DE -Cadherin entlang der Plasmamembran und im Zytoplasma verteilt (Abb. 7B,D,F,G).

Diese Untersuchungen zeigen, dass die Mesodermzellen auch in *pbl* Mutanten ihre apikobasale Zellpolarität verlieren. In *pbl* mutanten Embryonen scheint daher vielmehr der Gewinn von mesenchymalem Zellcharakter gestört zu sein.

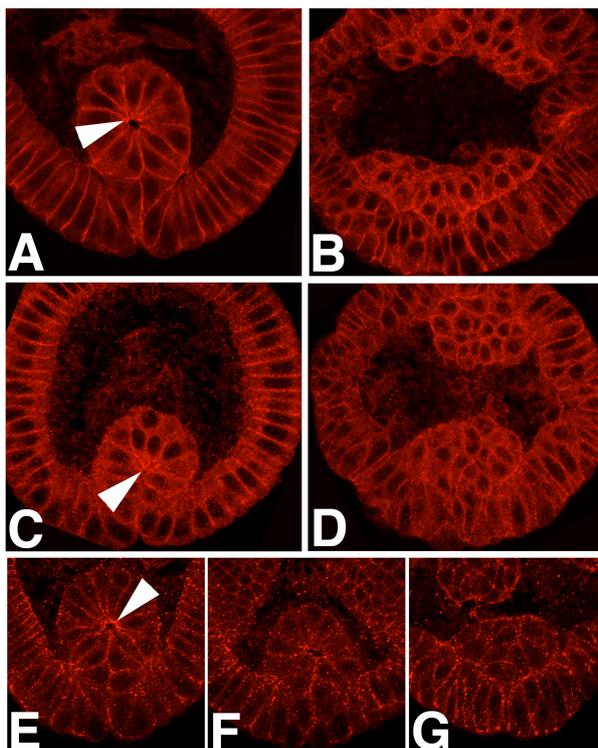


Abb. 7. Adhäsive Zell-Zell-Kontakte der invaginierten Mesodermzellen werden in *pbl* mutanten Embryonen ordentlich herunterreguliert. Wildtyp-Embryonen (A,B,E,F) und *pbl*³ mutante Embryonen (B,D,G) werden mit anti- $D\alpha$ -Catenin (A-D) oder anti- DE -Cadherin (E-G) Antikörpern gefärbt. (A,C,E) Phase 1; Pfeilspitzen deuten auf die Konzentration der Marker an den apikalen Rändern der Röhre aus Mesodermzellen. (B,D,F,G) Verteilung von $D\alpha$ -Catenin und DE -Cadherin entlang der Plasmamembran und im Zytoplasma in Phase 2.

3.3.3 Duale Funktion von PBL in der Mesoderm-Morphogenese

Das Gen *pbl* kodiert für einen GEF für kleine GTPasen der Rho-Familie, der verwandt mit dem ECT2 Proto-Onkoprotein der Maus ist (Miki et al., 1993; Prokopenko et al., 1999). Gemeinsame funktionelle Domänen von PBL und ECT2 sind unter anderem die Dbl Homologie (DH) und die Pleckstrin-Homologie (PH) Domäne, die als Tandemstruktur in allen RhoGEFs zu finden sind (Whitehead et al., 1997). Die Mitglieder der Säugertierfamilie der RhoGEFs sind Proto-Onkogene, da ihre trunkierten Proteinformen in der Fibroblasten-Zellkultur zur Bildung von transformierten Stellen, den so genannten *transformed foci*, führen (Hart und Roberts, 1994). Obwohl *pbl* auch schon als ein Gen identifiziert wurde, dessen Mutation die Wanderung der Axone im peripheren Nervensystem beeinflusst, konnte bisher nur die Funktion von PBL in der Zytokinese embryonaler Zellen genauer bestimmt werden (Hime und Saint, 1992; Lehner, 1992; Prokopenko et al., 1999; Salzberg et al., 1994). Während der Zytokinese ist PBL für die korrekte Lokalisation und die Bildung des kontraktilen Ringes verantwortlich (Prokopenko et al., 1999). Unterbleibt die Ausbildung des kontraktilen Ringes, findet die Zytokinese nicht statt und der Zellzyklus endet mit der Bildung zweikerniger Zellen. Ein Phänotyp, den man in *pbl* mutanten Embryonen ab dem vierzehnten mitotischen Zyklus findet, dem ersten Zyklus, der Zytokinese zeigt (Hime und Saint, 1992). Es ist daher vorstellbar, dass die Defekte in der Mesoderm-Migration in *pbl* mutanten Embryonen darauf beruhen, dass die zweikernigen Zellen, die nach der ersten mitotischen Welle gebildet wurden, nicht in der Lage sind, zu wandern. Um diese Vermutung auszuschließen, wird der *pbl* Migrations-Phänotyp in einem mutanten Hintergrund untersucht, in dem Mitosen genetisch unterdrückt werden (Abb.8).

In *string (stg)* mutanten Embryonen ist der Zellzyklus vor dem Eintritt in Mitose 14 komplett blockiert, da alle Zellen in der G2-Phase vor Zyklus 14 arretieren (Edgar und O'Farrell, 1989). Dennoch sind die invaginierten Mesodermzellen in der Lage, Zellfortsätze auszubilden und sich auf dem Ektoderm soweit auszubreiten, dass die Differenzierung zu Perikardialzellen wie im Wildtyp stattfindet (Abb. 8C,D). Untersucht man nun den *pbl* mutanten Migrations-Phänotyp, in diesem Hintergrund, in dem der Zellzyklus gar nicht erst stattfindet, können mögliche Defekte in der Migration nicht auf die Funktion von PBL in der Zytokinese zurückgeführt werden. Wie die Abbildungen 8A,B,E,F zeigen, unterbleibt die Ausbildung der mesodermalen Zellfortsätze tatsächlich in *pbl*, *stg* mutanten Embryonen und die Spezifizierung zu den Mesodermderivaten ist - ähnlich wie in *pbl*³ Mutanten - gestört. Diese Ergebnisse zeigen, dass es sich bei dem Migrationsdefekt in *pbl* mutanten Embryonen nicht lediglich um einen Sekundär-Effekt handelt, der sich aus dem Fehlen der Zytokinese ergibt.

PBL scheint vielmehr zwei voneinander unabhängige Funktionen in der Migration und in der Zytokinese auszuüben.

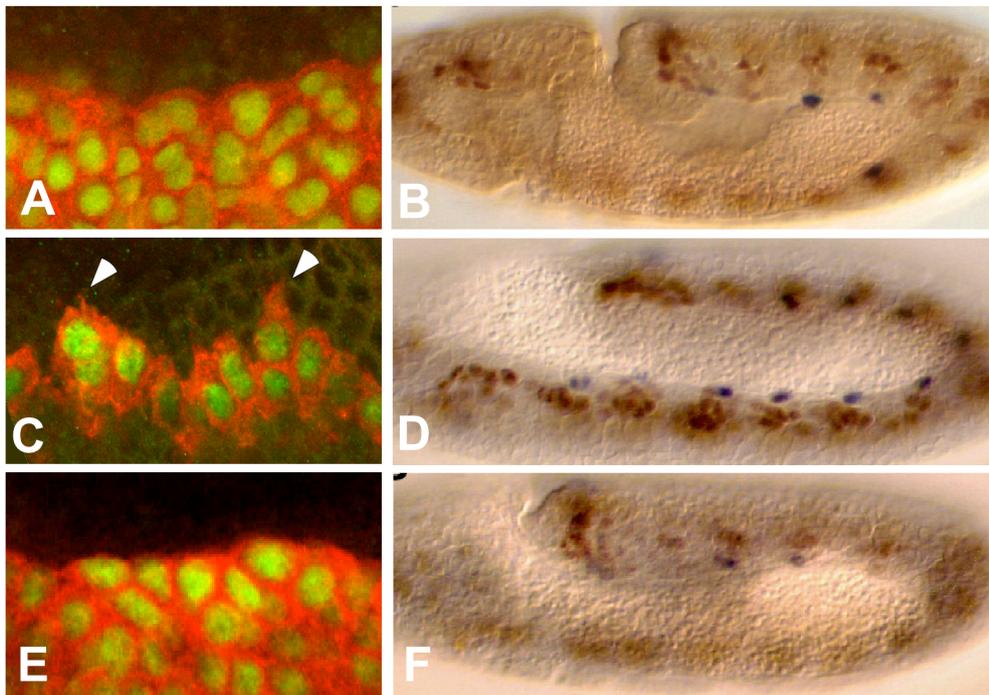


Abb. 8. Die Funktion von PBL in der Zellmigration ist unabhängig von dessen Funktion in der Zytokinese. (A,C,E) Embryonen (Stadium 8; Phase 2), die *twi::CD2* exprimieren werden mit anti-CD2 (rot) und anti-TWI (grün) Antikörpern gefärbt. (B,D,F) Gesamtansicht von Embryonen (Stadium 10), die mit Antikörpern gegen das TWI (braun) und das EVE (blau) Protein gefärbt sind. (A,B) homozygot mutanter *pbl*³ Embryo. (C,D) homozygot mutanter *stg*^{7M} Embryo; laterale Zellfortsätze sind mit Pfeilspitzen markiert (C). (E,F) *pbl*³, *stg*^{7M} homozygot mutanter Embryo.

Einen weiteren Beweis für die unabhängige Funktion von PBL in der Zellmigration brachte der Vergleich zweier verschiedener mutanter *pbl* Allele im Hinblick auf die Differenzierung von Perikardialzellen und die Defekte in der Zytokinese (Abb.9). Embryonen die homozygot mutant für das Funktionsverlust-Allel *pbl*³ sind, zeigen, wie bereits in Abbildung 5 beschrieben, einen starken Defekt in der Differenzierung der Mesodermderivate. In *pbl*³ mutanten Embryonen findet man im Durchschnitt nur ein Hemisegment pro Embryo mit EVE-positiven Perikardialzellen (Abb. 9A, Tab.1). Im Gegensatz dazu findet man in Embryonen, die das Allel *pbl*^{11D} tragen, im Durchschnitt 12 Hemisegmente mit EVE-positiven Perikardialzellen (Abb. 9C, Tab.1). Unter den ausgewerteten *pbl*^{11D} Embryonen gab es sogar einige (2 von 45), welche die wildtypische Anzahl von EVE-positiven Perikardialzellen zeigten.

Interessanterweise zeigen *pbl*³ und *pbl*^{11D} mutante Embryonen, zum Zeitpunkt des ausgestreckten Keimstreifs, vergleichbar starke Defekte in der Zytokinese (Abb. 8B,B',D,D'). In Abbildung 8B und D sieht man die segmentale Expression des EVE-Proteins in Stadium

10 im zentralen Nervensystem (Cui und Doe, 1995; Weigmann und Lehner, 1995). In Folge des defekten Ablaufs der Zytokinese, findet man nach der fehlerhaften asymmetrischen Zellteilung des Neuroblasten NB7-1, eine zweikernige Tochterzelle, welche EVE exprimiert (Abb. 8B',D') (Cui und Doe, 1995).

Im Vergleich dieser beiden Allele stellt sich somit heraus, dass bei gleichen Defekten in der Zytokinese, durchaus variable mesodermale Phänotypen auftreten können. Diese Beobachtungen sind somit ein weiteres Argument für die unabhängige Funktion von PBL in Zytokinese und Zellmigration.

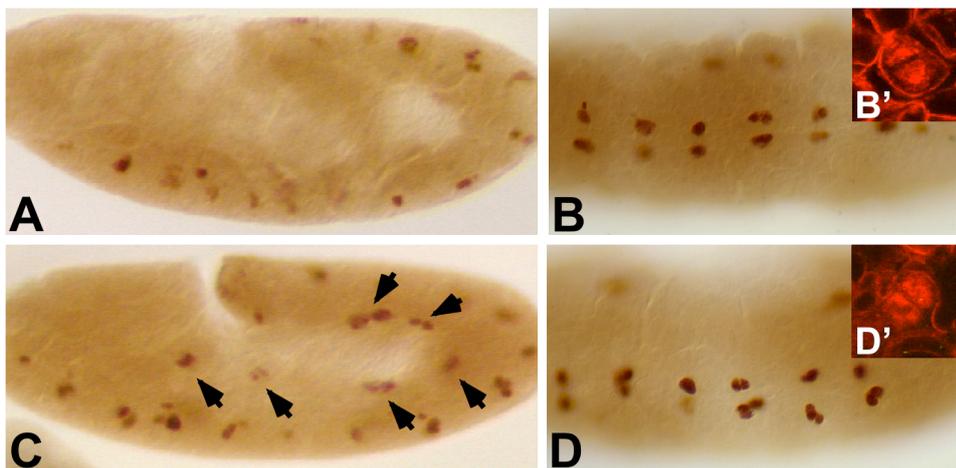


Abb. 9. Allelspezifische Unterschiede bezüglich Migration und Zytokinese in pbl^3 und pbl^{1D} mutanten Embryonen. (A-D) Embryonen (Stadium 10) die mit anti-EVE (braun) Antikörpern gefärbt sind, in lateraler (A,C) und ventraler (B,D) Ansicht. (B',D') Vergrößerung einzelner Neuroblasten, die mit dem anti-EVE (rot) Antikörper und zusätzlich, zur Darstellung der Zellumrisse, mit Antikörpern gegen das membranlokalisierte NRT (rot) Protein gefärbt sind. (A,B,B') homozygot mutanter pbl^3 Embryo. (C,D,D') homozygot mutanter pbl^{1D} Embryo; EVE-positive Perikardialzellen sind mit Pfeilen markiert.

3.3.4 Die Funktion von PBL in Bezug zum HTL/MAPK Signalweg

3.3.4.1 Mesodermspezifische Funktion von PBL

In Bezug auf die Funktionsweise von PBL in der Mesoderm-Morphogenese ist es zum einen vorstellbar, dass PBL vom Ektoderm aus Signale vermittelt, die von den Mesodermzellen wahrgenommen werden und die Migration ermöglichen. Vorstellbar wären beispielsweise die Präsentation von extrazellulären Signalen, oder die Präsentation von Oberflächenproteinen in der extrazellulären Matrix. Zum anderen ist es vorstellbar, dass die Funktion von PBL in der Migration auf das Mesoderm beschränkt ist. In diesem Fall könnte PBL zum Beispiel an der Weiterleitung intrazellulärer Signale oder der Präsentation von Rezeptoren auf der Oberfläche der Mesodermzellen beteiligt sein. So wird der FGF-Rezeptor HTL beispielsweise auf der mesodermalen Zelloberfläche exprimiert (Beiman et al., 1996; Gisselbrecht et al., 1996;

Shishido et al., 1993; Shishido et al., 1997). Um zu klären, ob die Funktion von PBL in der Mesoderm-Morphogenese gewebespezifisch, dass heißt auf das Mesoderm beschränkt ist, wird ein Transgen, das die vollständige *pbl* cDNA A enthält, mesodermspezifisch im *pbl* mutanten Hintergrund exprimiert. Zu diesem Zweck wurde das UAS::GAL4-System verwendet (Brand und Perrimon, 1993). Dieses System ermöglicht die gezielte, gewebespezifische Expression eines Transgens mit Hilfe eines bestimmten *Enhancer*-Elementes des *Drosophila* Genoms. Ein Fliegenstamm trägt dabei das zu exprimierende Transgen unter der Kontrolle einer UAS (*upstream activating sequence*)-Bindestelle. Ein anderer Fliegenstamm trägt die GAL4-Sequenz unter der Kontrolle einer *Drosophila Enhancer*-Region, wie beispielsweise dem *twi-Enhancer* (*twi::Gal4*). Diesen Stamm bezeichnet man als Treiberlinie, die UAS-Linie als Effektor. In dem Treiberstamm wird das GAL4 Protein unter der Kontrolle des jeweiligen *Enhancers* exprimiert. Erst wenn man Treiber- und Effektorstamm untereinander kreuzt, entstehen Embryonen, die beide Linien tragen. Nun kann das GAL4 Protein an die UAS-Region binden. Dadurch wird die Transkription des Transgens ermöglicht, das von der UAS-Region kontrolliert wird, wie in diesem Fall die *pbl* cDNA (*UAS::pbl^{3.2}*). Das UAS::GAL4-System ermöglicht daher die gewebespezifische Expression eines Transgens mit Hilfe von *Drosophila*-spezifischen *Enhancern*.

Exprimiert man nun *pbl* mRNA A mesodermspezifisch in einem *pbl* mutanten Hintergrund, wird sowohl der Zytokinesedefekt, als auch der Migrationsdefekt der *pbl* mutanten Embryonen gerettet (Abb. 10). Bereits in der ersten Phase der Zellwanderung sind die basalen Epithelzellen dazu in der Lage, den Kontakt zum Ektoderm herzustellen (Abb. 10A). In Phase 2 breitet sich das Mesoderm auf dem Ektoderm aus und erreicht in der dritten Phase die laterale Endposition (Abb. 10B,C). Infolge der korrekten Ausbreitung des Mesoderms findet die Differenzierung zu Herzvorläuferzellen nahezu vollständig statt (Abb. 10D,E). Während die Rettung im Mesoderm sowohl auf Migrations-, als auch auf der Zytokineseebene, vollständig erfolgt, existieren, wie in der Vergrößerung in Abbildung 10B' gezeigt, die ektodermalen Zytokinesedefekte weiterhin.

Dieses Experiment zeigt zum einen, dass die Aktivität des *pbl* Transgens im Mesoderm ausreicht, um die Migrationsfunktion zu erfüllen und zum anderen, dass die Aktivität von PBL im Ektoderm nicht für die Mesoderm-Migration erforderlich ist.

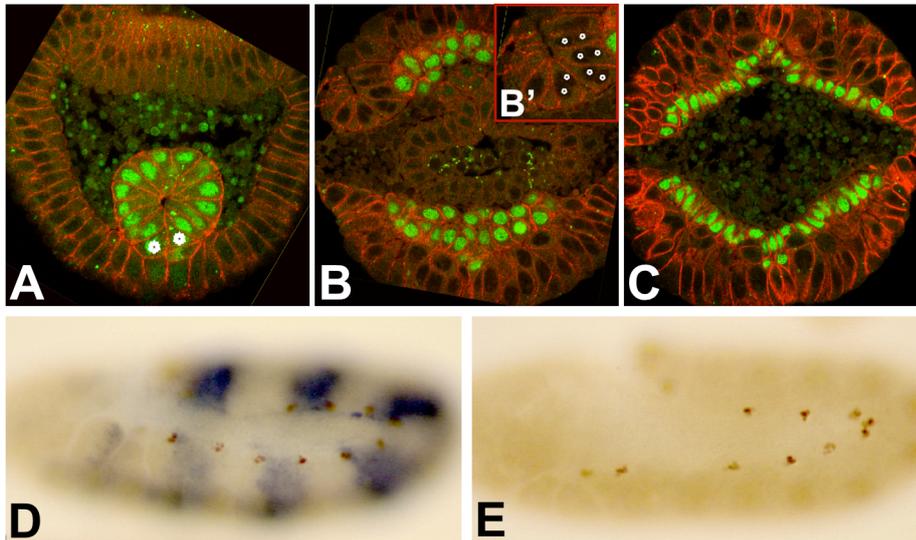


Abb. 10. Rettung des Migrationsdefektes durch mesodermspezifische Expression der *pbl* cDNA A. (A-C) Querschnitte von homozygot mutanten *pbl*³ Embryonen, die *twi::Gal4, UAS::pbl*^{3,2} exprimieren und mit anti-NRT (rot) und anti-TWI (grün) Antikörpern gefärbt sind. (A) Phase 1. (B) Phase 2; B' zeigt eine Vergrößerung aus B, in der Zellkerne in mehrkernigen Zellen mit Sternchen markiert sind. (C) Phase 3. (D,E) Embryonen (Stadium 11) in der lateralen Gesamtansicht, die mit Antikörpern gegen das EVE (braun) und βGAL (blau) Protein gefärbt sind. (D) Embryo der mindestens eine Wildtyp-Kopie von *pbl* trägt, da die blaue Färbung auf die Anwesenheit des *TM3(ftz::lacZ)* Chromosoms zurückzuführen ist. (E) *twi::Gal4/UAS::pbl*^{3,2}; *Df(3L)pbl*^{NR}/*pbl*³ Embryo.

3.3.4.2 PBL agiert unterhalb vom, oder parallel zum HTL/MAPK Signalweg

Da gezeigt werden konnte, dass die Funktion von *pbl* in der Zellwanderung spezifisch für die Mesodermzellen ist, und da die Funktion von *htl* ebenfalls auf das Mesoderm beschränkt ist (Beiman et al., 1996; Gisselbrecht et al., 1996; Shishido et al., 1993; Shishido et al., 1997), soll im folgenden Abschnitt untersucht werden, ob PBL eine Funktion in dem von HTL vermittelten Signalweg besitzt. Der FGF-Rezeptor HTL aktiviert während der Migration und der Differenzierung des Mesoderms eine konservierte Signaltransduktionskaskade, die über RAS und RAF zur Aktivierung der MAPK führt (Gabay et al., 1997b; Michelson et al., 1998a; Michelson et al., 1998b; Vincent et al., 1998). Um herauszufinden, ob PBL für die HTL-abhängige Aktivierung der MAP-Kinase notwendig ist, werden *pbl* mutante Embryonen im Hinblick auf die Aktivität der MAPK untersucht. Diese kann durch Antikörperfärbungen gegen die diphosphorylierte Form der MAP-Kinase (dpERK) nachgewiesen werden. In Wildtyp-Embryonen wird dpERK in der am weitesten dorsal gelegenen, mesodermalen Zellreihe exprimiert (Abb. 11A) (Gabay et al., 1997a; Gabay et al., 1997b). Auch in den *pbl* mutanten Embryonen findet man die diphosphorylierte, aktivierte Form der MAPK in den führenden Zellen der mesodermalen Zellfront (Abb. 11B). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Funktion von PBL nicht für die HTL-abhängige Aktivierung der MAPK notwendig ist.

Parallel dazu wird untersucht, ob eine konstitutiv aktive Form von RAS1 (*rasV12*) den *pbl* mutanten Phänotyp retten kann. RAS1 ist eine Schlüsselkomponente, die unterhalb der RTKs, einschließlich HTL, agiert (Fantl et al., 1993; Gisselbrecht et al., 1996; van der Geer et al., 1994). Falls PBL in der Signalkaskade oberhalb von RAS1 fungiert, sollte es möglich sein, den *pbl* mutanten Phänotyp durch die Expression von konstitutiv aktivem RAS1 zu retten. Die Aktivität des RAS-Moleküls wird über die Bindung von GTP und GDP reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass die natürliche Mutation der zwölften Aminosäure von Glycin zu Valin die intrinsische GTPase Aktivität zerstört. Dadurch entsteht die konstitutiv aktive Form von *ras1*, *rasV12*. Wie die EVE-Expression in Abbildung 11 D zeigt, ist *rasV12* jedoch nicht in der Lage, den *pbl* mutanten Phänotyp zu retten, wenngleich die Aktivierung der MAP-Kinase in diesen Embryonen wie im Wildtyp erfolgt (Abb. 11C,D). Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass die mesodermale Überexpression von konstitutiv aktiven RAS1 im *htl* mutanten Hintergrund, die EVE Expression im segmentalen Muster, wenn auch variabel, wieder herstellen kann (Michelson et al., 1998a). Da eine solche Rettung im *pbl* Hintergrund nicht stattfindet, kann eine Funktion von PBL oberhalb des HTL-MAPK Signalwegs ausgeschlossen werden.

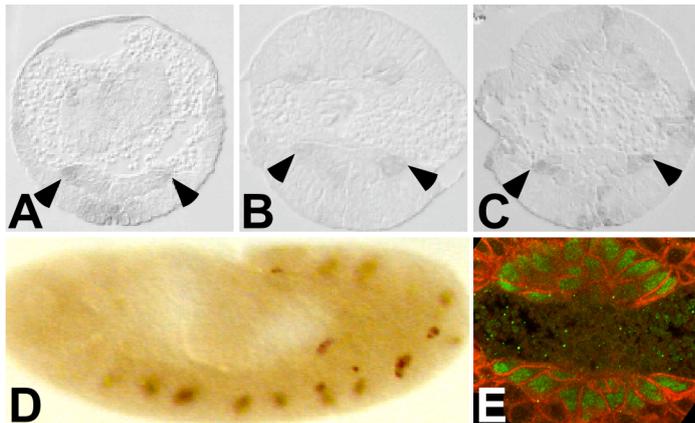


Abb. 11. PBL agiert unterhalb vom, oder parallel zum HTL/MAPK Signalweg. (A-C) Querschnitte von Embryonen (Stadium 8; Phase 2), die mit anti-dpERK Antikörpern gefärbt sind. Die Anreicherung von dpERK in den führenden Zellen des wandernden Mesoderms ist mit Pfeilen markiert. (A) Wildtyp-Embryo. (B) homozygot mutanter *pbl*³ Embryo. (C,D) *twi::Gal4; UAS::rasV12, pbl*³/*Df(3L)pbl*^{NR} Embryo; (D) laterale Ansicht mit anti-EVE Antikörperfärbung. (E) Querschnitt eines Embryos, der die aktivierte Form von HTL mesodermalspezifisch überexprimiert (*twi::Gal4; UAS::λhtl, pbl*³/*Df(3L)pbl*^{NR}) und mit anti-NRT (rot) und anti-TWI (grün) Antikörpern gefärbt ist.

3.3.4.3 Die Aktivität von PBL ist für die Funktion von HTL bei der Vermittlung von Zellformveränderungen notwendig

Die vorherigen Ergebnisse zeigen, dass PBL entweder unterhalb, oder parallel zum HTL-Signalweg fungiert. Ob PBL für die Funktion von HTL notwendig ist, soll im folgenden Abschnitt geklärt werden.

Es wurde bereits gezeigt, dass die Defekte in *htl* mutanten Embryonen vollständig durch die Expression der *htl* cDNA (*UAS::htlM*) gerettet werden können, wenn diese mesodermispezifisch mit dem *twi::Gal4* Treiber exprimiert wird (Abb. 12A,B) (Michelson et al., 1998b). Zusätzlich wurde auch die Expression einer konstitutiv aktiven Rezeptor-Variante von HTL, λ HTL, getestet. Diese entsteht, wenn die extrazelluläre Domäne des HTL-Rezeptors durch die Dimerisierungsdomäne des Bakteriophagen λ cI-Repressors ersetzt wird. Dies ermöglicht eine Liganden-unabhängige Rezeptor-Dimerisierung (Lee et al., 1996). Ein solches Konstrukt wurde dann unter die Kontrolle des *UAS::GAL4*-Systems gebracht (Greig und Akam, 1993). Im Gegensatz zur Überexpression der Wildtyp-HTL-Form, ist die Überexpression der konstitutiv aktiven Form des HTL-FGF-Rezeptors, λ HTL, zwar in der Lage, frühe Defekte zu retten, die Differenzierung zu Mesodermderivaten findet jedoch nur unvollständig statt (Abb. 12C,D und Tab. 1) (Michelson et al., 1998b). Die Expression von λ HTL ist somit in der Lage, die frühen Defekte in Phase 1 der mesodermalen Zellwanderung in *htl* mutanten Embryonen zu retten.

Exprimiert man nun die Wildtyp-Form von HTL, oder die konstitutiv aktive Version, λ HTL, in einem *pbl* mutanten Hintergrund, ist keine der beiden Formen von HTL dazu in der Lage, die Zellformveränderungen in *pbl* mutanten Embryonen auszulösen (Abb. 12E und Tab. 1). In einigen Embryonen kommt es in Phase 3 jedoch zu einer, scheinbar verzögerten, Zellmigration (Abb. 11E). Da diese Rettung nur vereinzelt beobachtet werden konnte, wurde erneut die Expression des EVE-Proteins in den Hemisegmenten als sekundärer Marker der Mesoderm-Migration genutzt. Während die Expression der vollständigen *htl* cDNA den *pbl* mutanten Phänotyp nicht retten kann, führt die Überexpression der konstitutiv aktiven Version von HTL zu einer Suppression des mutanten Phänotyps (Abb. 12F und Tab. 1). Vermutlich führt in diesen Embryonen die verzögerte mesodermale Zellwanderung zu einer ineffektiven Signalübermittlung und damit zu einer Beeinträchtigung bei der Bildung der Mesodermderivate. Abgesehen davon kann die unvollständige Rettung auch auf die zweite Funktion des HTL-Rezeptors bei der Differenzierung der Perikardialzellen zurückzuführen sein (Michelson et al., 1998b). Entscheidend ist jedoch, dass *pbl* in den frühen, von HTL vermittelten Initialisierungsschritt (vgl. 3.2), involviert ist. In einem *pbl* mutanten Hintergrund ist weder die Wildtyp-Form, noch die konstitutiv aktive Form von HTL dazu in der Lage die frühen Zellformveränderungen zu retten. Das bedeutet, dass sowohl *htl*, als auch *pbl* für die Kontaktaufnahme der basalen Mesodermzellen zum Ektoderm notwendig sind und dass ihre Funktionen miteinander verknüpft sind.

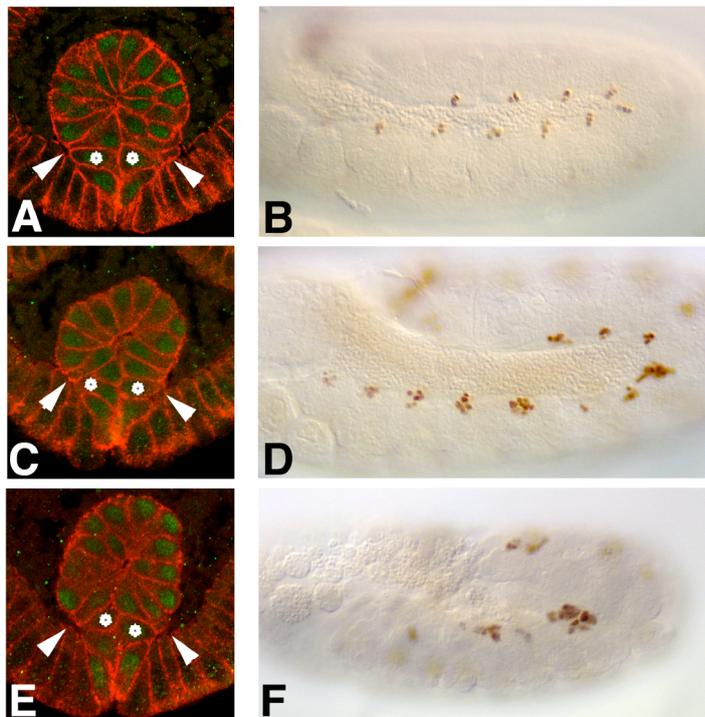


Abb. 12. Die Aktivität von PBL ist für HTL-vermittelte Zellformveränderungen notwendig. (A,C,E) Querschnitte von Embryonen, die mit anti-NRT (rot) und anti-TWI (grün) Antikörpern gefärbt sind; Pfeile markieren Kontaktpunkte vom Mesoderm zum Ektoderm (A,C), bzw. fehlende Kontaktpunkte (E); basale Mesodermzellen sind mit Sternchen markiert. (B,D,F) laterale Ansicht von Embryonen, die mit Antikörpern gegen das EVE (braun) Protein gefärbt sind. (A,B) *twi::Gal4; UAS::htl^M, htl^{AB42}/htl^{AB42}* Embryonen. (C,D) *twi::Gal4; UAS::λhtl, htl^{AB42}/htl^{AB42}* Embryonen. (E,F) *twi::Gal4; UAS::λhtl, pbl³/Df(3L)pbl^{NR}* Embryonen.

Genotyp	EVE-pos. Hemisegment
Oregon R	22 ($\sigma = 0$; n = 20)
<i>htl^{AB42}/htl^{AB42}</i>	0 ($\sigma = 0$; n = 20)
<i>pbl³/pbl³</i>	1,4 ($\sigma = 1,2$; n = 136)
<i>pbl^{11D}/pbl^{11D}</i>	11,7 ($\sigma = 3,5$; n = 45)
<i>twi::Gal4; UAS::htl^M, htl^{AB42}/htl^{AB42}</i>	22 ($\sigma = 0$; n = 20)
<i>twi::Gal4; UAS::λhtl, htl^{AB42}/htl^{AB42}</i>	12,2 ($\sigma = 2,9$; n = 27)
<i>twi::Gal4; UAS::htl^M, pbl³/Df(3L)pbl^{NR}</i>	0,4 ($\sigma = 0,7$; n = 45)
<i>twi::Gal4; UAS::λhtl, pbl³/Df(3L)pbl^{NR}</i>	6,5 ($\sigma = 2,5$; n = 17)

Tab. 1. Quantifizierung der EVE-positiven Mesodermzellen. Die Anzahl der EVE-positiven Hemisegmente pro Embryo wurde an immunmarkierten Embryonen im Stadium 10-12 ermittelt. Angegeben sind die jeweiligen Durchschnittswerte mit der Standardabweichung (σ) und der Anzahl der ausgewerteten Embryonen (n)

3.4 Die Regulation der Funktion von PBL während der mesodermalen Zellwanderung

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass PBL für Zellformveränderungen bei der Mesoderm-Migration essentiell ist und zumindest in der Initialisierungsphase mit dem HTL-Signalweg interagiert. PBL übt diese Funktion gewebespezifisch und unabhängig von seiner Funktion in der Zytokinese aus. Daher stellt sich die Frage, wie die Funktion von PBL während der Zellmigration reguliert wird.

3.4.1 Nachweis und Expression verschiedener *pbl* Transkripte

Die gewebespezifische Funktion von PBL kann bereits auf der Transkriptionsebene reguliert werden, indem *pbl* gewebespezifisch exprimiert wird. Da PBL aber ubiquitär im Embryo exprimiert wird, liegt die Vermutung nahe, dass die Regulation von *pbl* über differentielles Spleißen erfolgt. Dieser Vorgang würde zur Expression verschiedener *pbl* mRNAs führen. So könnte eine mesodermal exprimierte Spleißvariante beispielsweise die Funktion von PBL in der Migration ermöglichen, während eine andere, ubiquitär exprimierte Spleißvariante die Funktion von PBL in der Zytokinese sicherstellt. Eine mögliche Regulation von *pbl* auf der Transkriptionsebene soll im folgenden Abschnitt näher betrachtet werden.

Das vollständig sequenzierte Genom von *Drosophila melanogaster* findet man inzwischen in verschiedenen elektronischen Datenbanken. Dort werden auch Vorhersagen über Gene und ihre, zu erwartenden, Spleißvarianten gemacht. Für das Gen *pbl* sind dreizehn Exons und vier verschiedene Spleißvarianten vorhergesagt, die sich in der Anwesenheit und / oder der Abwesenheit des dritten und des siebten Exons unterscheiden. Eine schematische Übersicht der Spleißvarianten und der daraus resultierenden mRNAs ist in Abb. 13 gezeigt.

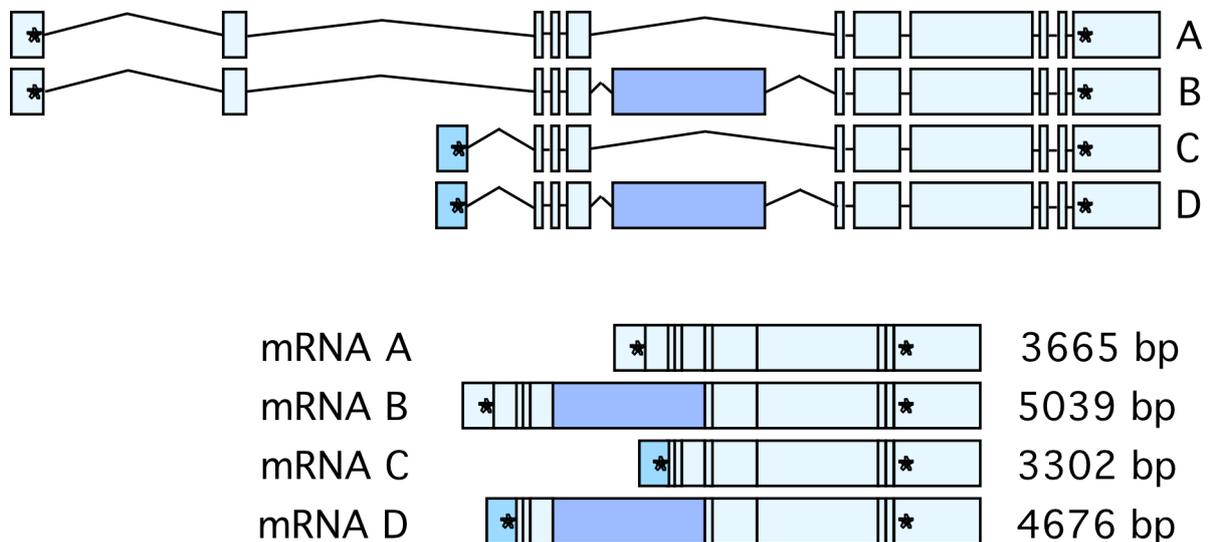


Abb. 13. Vorhergesagte Spleißvarianten der *pbl* prä-mRNA und die daraus resultierenden *pbl* mRNAs. Die Daten beziehen sich auf www.flybase.bio.indiana.edu. Die Sternchen in Exon 1 bzw. 3 markieren das Start-Kodon; die Sternchen in Exon 13 das Stopp-Kodon, Die vorhergesagten Größen der mRNAs sind jeweils angegeben.

Um die Expression der *pbl* Transkripte während der Gastrulation zu untersuchen, werden Northern-Blot-Analysen und *in situ*-Hybridisierungen an Embryonen, in den entsprechenden Entwicklungsstadien, durchgeführt.

3.4.1.1 Nachweis von vier verschiedenen, differentiell exprimierten *pbl* Transkripten

Zum Nachweis der verschiedenen *pbl* Transkripte werden zwei unterschiedliche Sonden hergestellt. Zum einen eine markierte RNA Sonde, die gegen die *pbl* cDNA A gerichtet ist und zum anderen eine Sonde, die gegen das siebte Exon von *pbl* gerichtet ist. Die *pbl* cDNA A-Sonde erkennt vier Transkripte, wobei das größte Transkript erst bei einer verlängerten Expositionszeit detektierbar ist (Abb. 14A). Die Transkripte unterscheiden sich in der Stärke und dem Zeitpunkt der Expression während der Gastrulation (Abb. 14A). Während die Transkripte mit einer Größe von 3,8 kb und 5,5 kb während der gesamten Embryonalentwicklung exprimiert werden, findet man das größte Transkript (5,8 kb) nur in den frühen Stadien der Gastrulation, und das kleinste Transkript (3,4kb) erst in den späten Stadien der Embryonalentwicklung (Abb. 14A). Mit Hilfe der zweiten, gegen das Exon 7 gerichteten Sonde, lässt sich bestätigen, dass die beiden großen Transkripte das siebte Exon enthalten und somit vermutlich den *pbl* mRNAs B und D zuzuordnen sind, obwohl die Größe der detektierten Banden etwas höher ist, als erwartet (vgl. Abb. 13 und 14). Diese Größenunterschiede sind nicht auf Ungenauigkeiten bei der Übertragung des Längenstandards zurückzuführen, da unabhängige Untersuchungen mit einer *pbl* spezifischen Sonde ebenfalls zu diesen Ergebnis geführt haben (Prokopenko et al., 2000a). Vermutlich besitzen die *pbl* mRNAs jedoch einen größeren untranslatierten Bereich, als vorhergesagt. Dass der 3'-untranslatierte Bereich der *pbl* A cDNA beispielsweise größer ist, als bisher vorhergesagt (Prokopenko et al., 1999), wird im nächsten Abschnitt deutlich. Dort wird für die Reverse Transkription der *pbl* mRNA ein Primer im 3' untranslatierten Bereich verwendet, der außerhalb der publizierten *pbl* mRNA A bindet. Mit Hilfe dieses Primers konnten dennoch alle vier vorhergesagten *pbl* mRNAs amplifiziert werden. Zusammenfassend kann man sagen, dass diese Northern-Analysen vier *pbl* Transkripte während der Embryonalentwicklung von *Drosophila* detektieren, die unterschiedlich stark und zeitlich differenziert exprimiert werden.

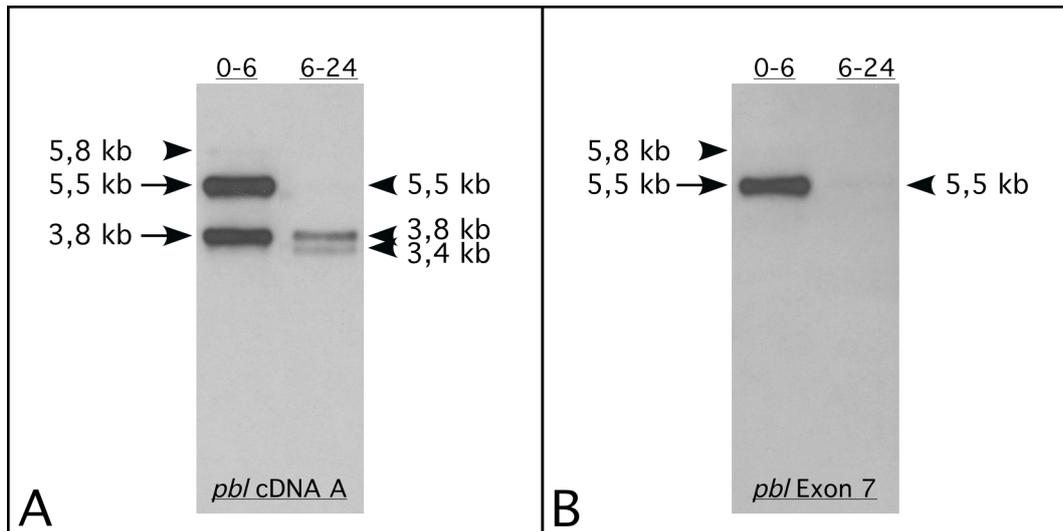


Abb. 14. Northern Analysen der *pbl* Expression während der *Drosophila* Embryonalentwicklung. Jede Probe enthält 4 μg poly(A)⁺ RNA, die von Embryonen nach 0-6, bzw. 6-24 Stunden Entwicklungsdauer bei 25°C isoliert wurde. Als RNA-Sonden werden die *pbl* cDNA A (A) und das *pbl* Exon 7 (B) verwendet. Die Pfeile markieren stark exprimierte Transkripte mit einer Größe von 3,8 und 5,5 kb. Schwach exprimierte Transkripte mit einer Größe von 3,4 und 5,8 kb sind mit Pfeilspitzen markiert.

3.4.1.2 Identifizierung der *pbl* Transkripte

Mit Hilfe der beiden Sonden konnten vier verschiedene differentiell exprimierte *pbl* Transkripte nachgewiesen werden. Gerade im Hinblick auf die Differenzen der erwarteten und der detektierten Größen, sollen die *pbl* mRNAs über PCR amplifiziert und anschließend sequenziert werden. Da diese PCR auf prozessierter mRNA (poly(A)⁺) aus Wildtyp-Embryonen durchgeführt wird, muss die mRNA zunächst in eine cDNA umgeschrieben werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als Reverse-Transkription (RT). Erst dann erfolgt die Amplifikation der cDNA mit der DNA-Polymerase. Um eine größere Produktausbeute zu erreichen, wird im Anschluss daran noch eine PCR mit versetzten Primern durchgeführt, die innerhalb der zu amplifizierenden Region liegen, die so genannte *nested PCR*. Die Primer, die zur Amplifikation der *pbl* mRNAs verwendet wurden sind in Abb.15C dargestellt.

Zur Durchführung der RT-PCR werden zwei Primerpaare gewählt, die sich in ihren 5' Primern unterscheiden. Letztere besitzen entweder eine spezifische Bindestelle im 5' UTR des ersten, oder im 5'UTR des dritten Exons. Wie in Abbildung 15A gezeigt, lassen sich mit den inneren Primern in Exon 1 und 13 zwei Produkte mit einer Größe von 2,6 kb und 3.9 kb amplifizieren. Die Sequenzierung bestätigt, dass es sich bei dem kleineren Amplifikat um die *pbl* cDNA A handelt. Das größere Produkt wird zu schwach amplifiziert, um eine ausreichend große Menge an DNA zur Sequenzierung zu gewinnen. Die Produktgröße stimmt jedoch mit der *pbl* cDNA B überein, die bei der Northern Analyse auch nur in geringen Mengen

nachweisbar ist (vgl. Abb. 14). Das zweite ‚innere‘ Primerpaar, das in Exon 3 und 13 bindet, amplifiziert auf poly(A)⁺ mRNA ebenfalls zwei Transkripte. Diesmal mit einer Größe von 2,3 kb und 3,7 kb (Abb. 15B). Bei diesen Produkten handelt es sich, wie die Sequenzierung zeigte, um die *pbl* cDNAs C und D. In diesem Fall konnte bereits bei der RT-PCR ein Produkt spezifisch amplifiziert werden, das der erwarteten *pbl* cDNA C entspricht (Abb. 15B). Mit Hilfe der verschiedenen Polymerasekettenreaktionen und den anschließenden Sequenzierungen der Amplifikate, lassen sich die vier verschiedenen *pbl* Transkripte eindeutig auf RNA-Ebene nachweisen.

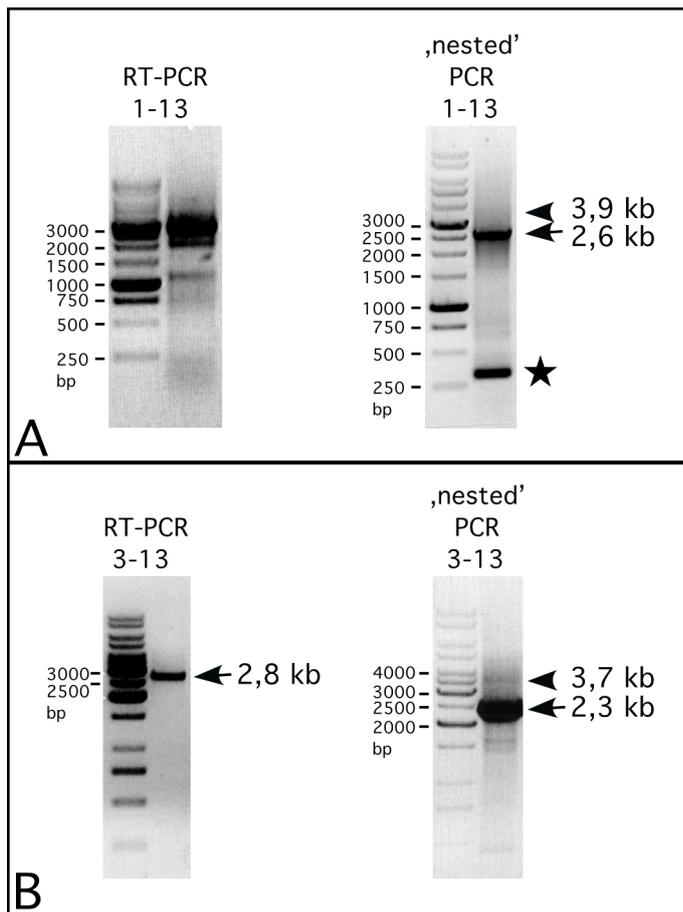
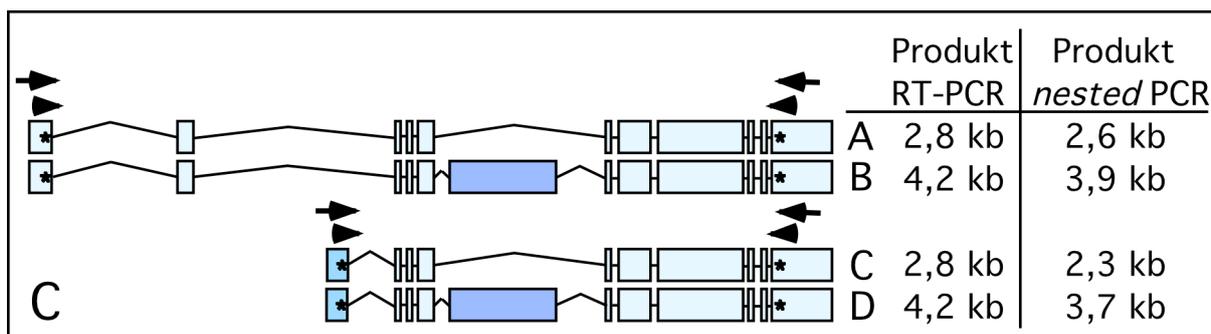


Abb. 15. Identifizierung der *pbl* Transkripte über RT-PCR. (A,B) Produkte der RT-PCR auf poly(A)⁺ RNA und anschließender *nested PCR* mit inneren Primern (wie gekennzeichnet). (A) Produkte der Primerpaare, die in Exon 1 und Exon 13 binden; die *nested PCR* amplifiziert die *pbl* mRNA A mit 2,6 kb (Pfeil) und schwächer die *pbl* mRNA B mit 3,9 kb (Pfeilspitze). Der Stern markiert ein Amplifikat von 300 bp. (B) Produkte der Primerpaare, die in Exon 3 und Exon 13 binden; in der RT-PCR und der *nested PCR* wird die *pbl* mRNA C amplifiziert (2,8 bzw. 2,3 kb; Pfeile). Die *nested PCR* amplifiziert zusätzlich die *pbl* mRNA D mit 3,7 kb (Pfeilspitze). (C) Schematische Darstellung der Primer-Ansatzstellen auf der *pbl* mRNA. Primer, die für die RT-PCR verwendet wurden sind mit Pfeilen, die für die *nested PCR* mit Pfeilspitzen markiert. Die Größen der zu erwartenden Amplifikate sind jeweils angegeben.



In Abb. 15A ist auch noch ein weiteres Amplifikat der *nested PCR* mit Primern in Exon 1 und 13, mit einer Größe von ca. 300 bp erkennbar (Stern in Abb. 15A). Dieses, relativ stark amplifizierte, PCR-Produkt wurde auch sequenziert. Es stellte sich heraus, dass es sich hierbei auch um ein *pbl* spezifisches Spleißprodukt handelt, das sich aus den Exons 1, 2, 12 und 13 zusammensetzt. Eine Computeranalyse zeigte, dass dieses ‚Transkript‘ eine schwache Homologie zu einem Protein mit einer PSI Domäne besitzt. Eine Domäne, die in Plexinen, Semaphorinen und Integrinen vorkommt. Diese PBL-Isoform wird jedoch nicht weiter untersucht, da sie im Hinblick auf die Funktion von PBL in der Mesoderm-Migration vermutlich uninteressant ist. Wie später noch deutlich werden wird, fehlen dieser Isoform Domänen, die für die Funktion von PBL in der Migration essentiell sind. Eine solche Isoform wäre höchstens interessant, falls sie regulatorisch auf andere PBL-Isoformen einwirken kann. In den folgenden Abschnitten sind die Untersuchungen zur Regulation der PBL-Funktion jedoch auf die vier vorhergesagten und bestätigten *pbl* Spleißvarianten ausgerichtet. Die *pbl* cDNAs A, B und C (sowie die kleine cDNA von 300bp) werden in einen UAS-Vektor kloniert, der die Expression in Fliegen ermöglicht. Die Herstellung transgener Fliegen ermöglicht es, die Konstrukte auf ihre Funktion hin zu testen. Im *pbl* mutanten Hintergrund kann beispielsweise getestet werden, welche cDNA die Migrationsdefekte retten kann. Da diese Konstrukte zusätzlich mit einer HA-Sequenz markiert sind, können sie auch immunhistologisch, beispielsweise in Western-Blots oder Antikörperfärbungen an Embryonen, nachgewiesen werden. Doch im nächsten Abschnitt soll zunächst die Lokalisation der verschiedenen *pbl* mRNAs untersucht werden, um erste Hinweise auf deren Funktion zu bekommen.

3.4.1.3 Lokalisation der *pbl* Transkripte während der Mesoderm-Morphogenese

Im vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass tatsächlich vier verschiedene Spleißvarianten der *pbl* mRNA existieren. Es ist daher gut vorstellbar, dass die verschiedenen Isoformen unterschiedliche Funktionen ausüben. Da sie während der Entwicklung unterschiedlich stark exprimiert werden, liegt die Vermutung nahe, dass die mRNAs, ihrer Funktion entsprechend, in verschiedenen Geweben exprimiert werden. Um zu klären, ob die differentielle Expression der *pbl* Transkripte mit einer gewebespezifischen Expression einhergeht, werden *in situ*-Hybridisierungen mit den beiden RNA Sonden an Embryonen durchgeführt. Die *in situ*-Hybridisierung mit der markierten RNA Sonde, die gegen das Exon 7 gerichtet ist, zeigt, dass die zygotische Expression der *pbl* Transkripte B und D dynamisch im Embryo erfolgt (Abb. 16). Auffallend ist die Expression im zellulären Blastoderm. Zu

einem Zeitpunkt, an dem gerade die ersten Zellen gebildet wurden, findet man die Expression entlang der ventralen Mittellinie, während die übrigen Bereiche des Mesoderm-Primordiums ausgespart bleiben (Abb. 16A). Nach der Invagination des Mesoderms kommt es innerhalb der mesodermalen Röhre zur Expression der *pbl* mRNAs B und D (Abb. 16B-D). Wie in den Querschnitten zu erkennen ist, detektiert die Sonde Exon 7 die *pbl* Transkripte vor allem in Bereichen der apikalen Konstriktion der invaginierten Röhre (Abb. 16F). Es erscheint, als ob die Transkripte während der Zellwanderung entlang der mesodermalen Zellumrisse lokalisiert sind (Abb. 16G). In diesem Stadium sind die *pbl* Transkripte in den Ektodermzellen vergleichbar lokalisiert. Das lässt vermuten, dass es sich hier nicht um eine mesodermspezifische Funktion von PBL in den Zellumrissen, beispielsweise bei der Gestaltung des Zytoskeletts handelt. Wie Abbildung 16 jedoch zeigt, wird die Expression der *pbl* mRNAs, die mit Exon 7 detektiert werden können, während der Mesoderm-Morphogenese reguliert.

Vergleichend dazu wird die Expression der *pbl* Transkripte mit Hilfe der zweiten, gegen die mRNA A gerichteten, RNA-Sonde untersucht. Wie die Northern-Blot-Analysen zeigten, ist es möglich, mit dieser Sonde alle vier *pbl* Transkripte zu detektieren. In Abbildung 17 wird deutlich, dass es keine offensichtlichen Unterschiede in der Expression, im Vergleich zur Expression der *pbl* Transkripte B und D gibt. Die Expression erfolgt auch hier in dem schmalen Steifen des Mesoderm-Primordiums, der invaginierten epithelialen Röhre und den wandernden Mesodermzellen (Abb. 17 A-G) (Smallhorn et al., 2004). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Expression auf die *pbl* Transkripte B und D zurückzuführen ist.

Die *in situ*-Hybridisierungen mit den verschiedenen Sonden zeigen zwar, dass die Expression der *pbl* Transkripte während der Mesoderm-Morphogenese reguliert wird, dennoch kann mit den gewählten mRNA Sonden kein unterschiedliches Expressionsmuster detektiert werden. Ein unterschiedliches Expressionsmuster der verschiedenen *pbl* Transkripte hätte in diesem Versuchsansatz nur gezeigt werden können, wenn sich die Transkripte, die Exon 7 enthalten, in ihrer Lokalisation klar von der Lokalisation der *pbl* mRNAs A und C abgesetzt hätten. Um herauszufinden, ob die *pbl* mRNAs dennoch unterschiedlich lokalisiert sind, müsste eine Sonde hergestellt werden, die spezifisch gegen die mRNAs A und C gerichtet ist. Dies ist jedoch nicht möglich, da die C-terminale Sequenz, in der sich diese mRNAs von B und D unterscheiden zu kurz ist, um im Experiment als Sonde verwendet zu werden.

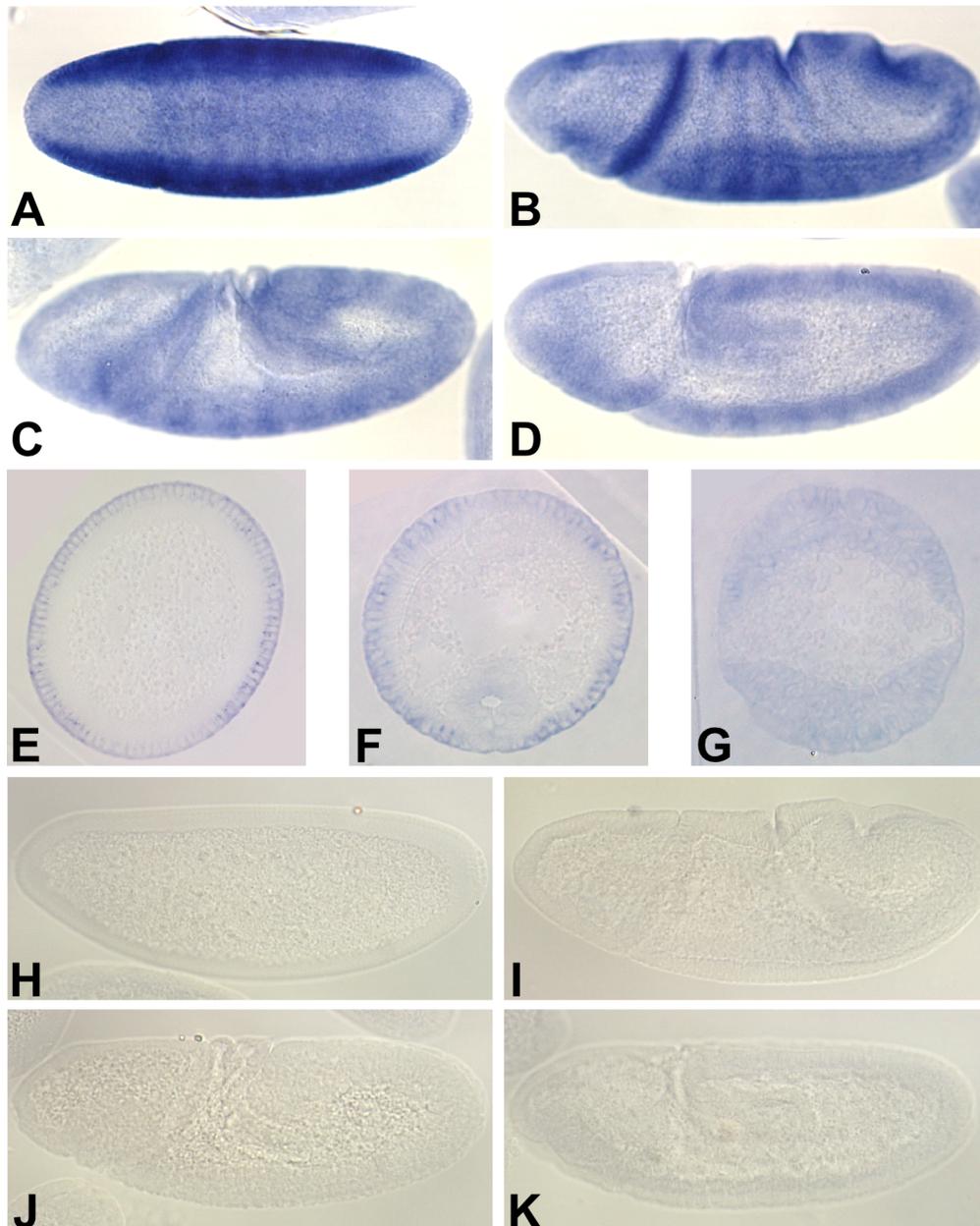


Abb. 16. Expression der *pbl* Transkripte mit Exon 7 während der Mesoderm-Morphogenese. *in situ*-Hybridisierungen an Embryonen mit der *anti-sense* (A-G) und *sense* (H-K) Probe gegen Exon 7; die *anti-sense* Probe ist der *pbl* mRNA komplementär, und sollte daher an diese binden; die *sense* Probe entspricht der *pbl* mRNA und dient daher als Negativ-Kontrolle. (A-D und H-K) laterale Gesamtansichten von Embryonen in Stadium 6 (A,H), Stadium 7 (B,I), Stadium 8 (C,J) und Stadium 9 (D,K). (E-G) Querschnitte von Embryonen in Stadium 6 (E), Stadium 7 (F) und Stadium 8 spät (G).

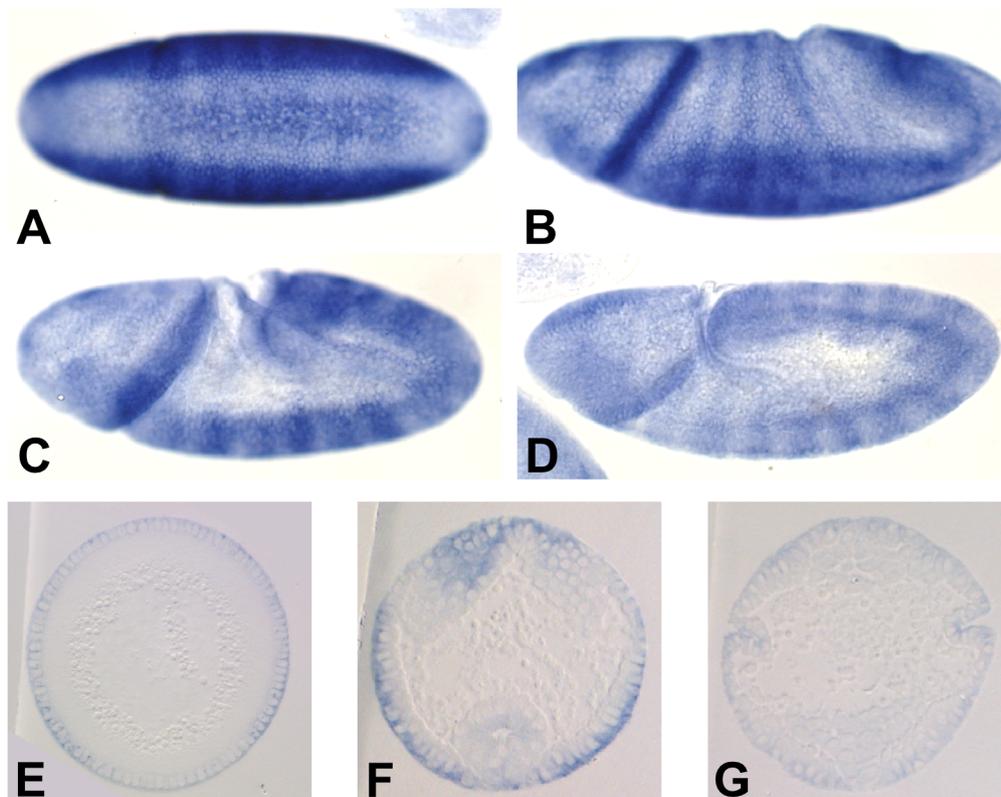


Abb. 17. Expression von *pbl* während der Mesoderm-Morphogenese. (A-D) *in situ*-Hybridisierungen an Embryonen mit der *anti-sense* Probe der *pbl* cDNA. (A-D und H-K) laterale Gesamtansichten von Embryonen in Stadium 6 (A,H), Stadium 7 (B,I), Stadium 8 (C,J) und Stadium 9 (D,K). (E-G) Querschnitte von Embryonen in Stadium 6 (E), Stadium 7 (F) und Stadium 8 spät (G).

3.4.2 Expression von PBL Protein während der Mesoderm-Morphogenese

Die *in situ*-Hybridisierung zeigt, wo die Transkription der *pbl* Transkripte verstärkt erfolgt. Dies ist meist schon ein Hinweis auf den Ort, an dem das Protein seine Funktion ausüben wird. Einen eindeutigen Beweis für die Expression eines Proteins liefert jedoch erst der immunhistologische Nachweis. Um die Funktion von PBL während der Mesoderm-Morphogenese besser zu verstehen, wird ein anti-PBL Immunsereum zum gewebespezifischen Nachweis des PBL Proteins verwendet. Theoretisch sollte der anti-PBL Antikörper alle vier PBL Isoformen erkennen, da die Region, die zur Immunisierung verwendet wurde, in jeder Isoform wieder zu finden ist (Abb. 18). Es ist jedoch auch möglich, dass die von Exon 7 kodierte Proteinsequenz die Struktur des PBL Proteins so verändert, dass der Antikörper nicht mehr binden kann.

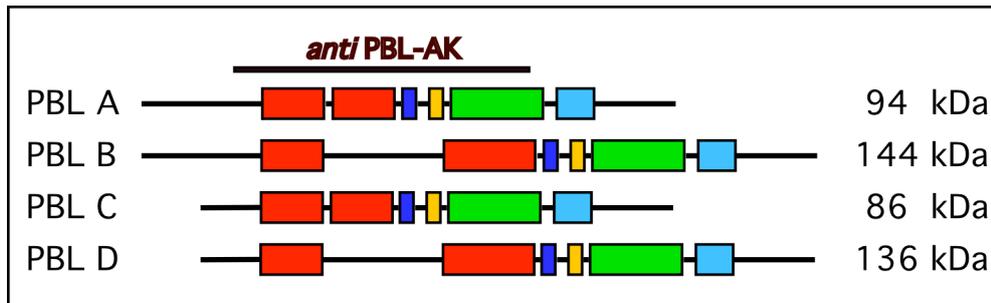


Abb. 18. Der anti-PBL Antikörper sollte alle PBL Isoformen erkennen. Die Region, die zur Herstellung des Immunsersums genutzt wurde, ist mit einem braunen Balken markiert. Die Größe der Proteine ist wie angegeben.

3.4.2.1 Nachweis von PBL mittels Western-Blot

Bevor ein Immunsersum zum Nachweis des entsprechenden Proteins im Gewebe genutzt werden kann, wird dessen Spezifität mit Hilfe eines Western-Blots getestet. Dazu trägt man Proteinextrakt aus Embryonen auf einem Proteingel auf. Die Proteine werden ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Diese wird anschließend mit dem Immunsersum inkubiert. Der Nachweis des entsprechenden Proteins erfolgt häufig über eine Chemiluminiszenz-Reaktion. Erst wenn der Antikörper spezifisch für das entsprechende Protein ist, wird er an Embryonen eingesetzt. Wie in Abbildung 19 gezeigt ist, detektiert das anti-PBL Immunsersum in Western-Blot-Analysen drei distinkte Banden mit einer Größe von 120, 44 und 48 kDa. Diese Banden werden sowohl in Proteinextrakt aus Wildtyp-Embryonen, als auch aus Embryonen, welche die *pbl* cDNA A ektopisch überexprimieren, erkannt (Abb. 19). Die detektierten Banden lassen sich nicht eindeutig den verschiedenen Isoformen des PBL Proteins zuordnen (vgl. Abb. 18). Die Bande von 120 kDa läuft für die Isoformen B und D zu tief und für die Isoform A zu hoch. Denkbar wäre jedoch eine Modifizierung des PBL Proteins A, beispielsweise durch eine Phosphorylierung. Diese könnte erklären, weshalb das Protein höher läuft, als erwartet. Bei den kleineren Banden könnte es sich um Abbaubanden handeln. Interessanterweise ergibt die Addition der Größen der Abbaubanden, die Größe von ca. 94 kDa und damit der PBL A Isoform. Dies deutet auf eine proteolytische Prozessierung von PBL hin.

Erstaunlicherweise unterscheiden sich die Banden aus Wildtyp-Extrakt und aus der Überexpression nicht in ihrer Intensität. Eigentlich würde man erwarten, dass man beim Auftrag gleicher Proteinmengen ein deutlich stärkeres Signal im Lysat der Überexpression bekommt. Man muss zudem berücksichtigen, dass nur lediglich eine *pbl* cDNA, die cDNA A, überexprimiert worden ist. Falls es sich bei den detektierten Banden um verschiedene PBL Isoformen handelt, würde man außerdem erwarten, dass sich die Intensität der Banden innerhalb der Überexpressions-Spur unterscheidet. Man findet jedoch auch in diesem

Vergleich keinen Unterschied in der Intensität. Das kann zum einen bedeuten, dass alle detektierten Banden auf die Überexpression der Isoform A zurückzuführen sind. Zum anderen kann es bedeuten, dass die Isoform A sehr instabil ist und sofort abgebaut wird. Um den verschiedenen Banden einzelne Isoformen zuordnen zu können, wäre ein Immuneserum hilfreich, das gegen ein Epitop gerichtet ist, das von Exon 7 kodiert wird.

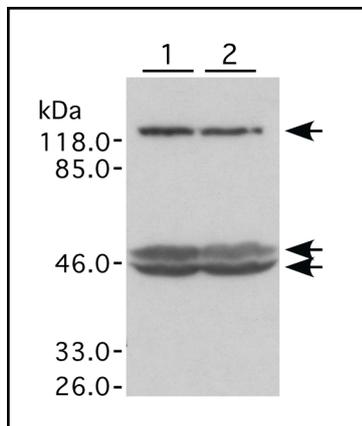


Abb. 19. Western Analyse der PBL Expression. Jede Bande enthält 50 µg Proteinextrakt aus Wildtyp-Embryonen-Lysat (Spur 1), oder aus Embryonen, welche die vollständige *pbl* cDNA A überexprimieren (*twi::Gal4; UAS::pbl^{3.2}* und *en::Gal4; UAS::pbl^{3.2}*) (Spur 2). Der anti-PBL Antikörper detektiert Proteine mit einem Molekulargewicht von 120 kDa, 46 kDa und 44kDa (Pfeile).

3.4.2.2 Ektopisch exprimiertes PBL Protein wird im Embryo erkannt

Um sicher zu gehen, dass das anti-PBL Immuneserum auch tatsächlich das PBL Protein spezifisch erkennt, wird es an Embryonen getestet, welche die *pbl* cDNA A (*UAS::pbl^{3.2}*) mit Hilfe des *UAS::GAL4*-Systems gewebespezifisch exprimieren. Neben dem Wildtyp-Hintergrund sollte der PBL Antikörper in diesen Geweben sein Epitop verstärkt erkennen. Als Treiberlinie wird zum einen der mesoderm-spezifische *twi::GAL4*-Treiber und zum anderen ein ektodermaler *engrailed* (*en*)-Treiber (*en::GAL4*) verwendet. Das *en* Gen spielt eine Schlüsselrolle bei der Segmentierung des Embryos und wird im Stadium 14 in einem sich segmental wiederholenden Muster exprimiert (Vincent und O'Farrell, 1992). Wie in Abbildung 20 zu sehen ist, erkennt das anti-PBL Immuneserum sowohl das im Mesoderm (Abb. 20A,A'), als auch das im *en*-Muster (Abb. 20B,B') ektopisch überexprimierte PBL-Protein A.

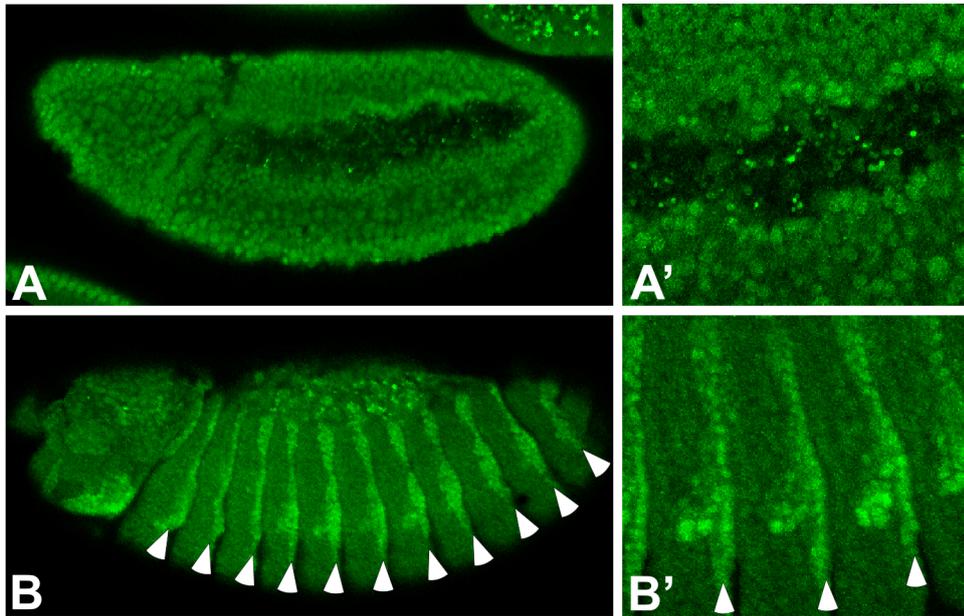


Abb. 20. PBL Immunoserum erkennt ectopisch exprimiertes PBL Protein. (A,B) laterale Ansicht von Embryonen, die *pbl* ectopisch im Mesoderm (*twi::Gal4; UAS::pbl^{3.2}*) (A,A'), oder im *en*-Muster (*en::Gal4; UAS::pbl^{3.2}*) (B,B') überexprimieren und mit anti-PBL Antikörpern gefärbt sind; die segmentale Expression des *en::GAL4*-Treibers ist mit Pfeilspitzen markiert. (A',B') Vergrößerung aus A bzw. B.

3.4.2.3 PBL Lokalisierung während der Mesoderm-Morphogenese

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Expression des PBL Proteins dynamisch innerhalb eines Zellzyklus erfolgt (Prokopenko et al., 1999). Die stärkste Expression findet man in Zellkernen, die sich in der Telophase oder der Interphase befinden. In der späten Prophase, der Metaphase und der Anaphase ist das PBL Protein nicht mehr detektierbar. Diese dynamische Expression findet man sowohl in den Zellkernteilungen des syncytialen Blastoderms, als auch im zellulären Blastoderm (Prokopenko et al., 1999; Prokopenko et al., 2000a). Während der Zytokinese der blastodermalen Zellen ist PBL auch außerhalb des Zellkerns, nämlich am Zellkortex und der Teilungsfurche lokalisiert (Prokopenko et al., 1999). Zu Beginn der Zytokinese ist PBL noch zytoplasmatisch und kortikal lokalisiert. Mit fortschreitender Zytokinese findet man eine Akkumulation des PBL Proteins entlang des Zell-Äquators. Während der Gastrulation und der Keimbandausstreckung, in Stadien in denen viele Zellen die mitotischen Zyklen 14-16 durchlaufen, findet man eine starke Anreicherung von PBL in den Zellkernen, einschließlich der Polzellen. Zum Zeitpunkt des ausgestreckten Keimstreifs ist PBL ubiquitär im Embryo verteilt (Prokopenko et al., 1999). Die starke Lokalisation von PBL im Zellkern lässt sich bisher nicht erklären. Die Lokalisation entlang der Teilungsfurche stimmt mit der Funktion von PBL bei der Initiierung des kontraktiven Ringes überein (Prokopenko et al., 1999). Für die Funktion von PBL bei der Vermittlung von Zellformveränderungen während der Mesoderm-Migration, würde man ebenfalls eine

Lokalisierung des PBL Proteins außerhalb des Zellkerns vermuten. Falls PBL beispielsweise auch in diesem Zusammenhang an der Umgestaltung des Aktinzytoskeletts beteiligt ist, würde man eine Lokalisierung in Zellen, die eine apikale Konstriktion durchlaufen, oder in den Zellfortsätzen wandernder Mesodermzellen erwarten. Weiterhin wäre die Lokalisierung von PBL in den Mesodermzellen an Kontaktpunkten zum Ektoderm oder zu mesodermalen Nachbarzellen denkbar, falls PBL eine Rolle bei der Vermittlung der Zelladhäsion spielt. Daher soll in dieser Arbeit das anti-PBL Immunsereum genutzt werden, um über die Lokalisierung des PBL-Proteins innerhalb der Mesodermzellen, einen Hinweis auf dessen dortige Funktion zu bekommen.

Zunächst wird die endogene Verteilung des PBL Proteins während der mesodermalen Zellwanderung im Wildtyp-Embryo untersucht. Wie in den Querschnitten in Abbildung 21A-D zu erkennen ist, wird PBL während der Mesoderm-Morphogenese sowohl im Ektoderm, als auch im Mesoderm exprimiert. Eine Expression, wie sie auch schon für die *pbl* Transkripte gezeigt werden konnte (vgl. Abb. 16 und 17). Während das PBL Protein im Ektoderm hauptsächlich im Zellkern vorliegt, ist es im Mesoderm auch im Zytoplasma lokalisiert. Zusätzlich sind in den Bereichen der apikalen Konstriktion der prä-mesodermalen, ventralen Zellen des Blastoderms, lokale Anreicherungen des PBL Proteins zu erkennen (Abb. 21B). In der Phase der aktiven Zellwanderung ist das PBL Protein, wie auch schon das *pbl* Transkript, entlang der Zellumrisse verteilt (Abb. 21D und vgl. Abb. 16C und 17 C). Die Verteilung von PBL in den Zellumrissen ist auch in den lateralen Ansichten von Mesodermzellen während der drei Phasen der mesodermalen Zellwanderung zu erkennen (Abb. 21E-J). Die Zellumrisse sind zusätzlich mit einer Antikörperfärbung gegen das mesodermspezifisch exprimierte Transgen CD2 (*twi::CD2*) gekennzeichnet. In der ersten Phase der Zellwanderung, in der die mesodermalen Zellen Kontakt zum Ektoderm aufnehmen, ist das PBL Protein entlang der abgerundeten Zellform zu erkennen (Abb. 21E,H). In den Gastrulationsstadien 8 und 9, der Phase der aktiven Zellwanderung findet man das PBL Protein in den, für diese Phase charakteristischen, Zellfortsätzen (Abb. 21F,G,I,J). PBL scheint jedoch nicht direkt mit dem Transmembranprotein CD2 zusammen zu lokalisieren, vielmehr scheint es in den Zellfortsätzen lokalisiert zu sein, was mit einer Funktion von PBL in der Bildung von Zellausläufern übereinstimmen würde.

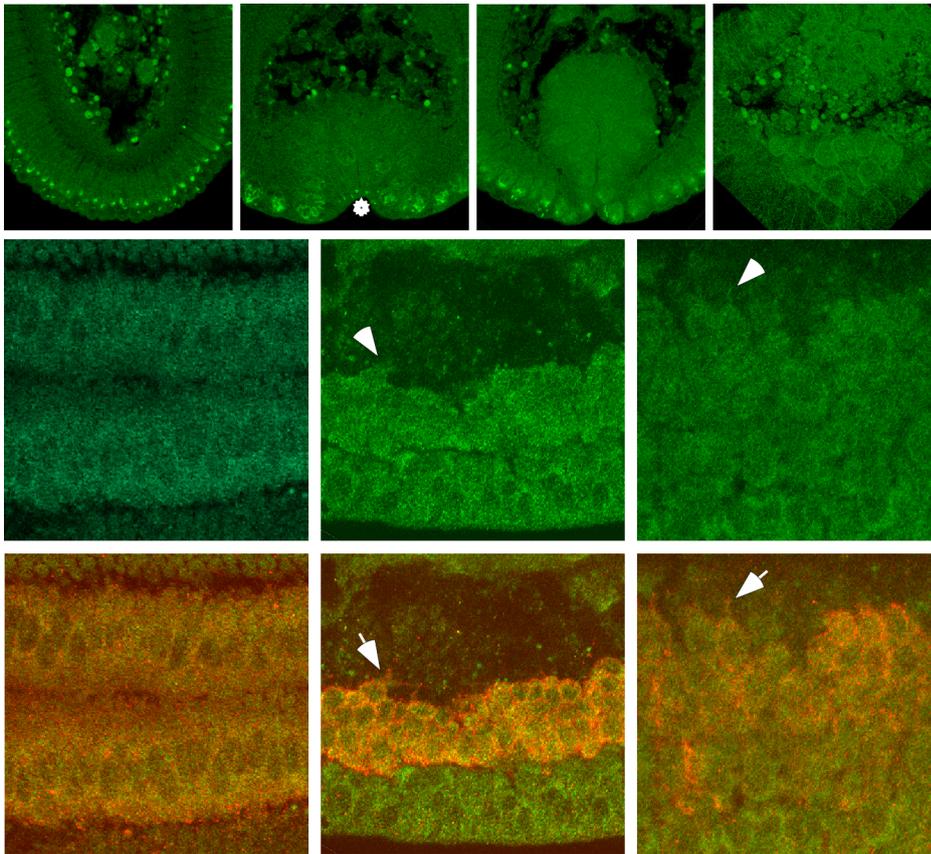


Abb. 21. Expression von PBL Protein während der Mesoderm-Morphogenese. (A-J) Wildtyp-Embryonen, die *twi::CD2* exprimieren und mit anti-PBL (grün) und anti-CD2 (rot) Antikörpern gefärbt sind. (A-D) Querschnitte von Embryonen. (A) Stadium 6. (B) Stadium 6-7. (C) Stadium 7; der Stern markiert den Bereich, in dem die apikale Konstriktion zur Bildung der Ventralfurche führt; in den apikalen Bereichen dieser Zellen kommt es zur Anhäufung des PBL Proteins. (D) Stadium 8. (E,H) ventraler Ausschnitt einer konfokalen Schichtaufnahme durch die invaginierte mesodermale Röhre eines Embryos in Stadium 7. (F,G,I,J) laterale Ansichten von Embryonen in Stadium 8 (F,I) und im späten Stadium 8 (G,J). Die Lokalisation von PBL in den zellulären Fortsätzen ist mit Pfeilspitzen (F,G) oder Pfeilen (I,J) markiert.

Eine interessante Sicht auf die Verteilung des PBL Proteins findet sich auch beim Fokussieren durch den Embryo. In dem Bereich, wo in Phase 1 die Kontaktaufnahme vom invaginierten Epithel zum Ektoderm stattfindet, kommt es zu einer Anreicherung des PBL Proteins (Abb. 22A,A',B,B'). Diese Anreicherung kann sowohl aus der ventralen (Abb. 22A,A'), als auch aus der lateralen Sicht (Abb. 22B,B') beobachtet werden. Die Lokalisation von PBL kann jedoch nur nach einer Fixierung der Embryonen mit einer 4%-igen Formaldehyd-Lösung nachgewiesen werden. Verwendet man hingegen die Methode der Hitzefixierung, wird mit dem anti-PBL Immunsereum hauptsächlich zellkernlokalisiertes PBL Protein detektiert (Abb. 22C,C',D,D') (Prokopenko et al., 2000a). Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Lokalisation des PBL Proteins bei den verschiedenen Fixiermethoden ist, dass bei der Hitzefixierung zytoplasmatische Komponenten entfernt werden und das anti-PBL Immunsereum sein Epitop nur noch im Zellkern vorfindet. Bei der Formaldehyd-Fixierung bleiben auch Komponenten im Zytoplasma erhalten, an die der PBL Antikörper binden kann.

Daher findet man bei diesem Fixierungsverfahren auch eine Lokalisation von PBL außerhalb des Zellkerns.

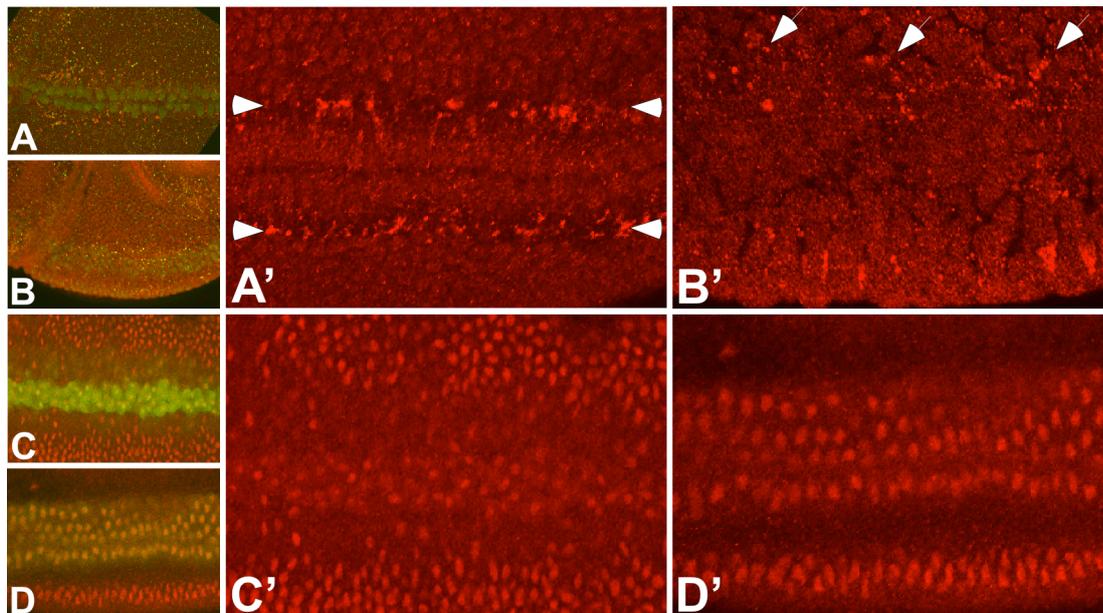


Abb. 22. Unterschiede in der Detektion von PBL Protein bei verschiedenen Fixierungsverfahren. (A-D) Wildtyp-Embryonen werden mit 4%-iger Formaldehyd-Lösung (A,B) oder durch Hitze (C,D) fixiert und mit anti-PBL (rot) Antikörpern und anti-TWI (grün) Antikörpern gefärbt. Fokussierung auf die ventralen Kontaktpunkte in Stadium 7 (A,C) oder die lateralen Kontaktpunkte in Stadium 8 (B,D) des Mesoderms zum Ektoderm. (A',B',C',D') entsprechende Vergrößerungen; Lokalisation von PBL an den Kontaktpunkten parallel zur ventralen Mittellinie (Pfeilspitzen in A'), oder entlang der lateral gelegenen Mesodermzellen (Pfeile in B').

Um auszuschließen, dass es sich bei der Lokalisation von PBL an den Kontaktpunkten nicht um ein Artefakt handelt, sollen vergleichend Embryonen untersucht werden, die eine Defizienz für das *pbl* Gen besitzen. Dabei stellt sich jedoch heraus, dass *pbl* eine starke maternale Komponente besitzt, deren Genprodukte auch noch in den Gastrulationsstadien nachweisbar sind (Abb. 23). Daher kann dieses Experiment nicht als Kontrolle der Lokalisation des Antikörpers herangezogen werden. Zu diesem Zweck müssten *pbl* Keimbahnklone untersucht werden, denen auch die maternale Komponente fehlt.

Falls sich die Lokalisierung von PBL außerhalb des Zellkerns bestätigt, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass PBL während der Mesoderm-Migration eine Funktion bei der Herstellung und/ oder der Aufrechterhaltung des Zellkontaktes zum Ektoderm besitzt.

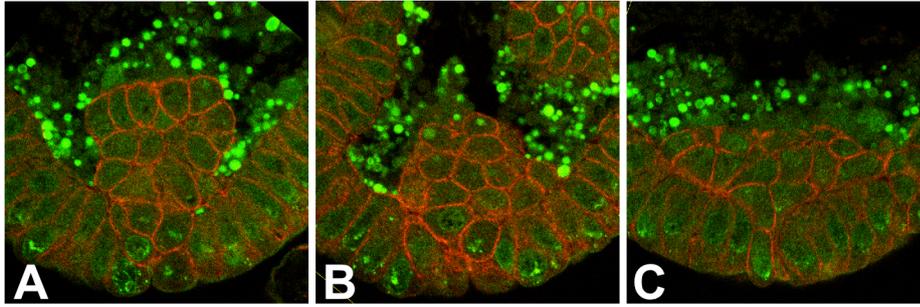


Abb. 23. Expression von maternalem PBL Protein während der Mesoderm-Morphogenese. (A-C) Embryonen, die homozygot für eine Defizienz von *pbl* sind (*Df(3L)pbl^{NR}*), wurden mit anti-PBL (grün) und anti-NRT (rot) Antikörpern gefärbt; die stark grün leuchtenden Punkte im Innern der Embryonen sind auf eine unspezifische Kreuzreaktion des PBL Antikörpers mit den Dotterschollen zurückzuführen. (A) Stadium 7. (B) Stadium 8. (C) Stadium (9).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die immunhistologischen Untersuchungen mit dem PBL Antikörper weitere Hinweise auf eine Funktion von PBL bei der Veränderung der mesodermalen Zellform und Zellbewegung gebracht haben. Es konnte eine Lokalisierung von PBL außerhalb des Zellkerns gezeigt werden, die auf eine intrazelluläre Funktion bei der Vermittlung von Formveränderung schließen lassen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass PBL sowohl bei der Zellbeweglichkeit, als auch bei der Zelladhäsion eine Rolle spielt. Die Lokalisierung des PBL Proteins entlang der ventralen Furche spricht für eine Funktion von PBL bei der apikalen Konstriktion der prä-mesodermalen Zellen. Die Lokalisierung in den Zellfortsätzen deutet auf eine Funktion bei der Umgestaltung des Aktinzytoskeletts zur Ausbildung von Zellfortsätzen an der Zellfront des Mesoderms hin. Zusätzlich scheint PBL in die Adhäsion der Mesodermzellen zur extrazellulären Matrix, oder innerhalb der Mesodermzellen involviert zu sein. Einen genaueren Einblick in die Funktion von PBL während der Mesoderm-Migration wird die Expression der HA-markierten PBL-Fusionsproteine liefern. Diese Konstrukte haben den Vorteil, dass man die Lokalisierung der einzelnen Isoformen gezielt untersuchen kann. Außerdem kann mit Hilfe von Western-Blot-Analysen gezeigt werden, welche PBL-Isoformen von dem existierenden Immunsereum erkannt werden. Auf diese Weise können auch die bisher detektierten Banden der Western-Blot-Analyse eindeutig den einzelnen Isoformen zugeordnet werden.

3.4.3 Funktionsanalyse von PBL

Die Existenz verschiedener PBL Isoformen wäre eine plausible Erklärung dafür, dass PBL verschiedene Funktionen erfüllen kann. Es ist gut vorstellbar, dass die verschiedenen Isoformen über unterschiedliche Domänen verfügen, die eine entsprechende Funktionalität vorgeben. Im nächsten Abschnitt soll daher die Proteinstruktur von PBL näher untersucht werden. In Abbildung 24 sind die vorhergesagten PBL Isoformen mit den entsprechenden Domänen veranschaulicht. Die verschiedenen Isoformen unterscheiden sich jedoch nicht in Bezug auf zusätzliche funktionelle Domänen in der Proteinstruktur (Abb. 24).

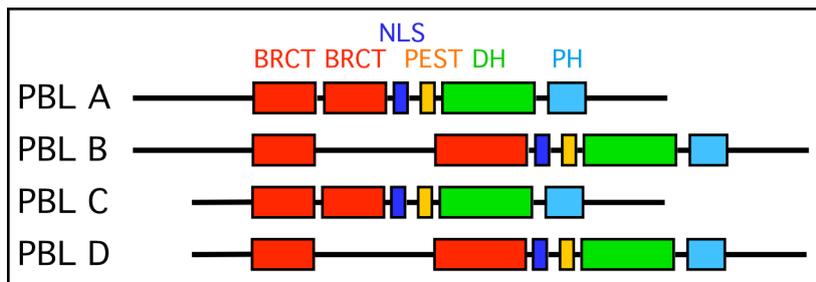


Abb. 24. Schematische Darstellung der vorhergesagten Protein-Domänen der verschiedenen PBL Isoformen. Die Vorhersagen beziehen sich auf das Smart-Programm des EMBL-Heidelbergs (<http://smart.embl-heidelberg.de>). (BRCT) BRCA1 Carboxyl Terminus; (DH) Dbl Homologie; (NLS) Kern-Lokalisations-Signal; (PEST) Proteolytisches-Degradations-Signal; (PH) Pleckstrin Homologie.

Die Isoformen A und B unterscheiden sich von den Isoformen C und D durch das Vorhandensein des ersten und zweiten Exons. Für die Sequenz der Exons 1 und 2 sind jedoch keine zusätzlichen N-terminalen Domänen vorhergesagt, welche die Funktionsweise der Isoformen PBL A und B gegenüber den Formen C und D verändern würden. Das zweite Kriterium, in dem sich die Isoformen voneinander unterscheiden, ist das Vorhandensein, oder die Abwesenheit von Exon 7. Dieses Exon kodiert für eine zusätzliche BRCT Domäne. Da die zweite BRCT Domäne der Isoformen A und C von Exon 6 und 8 kodiert wird, ergibt sich durch das Einfügen von Exon 7 eine größere zweite BRCT Domäne in den Isoformen B und D. Es erscheint daher unwahrscheinlich, dass die Funktionsweise von PBL über unterschiedliche Domänen innerhalb der verschiedenen Isoformen reguliert wird. Interessant ist jedoch eine Konsensussequenz für eine MAPK-Phosphorylierungsstelle in Exon 7 (Pro,Ser,Thr,Pro) (Clark-Lewis et al., 1991). Eine Phosphorylierung könnte beispielsweise die Substratspezifität der PBL-GEF-Domäne modifizieren.

Um eine genauere Vorstellung der Funktionsweise zu bekommen, sollen einerseits die Auswirkungen einzelner Mutationen im *pbl* Gen im Hinblick auf die veränderte Funktionsweise untersucht werden, und andererseits die gezielte Herstellung von Deletionskonstrukten bei der Strukturanalyse helfen.

3.4.3.1 Funktionsanalyse verschiedener *pbl* Allele

Eine einfache Methode die Funktion eines Proteins zu untersuchen ist die *forward* Genetik. Bei dieser Methode wird ausgehend von einem mutanten Phänotyp einer bestimmten Mutation, ein Rückschluss auf die endogene Funktion dieses Proteins gezogen. In dieser Arbeit wird diese Methode angewendet, um ausgehend von verschiedenen, bereits existierenden *pbl* Allelen, die Funktionalität einer Domäne in Bezug auf die Mesoderm-Migration zu erschießen. Zu diesem Zweck werden Embryonen, welche die verschiedenen *pbl* Allele tragen, im Hinblick auf Defekte in der Mesoderm-Migration und der Zytokinese untersucht. Parallel dazu werden die verschiedenen *pbl* Allele sequenziert. Die Sequenzierung ermöglicht den Rückschluss auf die beeinträchtigte funktionelle Domäne. Als Hilfsmittel zur Analyse der Mesoderm-Defekte wird erneut die EVE-Expression in den Mesodermderivaten im Stadium des ausgestreckten Keimstreifs genutzt. Die Anzahl EVE-positiver Hemisegmente pro Embryo ist in Tabelle 2 dargestellt. Defekte in der Zytokinese werden über die EVE-Expression in den ventral gelegenen Neuroblasten im Stadium 10 der Embryonalentwicklung detektiert. Wie in Abbildung 25 zu sehen ist, zeigen die untersuchten *pbl* Allele verschieden stark ausgeprägte Phänotypen in der Mesoderm-Migration, während die Defekte in der Zytokinese in allen Allelen, mit Ausnahme von *pbl^{E091}*, sichtbar sind. Dies ist ein gutes Zeichen dafür, dass die Funktion von PBL tatsächlich über verschiedene Domänen reguliert wird.

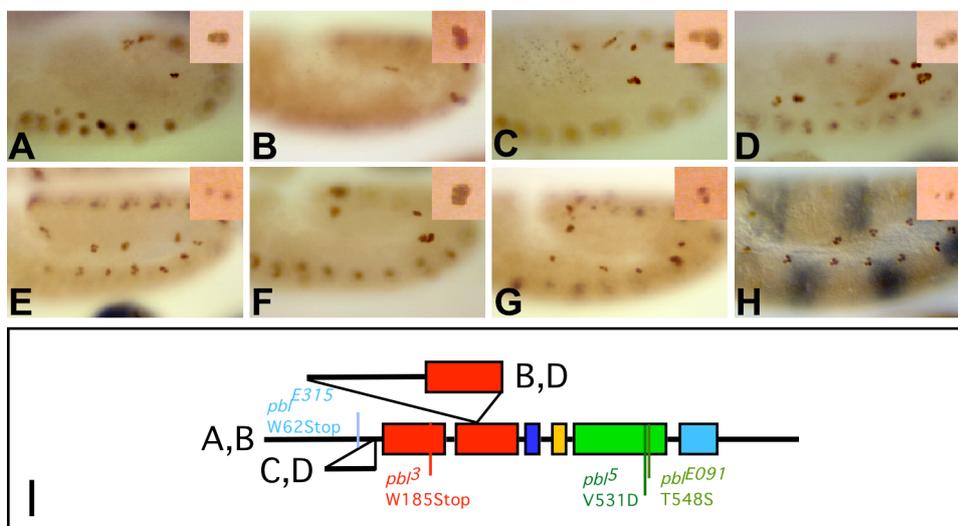


Abb. 25. Struktur- und Funktionsanalyse verschiedener *pbl* Allele. (A-H) laterale Ansichten von Embryonen in Stadium 10-11, die mit Antikörpern gegen das EVE (braun) Protein und das βGAL (blau) Protein gefärbt sind. In der oberen rechten Ecke ist jeweils ein Neuroblast, aus dem entsprechenden Embryonen in Stadium 10, nach der ersten Zellteilung gezeigt. (A) *pbl^l*, (B) *pbl³*, (C) *pbl⁵*, (D) *pbl^{l1D}*, (E) *pbl^{E091}*, (F) *pbl^{E312}*, (G) *pbl^{E315}* und (H) Wildtyp-Embryo. (I) schematische Darstellung der Mutationen in den verschiedenen *pbl* Allelen, in Bezug auf die PBL Isoformen.

<i>pbl</i> Allel	EVE pos. Hemisegmente/ Embryo	Zytokinese- defekt	Mutation	betroffene Isoformen
1	1,9 ($\sigma = 1,4$; n = 45)	ja	1,8,9,10,11,12 keine Mutation	n.d.
3	1,4 ($\sigma = 1,2$; n = 136)	ja	Punkt-Mut. W185Stop 1. BRCT-Dom.	A,B,C,D
5	0,7 ($\sigma = 0,8$; n = 47)	ja	Punkt-Mut. DH-Dom.	A,B,C,D
11D	11,7 ($\sigma = 3,6$; n = 42)	ja	keine Mutation im ORF	-
E091	20,4 ($\sigma = 0,7$; n = 21)	nein	T548S DH-Dom.	A,B,C,D
E312	3,7 ($\sigma = 2,9$; n = 26)	ja	n.d.	n.d.
E315	9,1 ($\sigma = 3,9$; n = 55)	ja	Punkt-Mut. W62Stop	A,B

Tab. 2. Strukturfunktionsanalyse der verschiedenen *pbl* Allele. Positionsangaben der betroffenen Aminosäuren beziehen sich auf die Isoform PBL A; für das *pbl¹* Allel sind die sequenzierten Exons als Zahlen angegeben; n.d. nicht determiniert.

In den folgenden Abschnitten sind verschiedene Beispiele der analysierten *pbl* Allele aufgeführt, die eine Aussage über die Funktionalität des PBL Proteins machen. Zunächst können die bekannten Mutationen in dem *pbl³* und dem *pbl⁵* Allel bestätigt werden (Tab. 1) (Prokopenko et al., 1999). Im *pbl³* Allel führt eine *nonsense* Mutation, welche die erste BRCT Domäne betrifft, zur Expression einer trunkierten Version des PBL Proteins. Dieses trunkierte Protein kann weder die Funktion von PBL in der Zytokinese, noch in der Migration ausüben (Abb. 25B und Tab. 3). Einen ähnlich starken Phänotyp wie im *pbl³* Allel würde man auch im *pbl^{E315}* Allel erwarten. Im *pbl^{E315}* Allel findet man im zweiten Exon eine *nonsense* Mutation, die sich auf Proteinebene als trunkiertes PBL Protein mit 61 Aminosäuren auswirken sollte. Während der Ablauf der Zytokinese in diesen Embryonen beeinträchtigt ist, findet man bezüglich der Migration jedoch nur schwache Defekte (Abb. 25G und Tab. 3). Eine Erklärung für den abgeschwächten Phänotyp des *pbl^{E315}* Allels findet man im Hinblick auf die verschiedenen Spleißvarianten von *pbl*. Die Mutation im zweiten Exon betrifft nämlich nur die *pbl* mRNAs A und B (Abb. 25I). Alle übrigen bisher sequenzierten Allele beinhalten Mutationen, die alle vier Spleißvarianten betreffen. Das *pbl^{E315}* Allel ist somit im Hinblick auf die Funktionsanalyse von PBL sehr interessant, da dieses Ergebnis darauf hindeutet, dass die *pbl* mRNAs A und B in ihrer Funktion in einem gewissen Maß, durch die anderen beiden mRNAs C und D ersetzt werden können. Die mRNAs A und B sind daher nicht essentiell für die Migration, oder die *pbl* mRNAs verhalten sich redundant zueinander.

Mindestens eine der Isoformen A und B scheint für die Funktion von PBL in der Zytokinese eine essentielle Rolle zu spielen, da dieser Defekt penetrant zu sein scheint. Eine genauere

Aussage bezüglich dieser Funktion wäre erst bei einer quantitativen Auswertung der Zytokinesedefekte möglich. Der Migrations-Phänotyp deutet darauf hin, dass alle Isoformen von PBL während der mesodermalen Zellwanderung redundant zu agieren scheinen. Diese Untersuchungen erklären auch die bereits veröffentlichten Analysen eines weiteren *pbl* Allels, *pbl²* (Smallhorn et al., 2004). Dieses Allel kodiert für eine noch stärker trunkierte Version des PBL Proteins, da es eine *nonsense* Mutation in Aminosäure 37 (Q37Stop, bezogen auf die Isoform PBL A) trägt (Prokopenko et al., 1999). In transheterozygoten *pbl²/pbl³* Embryonen findet man jedoch eine Anzahl von durchschnittlich 7 EVE positiven Hemisegmenten pro Embryo, wobei die Anzahl bis hin zu 18 variieren kann (Smallhorn et al., 2004). Auch auf der zellulären Ebene findet man in den *pbl²/pbl³* Embryonen variable Phänotypen, die bis hin zur Ausbildung eines einschichtigen Epithels führen, während die Defekte in der Zytokinese eindeutig nachzuweisen sind (Smallhorn et al., 2004). Unter Berücksichtigung der verschiedenen *pbl* Isoformen, kann dieses Ergebnis quasi als eine Rettung des *pbl³* Phänotypen durch die Präsenz der, im *pbl²* Allel nicht betroffenen, Isoformen C und D erklärt werden.

Diese Analysen bestätigen somit das Ergebnis, dass auch die *pbl* Isoformen C und D eine Funktion in der Mesoderm Migration spielen und vermutlich redundant zu den beiden anderen Isoformen wirken können. Wie die Vorhersage der Domänen-Struktur der Isoformen bereits vermuten lässt, wird die Funktion von PBL in der Mesoderm-Migration nicht durch eine bestimmte Isoform reguliert. Es stellt sich daher die Frage, wie die vier Isoformen in ihrer Funktion reguliert werden können. So wäre zum Beispiel die Modifizierung des Proteins durch Ubiquitinierung oder Phosphorylierung denkbar. Eine Ubiquitinierung könnte beispielsweise den proteolytischen Abbau einzelner Isoformen in bestimmten Geweben fördern, während eine Phosphorylierung beispielsweise die Spezifität der katalytischen DH/PH Domäne von PBL beeinflussen könnte. Auf diese Möglichkeiten der Modifizierung von PBL wird in der Diskussion noch ausführlicher eingegangen.

3.4.3.2 Die Substratspezifität von PBL

PBL wurde als ein putativer RhoGTP Austauschfaktor identifiziert, der spezifisch in der Zytokinese des Zellzyklus benötigt wird (Hime und Saint, 1992; Lehner, 1992; Prokopenko et al., 1999). Die Funktion von PBL als GEF beruht auf der Anwesenheit zweier charakteristischer Domänen, der DH und der PH Domäne (Whitehead et al., 1997). Punktmutationen oder Deletionen innerhalb der DH Domäne reduzieren oder unterbinden gar die GEF-Aktivität (Hart und Roberts, 1994; Liu et al., 1998; Ron et al., 1991; Steven et al., 1998; Whitehead et al., 1995). Da sich die Funktion von PBL in der Zytokinese genetisch von

der Funktion in der Migration trennen lässt, soll untersucht werden, ob PBL in beiden Fällen als GEF agiert. Um zu testen, ob die DH Domäne von PBL während der Mesoderm-Migration essentiell ist, wird das *pbl*⁵ Allel im Hinblick auf Defekte in der mesodermalen Zellwanderung untersucht. Das *pbl*⁵ Allel besitzt eine Punktmutation in einer konservierten Region der DH Domäne, der CR3 Domäne (Whitehead et al., 1997). Bei der CR3 Domäne handelt es sich um eine, von drei konservierten Regionen (*conserved regions*; CR) der DH Domäne innerhalb der Mitglieder der Dbl Familie. In diese Region wird auf Proteinebene eine α -Helix-Struktur ausgebildet, die den Nukleotidaustausch ermöglicht (Liu et al., 1998). Die Punktmutation im *pbl*⁵ Allel führt zum Austausch der hoch konservierten hydrophoben Aminosäure Valin gegen die hydrophile Asparaginsäure (V531D). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der DH-Domäne durch den Austausch der konservierten hydrophoben Reste, signifikant reduziert wird (Liu et al., 1998; Prokopenko et al., 1999). In Übereinstimmung mit diesen Daten, findet man in homozygot mutanten *pbl*⁵ Embryonen starke Defekte in der Zytokinese, die auf den Verlust der GEF-Aktivität von PBL zurückzuführen sind (Abb. 25C). In Folge der Zytokinesedefekte entstehen in *pbl*⁵ mutanten Embryonen zweikernigen Zellen im zentralen Nervensystem, die durch die Expression des EVE-Proteins gekennzeichnet sind. Die Migrationsdefekte werden bei der Betrachtung der Mesodermderivate deutlich. In homozygot mutanten *pbl*⁵ Embryonen findet man, im Vergleich zu 22 EVE-positiven Hemisegmenten im Wildtyp-Embryo, eine Reduktion auf durchschnittlich 0,7 EVE-positive Hemisegmente pro Embryo (Abb. 25C und Tab. 2) (Smallhorn et al., 2004). Die Anzahl der EVE-positiven Hemisegmente ist somit sogar niedriger als in homozygot mutanten *pbl*³ Embryonen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aktivität von PBL als GEF sowohl für die Zytokinese, als auch für die mesodermale Zellwanderung notwendig ist.

Einen weitaus schwächeren Phänotyp bezüglich beider Funktionen findet man in Embryonen, die das *pbl*^{E091} Allel tragen. In diesen Embryonen ist die Anzahl der Eve-positiven Hemisegmente im Durchschnitt nur um eins geringer, als im Wildtyp. Betrachtet man zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung die EVE-exprimierenden Zellen des zentralen Nervensystems, scheinen sich auch Defekte in der Zytokinese nicht vollständig auszuprägen (Abb. 25E und Tab. 2). Der Grund für diese schwache Beeinträchtigung der PBL Funktionalität liegt vermutlich in der Punktmutation, welche zu einem Aminosäureaustausch in der DH Domäne des PBL Proteins führt. Threonin wird durch Serin ersetzt. Dabei handelt es sich um einen Austausch von Aminosäuren mit ähnlichen biophysikalischen Eigenschaften, in einer nicht konservierten Region der DH Domäne (Liu et al., 1998). Auf

diese Weise lässt sich der schwache Phänotyp dieses *pbl* Allels bezüglich der Migration und der Zytokinese erklären.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die katalytische Funktion von PBL auch für die Entwicklung des Mesoderms notwendig ist. Ein Verlust der GEF Aktivität von PBL führt in den *pbl* mutanten Embryonen zu gleich starken Defekten in der Zytokinese. Es stellt sich jedoch die Frage, weshalb die Defekte in der Mesoderm-Migration nicht gleich stark ausgeprägt werden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass PBL die Aktivität verschiedener GTPasen fördert. Die Spezifität für eine GTPase, deren Aktivität von PBL in der Zellmigration reguliert wird, könnte in den verschiedenen Allelen unterschiedlich stark beeinträchtigt sein.

Bisher konnte im Zwei-Hybrid-System der Hefe eine biochemische Interaktion von PBL mit RHO1 nachgewiesen werden (Prokopenko et al., 1999). Diese *in vitro* Interaktion konnte auch genetisch bestätigt werden (Prokopenko et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass PBL während der Zytokinese als GEF für RHO1 wirkt und die Bildung des kontraktiven Ringes ermöglicht (Prokopenko et al., 1999; Prokopenko et al., 2000b; Tatsumoto et al., 1999). Es stellt sich daher die Frage, ob RHO1 auch als Substrat von PBL in der Migration dient. Um zu klären, ob PBL auch in der Lage ist, andere GTPasen zu aktivieren, werden zunächst in einem biochemischen Experiment sechs verschiedene *Drosophila* GTPasen der Rho-Familie auf eine Interaktion mit PBL hin getestet. Neben RHO1, RHOL und CDC42 werden auch die drei GTPasen der Rac-Familie, RAC1, RAC2 und MTL1 in einem GDP-GTP-Austausch-Experiment *in vitro* getestet (Abb. 26). Zu diesem Zweck werden die GTPasen mit GDP beladen, das mit Tritium (^3H) markiert ist. Die GTPasen werden anschließend mit Proteinen inkubiert, die eine katalytische GEF-Aktivität besitzen. Die GEF-Domänen können an ihrer spezifischen GTPase den Austausch von ^3H -GDP durch unmarkiertes (kaltes) GTP fördern. Dieser Austausch wird nachgewiesen, indem man die Radioaktivität der Probe vor und nach der Inkubation mit dem GEF-Protein vergleicht. Das Maß an freigesetztem ^3H -GDP zeigt die Spezifität der GEF-Domäne für eine bestimmte GTPase. Im folgenden Experiment wird die DH-Domäne von PBL auf ihre Fähigkeit hin getestet, den Austausch von radioaktiv markiertem GDP durch kaltes GTP zu fördern, und damit die entsprechende GTPase zu aktivieren. Da auch die DH-Domäne als GST-Fusionsprotein exprimiert wurde, wird eine Negativ-Kontrolle mit einem GST-Protein durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle dient ein GST-Fusionsprotein, das die erste GEF-Domäne (DH-PH-Domäne) von Trio besitzt. Trio ist ein weiterer Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor in *Drosophila*, für dessen erste GEF-Domäne, in solch einem biochemischen Ansatz, eine

spezifische Interaktion mit den drei Rac-GTPasen gezeigt werden konnte (Newsome et al., 2000).

Wie in Abbildung 26 zu erkennen ist, ist die DH-Domäne von PBL dazu in der Lage, das radioaktivmarkierte, an RHO1 gebundene, GDP signifikant gegen kaltes GTP auszutauschen. Die DH-Domäne von PBL fördert ebenfalls - wenn auch in einem geringeren Ausmaß - den ³H-GDP-Austausch von RAC1 und RAC2. Das GST-Protein hat, wie erwartet, keinen Einfluss auf die GTPasen, während die GEF-Domäne von Trio den ³H-GDP-Austausch der Rac-GTPasen fördert. Dieses biochemische Experiment bestätigt zum einen die Interaktion von PBL mit RHO1 *in vitro* und zeigt überdies hinaus, dass die DH-Domäne von PBL ausreicht, um dessen GEF-Funktion zu gewährleisten. Zum anderen kann hier erstmals auch eine biochemische Interaktion von PBL mit RAC1 und RAC2 gezeigt werden. Es ist daher vorstellbar, dass die Funktion von PBL über die Spezifität der DH-Domäne reguliert wird.

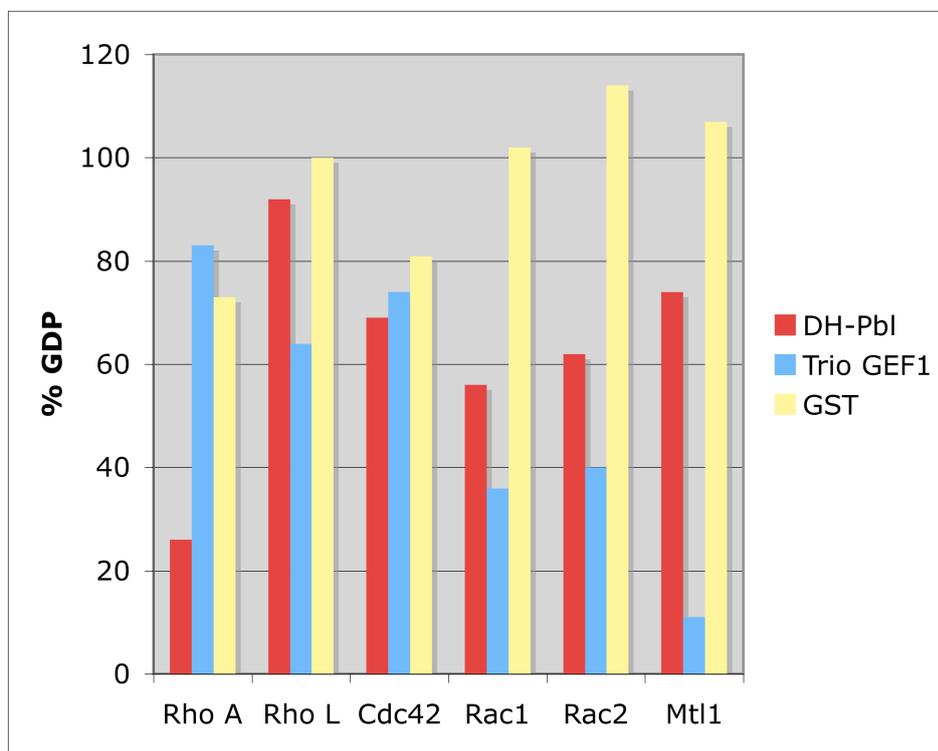


Abb. 26. GDP/GTP-Austauschaktivität der DH Domäne von PBL. Verschiedene GTPasen (X-Achse) werden mit radioaktivmarkiertem ³H-GDP beladen und mit GST Fusionsproteinen der DH-Domäne von PBL und der ersten GEF Domäne von Trio oder GST für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wird gemessen, wie viel ³H-GDP nach der Inkubation noch gebunden ist. Gebundenes ³H-GDP ist als Quotient aus [GDP] (t=0 Minuten) und [GDP] (t=20 Minuten) dargestellt (Y-Achse).

Wenn PBL in der Mesoderm-Migration als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor für RHO1 wirkt, sollte die Reduktion der RHO1-Funktion während der Mesoderm-Morphogenese zu einem mutanten Phänotyp führen, der dem *pbl* mutanten Phänotyp ähnelt. Wie bereits gezeigt

werden konnte, besitzt *Rho1* jedoch eine starke maternale Komponente, welche die Ausprägung mutanter Phänotypen während der Embryogenese weitgehend verhindert. Obwohl RHO1 das Substrat von PBL während der Zytokinese ist, findet man in *Rho1* mutanten Embryonen lediglich in der Kopfreion zweikernige Zellen, nicht jedoch im Ektoderm (Prokopenko et al., 1999). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine dominant negative Form von *Rho1*, *Rho1^{N19}*, einen ähnlichen und teilweise auch stärkeren Phänotyp als die Funktionsverlust-Mutation in *Rho1* zeigt (Prokopenko et al., 1999). Die Mutation in *Rho1^{N19}* führt dazu, dass RHO1 irreversibel an GEFs bindet. *Rho1^{N19}* wirkt dominant negativ, da das mutierte RHO1 Protein an GEFs bindet und letztere daran hindert natürliche GTPasen zu aktivieren (Hall, 1998; Strutt et al., 1997). Da *Rho1^{N19}* in Bezug auf die Zytokinese einen stärkeren Effekt zeigt, als die *Rho1* Mutante, wird dieses Transgen im folgenden Abschnitt auch genutzt, um die Funktion von RHO1 in der Mesoderm-Migration zu untersuchen (Abb. 27) (Prokopenko et al., 1999; Strutt et al., 1997).

Wie erwartet zeigt die mesodermspezifische Überexpression des UAS::*Rho1^{N19}* Konstruktes in den Mesodermzellen die Blockierung der Zytokinese (Abb. 27A). Die Wanderung der Mesodermzellen ist durch die Überexpression von *Rho1^{N19}* jedoch nicht beeinträchtigt. So bilden die Mesodermzellen in Phase 2 der Wanderung lateral ausgerichtete Zellfortsätze und infolge der korrekten Ausbreitung des Mesoderms, wird die volle Anzahl EVE-positiver Hemisegmente exprimiert (Abb. 27A,B). Um die Aktivität der RHO1-spezifischen GEFs im Mesoderm noch stärker im Mesoderm einzuschränken, wird dieses Experiment mit einer weiteren Treiberlinie durchgeführt. In diesem Stamm steht die *Gal4* Sequenz unter der Kontrolle des *Dmef2 Enhancers* (*Dmef2::Gal4*) (Ranganayakulu et al., 1996). Das Gen *Dmef2* (*Drosophila myocyte enhancing factor 2*) wird bereits in den ventralen Zellen des zellulären Blastoderms exprimiert (Bour et al., 1995). Doch auch mit dieser Treiberlinie wird die mesodermale Zellwanderung nicht beeinträchtigt (Abb. 27C). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die GEF Funktion von PBL, die für die Migration notwendig ist, nicht die Aktivität von RHO1 regelt. Es ist zu vermuten, dass PBL tatsächlich RAC1 und/oder RAC2 aktiviert, und diese GTPasen in der Mesoderm-Migration eine Rolle, beispielsweise bei der Bildung von Lamellipodien spielen. Außerdem unterstützt dieses Experiment die Aussage, dass PBL zwei unabhängige Funktionen in der Embryonalentwicklung von *Drosophila* hat, und die fehlerhafte Migration nicht eine Folge der Zytokinesedefekte ist.

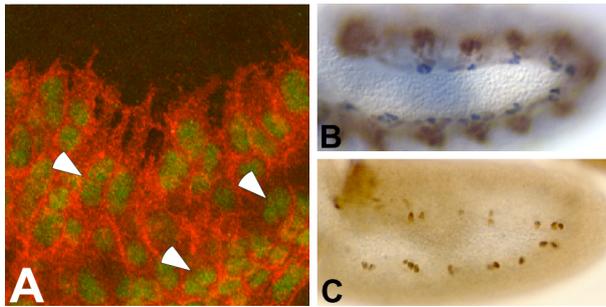


Abb. 27. Phänotyp von *Rho1^{N19}* im Mesoderm. (A,B,C) Embryonen, die *UAS::Rho1^{N19}* mit dem *twi::Gal4* (A,B) oder dem *Dmef2::Gal4* (C) Treiber exprimieren. (A) Embryo in Phase 2, der zusätzlich *twi::CD2* exprimiert und mit anti-CD2 (rot) und anti-TWI (grün) Antikörpern gefärbt ist; mehrkernige Zellen sind mit Pfeilspitzen markiert. (B) Färbung eines Embryos in Stadium 11 mit Antikörpern gegen das EVE (blau) und das TWI (braun) Protein. (C) Antikörperfärbung eines Embryos in Stadium 11 gegen das EVE (braun) Protein.

3.4.3.3 Funktionsanalyse mit Hilfe von Deletionskonstrukten

Die Funktionsanalyse der verschiedenen *pbl* Allele soll im folgenden Abschnitt durch die Herstellung von Deletionskonstrukten unterstützt werden. Durch die Klonierung bestimmter Fragmente der cDNA und deren Expression in Fliegen, können Varianten von PBL hergestellt werden, denen bestimmte Domänen fehlen. Diese Methode hat den Vorteil, dass einzelne Domänen gezielt ausgeschaltet werden können. Einzelne Konstrukte können beispielsweise auf ihre Fähigkeit hin getestet werden, den mutanten *pbl* Phänotyp zu retten.

Zur Herstellung der verschiedenen Deletionskonstrukte wird die *pbl* cDNA A verwendet, deren vollständige Sequenz, bei mesodermspezifischer Überexpression, den Mesoderm-Migrationsdefekt in *pbl* mutanten Embryonen retten kann (Abb. 10). Die von der *pbl* cDNA A kodierten Domänen sind in Abbildung 28 dargestellt. Um herauszufinden, ob der C-Terminus von PBL, der die DH-Domäne, die benachbarte PH-Domäne und die C-terminale Region einschließt, die Funktionalität von PBL in der Migration erfüllen kann, wird ein Konstrukt hergestellt, in dem der übrige N-Terminus deletiert ist (Δ N-PBL) (Abb. 28A). Das Δ N-PBL-Konstrukt (*UAS::pbl^{ΔN}*) wird mesodermspezifisch im *pbl* mutanten Hintergrund überexprimiert, um dessen Fähigkeit, den Migrations-Phänotypen zu retten, zu testen. Wie in der Diskussion noch ausführlicher erläutert wird, führt die Interaktion der BRCT Domänen mit dem C-Terminus von ECT2 zu einer intramolekulare Inhibierung des Proteins und die Deletion der BRCT Domänen führt daher zu einer konstitutiven Aktivierung des Proteins (Schmidt und Hall, 2002; Zheng, 2001). Unter Berücksichtigung dieser Daten würde man eine konstitutive Aktivität des Δ N-PBL-Konstruktes erwarten, die sich im *pbl* mutanten Hintergrund durch die Migration der Mesodermzellen äußert. Das Konstrukt Δ N-PBL ist jedoch nicht dazu in der Lage die Wanderungsdefizite in *pbl* mutanten Embryonen auszugleichen (Abb. 28E,F,G). Das Mesoderm breitet sich unregelmäßig im Innern des Embryos aus (Abb. 28F) und die Differenzierung zu Perikardialzellen findet wie in den *pbl* mutanten Embryonen nicht statt (Abb. 28E,G).

Das Δ N-PBL-Konstrukt scheint dennoch einen dominanten Effekt in der Entwicklungsphase auszuüben, denn die Überexpression im Wildtyp führt zu embryonaler Letalität. Wie die Kutikula-Präparation zeigt, bilden sich in diesen Embryonen anteriore Löcher, die Ausbildung des Mundskeletts unterbleibt und die Keimstreifrückziehung wird nicht abgeschlossen (Abb. 28B). Untersucht man Embryonen, die heterozygot für das Δ N-PBL-Konstrukt sind, findet man einen Mesodermphänotyp, der dem *pbl* Phänotyp ähnelt (Abb. 29D). Das konstitutiv-aktive Konstrukt, Δ N -PBL, scheint sich in Bezug auf die Ausbreitung des Mesoderms wie eine dominant negative Form von PBL zu verhalten. In den Regionen, in denen die Mesodermzellen die Differenzierungssignale erhalten, findet man jedoch große Zellgruppen von EVE-positiven Perikardialzellen (Abb. 28C). Den Grund dafür erkennt man bei der Betrachtung der Querschnitte dieser Embryonen (Abb. 29). Zu Beginn der Gastrulation invaginieren die Mesodermzellen nicht in das Innere des Embryos (Abb. 29A,D). Beim Übergang in Phase 2 der Mesoderm-Migration, verlieren sie ihren epithelialen Charakter und liegen mehrschichtig aufeinander auf (Abb. 29A,D). Im Stadium der mesodermalen Zellwanderung gelingt es den Mesodermzellen dennoch, sich ansatzweise auf dem Ektoderm auszubreiten (Abb. 29B,E). In Phase 3 der Mesoderm-Migration ist diese Ausbreitung fortgeschritten (Abb. 29C,F). Es kommt jedoch zu einer unregelmäßigen Ausbreitung des Mesoderms, die auch schon in der lateralen Ansicht der Embryonen zu erkennen ist (vgl. Abb. 28D). In den Bereichen, in denen die Mesodermzellen die Differenzierungssignale erhalten, werden entsprechende Mesodermderivate ausgebildet.

Der zuvor beschriebene Phänotyp erinnert an die Folgen des Verlustes von *DRhoGEF2*, eines weiteren GEFs in *Drosophila*. *DRhoGEF2* ist für die frühen Zellformveränderungen in der *Drosophila* Morphogenese verantwortlich (Barrett et al., 1997; Hacker et al., 1997). In *DRhoGEF2* mutanten Embryonen findet die apikale Konstriktion auf der ventralen Seite der zellularisierten Embryonen nur vereinzelt statt. Während der Zellwanderung verbleibt das Mesoderm an der Oberfläche des Embryos. Dieser Defekt ist auch bei der mesodermalen Überexpression des Δ N-PBL Konstruktes zu erkennen (Abb. 29D). Weitere Übereinstimmungen der beiden Phänotypen sind die fehlende Keimstreifstreckung und die fehlende Invagination der mesodermalen und ektodermalen Primordien. Die unvollständige Ausstreckung des Hinterdarms bei Überexpression des Δ N-PBL Konstruktes kann man in bereits in der lateralen Ansicht erahnen (Abb. 28D). Besser ist es im Querschnitt des Embryos in Stadium 10 zu erkennen (Abb. 29F). In diesem Stadium ist die Keimstreifstreckung im Wildtyp abgeschlossen und das Mesoderm daher vollständig auf dem dorsalen Ektoderm ausgebreitet (vgl. Abb. 29C). Wie man an der Kutikula sehen kann, scheint auch der Rückzug

des Keimstreifs nicht richtig zu funktionieren. Die ähnlichen Phänotypen, die bei der Überexpression des Δ N-PBL Konstruktes beziehungsweise in *DRhoGEF2* mutanten Embryonen entstehen, sprechen dafür, dass das Δ N-PBL Konstrukt mit dem Signalweg von *DRhoGEF2* interferiert.

Erstaunlicherweise sind die beobachteten Phänotypen, die durch die Überexpression des Δ N-PBL Konstruktes entstehen, bei der Expression in einem *pbl* mutanten Hintergrund abgeschwächt (Abb. 28F und Abb. 29G-I). Bereits in der lateralen Ansicht ist zu erkennen, dass sich der Keimstreif weiter gestreckt hat (Abb. 28F). Daher ist auch im Querschnitt eines Embryos in diesem Entwicklungsstadium die Ausbreitung des Mesoderms auf dem dorsalen Ektoderm zu erkennen (Abb. 29I). Bereits die ersten Stadien der Mesoderm-Morphogenese zeigen, dass das Mesoderm in der Lage ist, in den Embryo zu invaginieren (Abb. 29G). Dies wird auch im Vergleich der lateralen Ansicht deutlich (Abb. 28F). Nur vereinzelt findet man in späten Stadien der Mesoderm-Morphogenese noch mesodermale Zellen, die nicht invaginiert sind (Pfeile in Abb. 28F und 29I). Dennoch kann die Ausbreitung des Mesoderms auf dem Ektoderm in den *pbl* mutanten Embryonen nicht durch die Expression des Δ N-PBL Konstruktes gerettet werden (Abb. 29H,I). Da die Mesodermzellen nicht ihre laterale Endposition erreichen, unterbleibt die Differenzierung zu EVE-positiven Perikardialzellen (Abb. 28E). Das Δ N-PBL Konstrukt rettet den *pbl* Phänotyp auch nicht auf der Ebene der Zytokinese. Die Defekte in der Zytokinese sind durch die mehrkernigen Mesodermzellen gut zu erkennen (Pfeile in Abb. 29H,I).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Δ N-PBL Konstrukt weder dazu in der Lage ist, die Zytokinese-, noch die Migrationsdefekte in einem *pbl* mutanten Hintergrund zu retten. Die DH-Domäne, die PH-Domäne und der C-Terminus des PBL Proteins reichen somit nicht aus, um die Funktion von PBL in der Zytokinese und der Migration zu erfüllen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass ein PBL Konstrukt, das zusätzlich die Zellkernlokalisationssequenz (NLS) und die PEST Sequenz enthält, die Migrationsdefekte, nicht aber die Zytokinesedefekte, retten kann (Smallhorn et al., 2004). Unter Berücksichtigung der vorangehenden Daten, zeigt dieses Experiment, dass die N-terminalen BRCT Domänen nur für die Funktion von PBL in der Zytokinese notwendig sind (Somers und Saint, 2003). Im Hinblick auf die vorangehenden Daten kann zusätzlich die Aussage gemacht werden, dass die NLS und / oder die PEST Domäne für die Funktion von PBL in der Migration notwendig sind. Bei der vergleichenden Interpretation der Daten muss jedoch berücksichtigt werden, dass in der genannten Publikation nicht die mesodermspezifische

Treiberlinie *twi::GAL4* zur Expression des Konstruktes genutzt wurde. Ein direkter Vergleich ist daher nicht uneingeschränkt möglich.

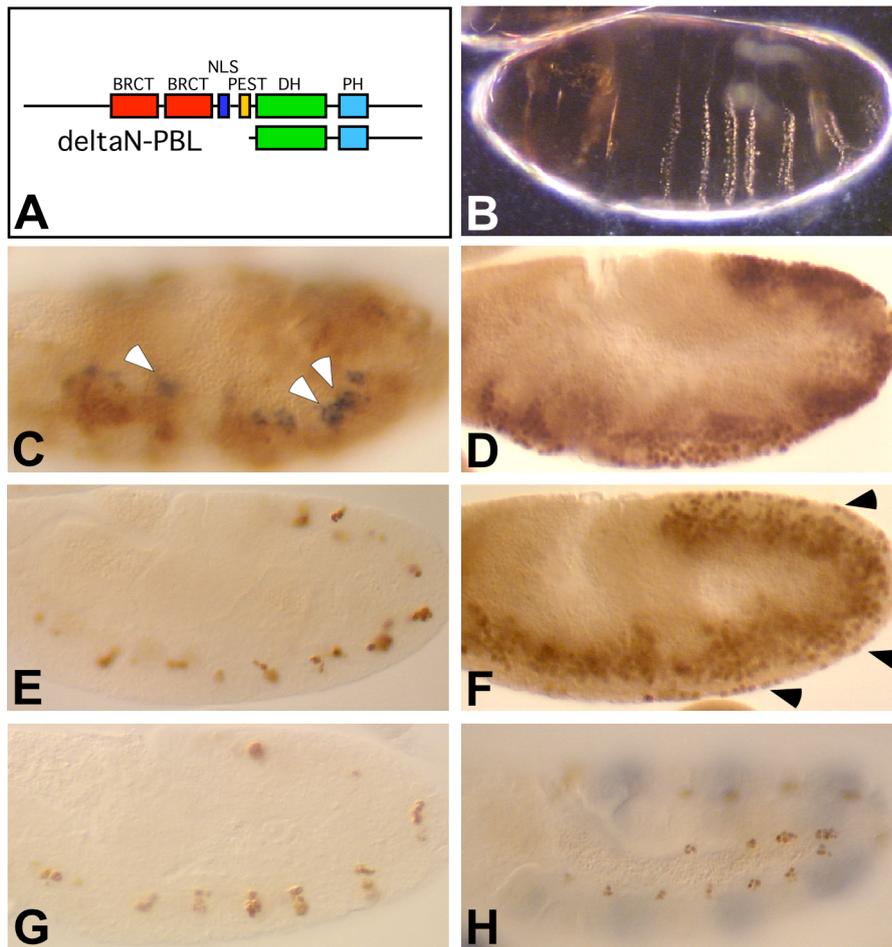


Abb. 28. Funktionsanalyse von PBL mit Hilfe des N-terminalen Deletionskonstruktes. (A) schematische Darstellung des Deletionskonstruktes Δ N-PBL im Vergleich zur Isoform PBL A. (B) Kutikula-Präparation eines Embryos, der das Δ N-PBL Konstrukt im Mesoderm exprimiert (*twi::Gal4; UAS::pbl^{AN}*). (C,D) laterale Ansicht von *twi::Gal4; UAS::pbl^{AN}* Embryonen in Stadium 11 (C) und 9 (D), die mit Antikörpern gegen das TWI (braun) und das EVE (blau) Protein gefärbt sind; Pfeilspitzen markieren in C die Expression des EVE Proteins in großen Zellaggregaten. (E,F) Embryonen in Stadium 11 (E) und 9 (F), die das Δ N-PBL Konstrukt im *pbl* mutanten Hintergrund exprimieren (*twi::Gal4; UAS::pbl^{AN}, pbl³/Df(3L)pbl^{NR}*) und mit Antikörpern gegen das EVE (braun, E) oder das TWI (braun, F) Protein gefärbt sind; Pfeilspitzen in F markieren Mesodermzellen, die nicht in das Innere des Embryos invaginiert sind. (G) *pbl³/Df(3L)pbl^{NR}* mutanter Embryo in Stadium 11, der mit anti-EVE Antikörpern gefärbt ist. (H) Heterozygoter *pbl* Embryo, der das Δ N-PBL Konstrukt exprimiert (*twi::Gal4; UAS::pbl^{AN}, pbl³/TM3[ftz::lacZ]*) und mit Antikörpern gegen das EVE (braun) Protein und das β GAL (blau) Protein gefärbt ist.

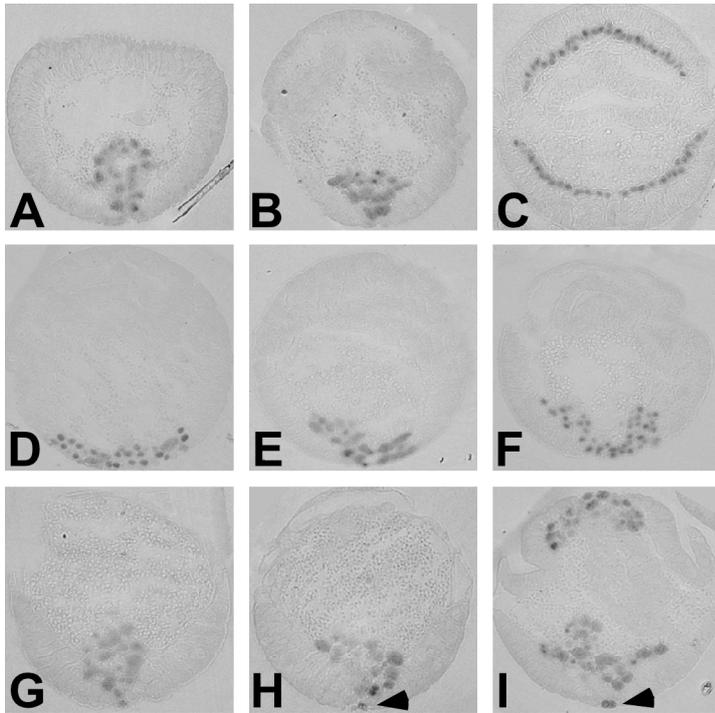


Abb. 29. Defekte in der Mesoderm-Morphogenese nach Überexpression von Δ N-PBL. (A-I) Querschnitte aus Embryonen, die mit anti-TWI Antikörpern gefärbt worden sind. (A,D,G) Stadium 7, (B,E,H) Stadium 8, (C,F,I) Stadium 9. (A-C) Wildtyp-Embryonen. (D-F) Wildtyp-Embryonen, die das Δ N-PBL Konstrukt im Mesoderm exprimieren (*twi::Gal4; UAS::pbl^{ΔN}*). (G-I) Embryonen, die das Δ N-PBL Konstrukt im *pbl* mutanten Hintergrund exprimieren (*twi::Gal4; UAS::pbl^{ΔN}, pbl³ / Df(3L)pbl^{NR}*); vereinzelte Mesodermzellen, die nicht in das Innere des Embryos invaginiert sind, sind in H und I mit Pfeilspitzen gekennzeichnet.

4 Diskussion

4.1 Frühe Zellformveränderungen während der Mesoderm-Morphogenese

Der Prozess der Ausbreitung des Mesoderms auf dem Ektoderm ähnelt in vielerlei Hinsicht, den in der Einleitung beschriebenen Migrationsprozessen. Ein wichtiges Kennzeichen der mesodermalen Zellwanderung ist auch hier der Übergang vom epithelialen zum mesenchymalen Zellcharakter. Eingeleitet wird dieser Prozess vermutlich während einer Initialisierungsphase, in der die basalen Zellen des invaginierten Mesoderms den Kontakt zum Ektoderm herstellen.

Anders als beispielsweise in der Seeigel-Blastula, geht im *Drosophila* Embryo die Gastrulation dem Epithel-Mesenchym-Übergang voran. Die basalen Zellen, die nach der Invagination den Kontakt zum Ektoderm herstellen, liegen im zellulären Blastoderm am weitesten von der Ventralfurche entfernt. Es wäre daher vorstellbar, dass die abgeschlossene Invagination dadurch angezeigt wird, dass die basalen Mesodermzellen den Kontakt zum Ektoderm herstellen. Vermutlich werden daraufhin weitere Signalwege angeschaltet, welche die Zellform so verändern, dass eine Migration möglich ist. Man könnte vermuten, dass der Verlust der epithelialen Zellstruktur eine Folge der Kontaktaufnahme in der Initialisierungsphase ist. Doch in Embryonen, die mutant für die das Gen *pbl* sind, findet die Kontaktaufnahme durch die basalen Mesodermzellen nicht statt. Die invaginierten Mesodermzellen verlieren dennoch ihren epithelialen Zellcharakter. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Kontaktaufnahme der Mesodermzellen nicht der Auslöser für den Epithel-Mesenchym-Übergang ist. Es ist vorstellbar, dass der erste Kontakt zur Differenzierung der basalen Mesodermzellen führt. Die Differenzierung könnte durch die Expression von Genprodukten gekennzeichnet sein, die eine Zellformveränderung als Grundlage der Mesoderm-Migration ermöglichen. Diese Genprodukte stünden dann zur Verfügung, wenn die führenden Mesodermzellen mit der dorsolateralen Migration beginnen. Die basalen Zellen unterscheiden sich von den übrigen Mesodermzellen beispielsweise durch die Aktivität der MAP-Kinase. Die Aktivierung der MAP-Kinase kann beispielsweise auf der Ebene der Genexpression regulierend auf die Differenzierung von Zellen einwirken. In einem solchen Modell würde man allerdings davon ausgehen, dass die Mesodermzellen, die zuerst im Kontakt zum Ektoderm stehen, auch die Zellen der führenden mesodermalen Zellfront im Wanderungsprozess sind.

Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass sich die übrigen Mesodermzellen, nach dem Zerfall der invaginierten Röhre, weiter lateral befinden. In diesem Fall käme dem Zellkontakt der basalen Mesodermzellen immer noch die Funktion zu, dass die invaginierte Röhre der Mesodermzellen symmetrisch zur ventralen Mittellinie verankert wird. Wie in *htl* mutanten Embryonen gezeigt werden konnte, kommt es bei fehlendem Kontakt der basalen Zellen zum Ektoderm zur asymmetrischen Verteilung der Mesodermzellen nach dem Epithel-Mesenchym-Übergang. Egal, nach welchem Modell der Zerfall der invaginierten Röhre erfolgt, den basalen Mesodermzellen kommt in der Initialisierungsphase der Mesoderm-Migration eine Schlüsselfunktion zu. Selbst wenn die Mesodermzellen im Laufe der dritten Phase der Mesoderm-Migration doch noch in der Lage sind, sich auf dem Ektoderm auszubreiten, können die Defekte, die aus der Verzögerung der fehlenden Initialisierungsphase entstanden sind, nicht mehr behoben werden.

Diese Beobachtungen stimmen mit einem Modell überein, in dem HTL als permissiver Faktor in der Mesoderm-Migration agiert. In einem solchen Modell, ist die Aktivierung des von *htl* kodierten FGF-Rezeptors notwendig, um der Zelle die Differenzierung zu ermöglichen, die für die Veränderung der Zellform notwendig ist. Dies kann beispielsweise über die Aktivierung der MAP-Kinase erfolgen, welche die Genexpression entsprechend beeinflusst. Möglich ist aber auch die Aktivierung eines Signalwegs, der direkt auf der Ebene des Zytoskeletts zu einer Veränderung der Zellform führt. Können die extrazellulären Signale nicht durch den FGF-Rezeptor wahrgenommen werden, sind die Mesodermzellen nicht in der Lage sich auf dem Mesoderm auszubreiten. Erst in einem späteren Stadium, in Phase 3 der Mesoderm-Migration, scheinen die Zellen nicht mehr auf die permissive Funktion von HTL angewiesen zu sein, da sie sich auch in Abwesenheit des FGF-Rezeptors auf dem Ektoderm ausbreiten. Es ist möglich, dass HTL die Wanderung der Mesodermzellen in dieser Phase der Migration instruktiv beeinflusst. Dafür sprechen die nicht strikt lateral ausgerichteten Zellausläufer in *htl* mutanten Embryonen. In einem solchen Modell besitzt HTL zunächst eine permissive, und später eine instruktive, das heißt eine richtungweisende, Funktion. Dieses Modell stimmt auch mit der dynamischen Expression der FGF-Liganden im Ektoderm übereinstimmen (Gryzik und Müller, 2004; Stathopoulos et al., 2004).

Im Gegensatz zu HTL scheint es sich bei PBL um eine essentielle Komponente der mesodermalen Zellmigration zu handeln, da Zellformveränderungen in *pbl* mutanten Embryonen vollständig blockiert sind. Die Untersuchung *pbl* mutanter Embryonen bestätigt, dass es sich bei dem Verlust des epithelialen Zellcharakters der invaginierten Mesodermzellen um ein paralleles, unabhängiges Ereignis handelt, das von der Initialisierung der

Zellmigration getrennt werden kann. Die Vermutung liegt nahe, dass PBL über die Regulation der kleinen GTPasen RAC1 und/oder RAC2 direkt an der Umgestaltung des Zytoskeletts beteiligt ist. Es ist möglich, dass PBL in der Initialisierungsphase mit dem von HTL-vermittelten Signalweg interagiert. Bisher ist nicht bekannt, wie extrazelluläre Zellformveränderungen über die Aktivierung von RTKs regulieren. Im nächsten Abschnitt sollen daher die Argumente diskutiert werden, die für oder gegen eine Funktion von PBL in dem von HTL-vermittelten Signalweg sprechen.

4.2 Die Funktion von PBL im Hinblick auf den HTL/MAPK-Signalweg

Bisher ist nur wenig darüber bekannt, wie die von HTL vermittelte Signalkette zu Veränderungen auf zellulärer Ebene führt. Es ist daher gut vorstellbar, dass PBL in diesem Zusammenhang eine Schlüsselfunktion zukommt. Das PBL Protein wird ebenfalls im Mesoderm exprimiert und wirkt dort autonom in Bezug auf die Mesoderm-Migration. Außerdem stimmen die frühen Phänotypen von *htl* und *pbl* mutanten Embryonen überein. Beide Proteine werden zur Herstellung des Kontaktes der invaginierten Mesodermzellen zum Ektoderm in Phase 1 benötigt. Da der Phänotyp in beiden Mutanten vollständig penetrant ist, wirken die Genprodukte nicht redundant. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass PBL und HTL in einem gemeinsamen Signalweg agieren, obwohl die Aktivierung der MAPK auch in *pbl* mutanten Embryonen stattfindet. In einer zwischenzeitlich veröffentlichten Publikation wird gezeigt, dass die Aktivierung der MAP-Kinase in Phase 1 der Mesoderm-Migration in *pbl* mutanten Embryonen nicht nachweisbar ist (Wilson et al., 2005). Dies lässt sich jedoch dadurch erklären, dass der Kontakt der basalen Zellen zum Ektoderm notwendig ist, um extrazelluläre Signale zu empfangen, die für die Aktivierung der MAPK notwendig sind.

Bisher ist nicht bekannt, ob die Aktivierung der MAP-Kinase eine direkte, oder eine indirekte Antwort auf das HTL Signal ist. Indirekt wäre die Aktivierung beispielsweise als Folge einer HTL-vermittelten Zellformveränderung. Gegen eine indirekte Aktivierung der MAP-Kinase durch HTL spricht jedoch, dass sie auch in *pbl* Mutanten, in denen Zellformveränderungen unterdrückt sind, stattfindet. Es bleibt jedoch zu klären, ob die Zellformveränderungen ein Resultat der MAP-Kinase bei der Genregulation auf der Transkriptionsebene sind, oder ob die MAPK über einen weiteren Signalweg direkten Einfluss auf die Zellgestalt besitzt. Gegen eine Funktion der MAP-Kinase auf Transkriptionsebene spricht der enge zeitliche Rahmen weniger Minuten, in dem die Initiierung der Migration stattfindet. Falls also ein paralleler Signalweg zu Zellformveränderungen führt, ist es gut vorstellbar, dass PBL an dieser Signalweiterleitung beteiligt ist.

Alternativ könnten die HTL-vermittelten Zellformveränderungen über andere Wege, als den MAPK-Signalweg gesteuert werden. Ein solcher Signalweg könnte sich beispielsweise durch verschiedene Adaptorproteine direkt unterhalb des aktivierten FGF-Rezeptors abzweigen. Für ein solches Modell würde sprechen, dass trotz der MAPK-Aktivierung im *pbl* mutanten Hintergrund Zellformveränderungen unterbleiben. Vergleicht man die verschiedenen Migrationssysteme während der Entwicklung von *Drosophila*, stellt man fest, dass RTKs in viele unterschiedliche Migrationsprozesse involviert sind. Da die Signalwege viele gemeinsame Komponenten besitzen, stellt sich die Frage, wie die RTKs dennoch verschiedene Migrationsprozesse regulieren können. Es gibt Hinweise darauf, dass die Spezifität der RTKs durch verschiedene Adaptormoleküle reguliert wird, die an die intrazelluläre Domäne der Rezeptoren binden (Pawson und Scott, 1997). So binden FGF-Rezeptoren im Gegensatz zu anderen RTKs nicht direkt an das konservierte Adapterprotein DRK. Vermutlich wird diese Bindung erst durch DOF vermittelt (Klint et al., 1995; Kouhara et al., 1997). CSW ist für die FGF-abhängige Bildung der Herzvorläuferzellen und die Entwicklung des Tracheensystems notwendig (Gabay et al., 1997b; Johnson Hamlet und Perkins, 2001; Perkins et al., 1996). Die Rekrutierung von CSW zum Signalkomplex könnte eine weitere Funktion von DOF als Adaptermolekül sein (Petit et al., 2004; Wilson et al., 2004). Über die Signalweiterleitung solcher Adaptormoleküle könnte auch die Funktion von PBL in der Mesoderm-Migration reguliert werden.

Dass PBL nicht direkt an eine RTK bindet, lässt schon dessen Proteinstruktur vermuten. Um an die aktivierten RTKs binden zu können, benötigen die Adaptormoleküle ein Phosphotyrosin-Bindemodul, wie beispielsweise eine SH2 (SRC Homologie Domäne)-Domäne, oder eine PTB (Phosphotyrosin-Bindedomäne) (Pawson und Scott, 1997). Das PBL-Protein verfügt nicht über eine solche Binde-Domäne. Sollte PBL in einem linearen Signalweg von HTL agieren, würde man außerdem eine stärkere Ähnlichkeit zwischen den mutanten Phänotypen von *pbl* und *htl* erwarten. Eine solche Ähnlichkeit findet man beispielsweise auch zwischen *dof* und *htl* mutanten Embryonen (Imam et al., 1999; Michelson et al., 1998a; Michelson et al., 1998b; Vincent et al., 1998). Beide Mutanten zeigen im Querschnitt ein ‚aufgetürmtes‘ Mesoderm in Phase 2. Die Zellform erscheint in beiden Fällen abgerundet. In *pbl* mutanten Embryonen erscheint es eher so, als bestünde zwischen den Zellen des Mesoderms ein zu starker Zusammenhalt, der die Zellen daran hindert, sich auszubreiten. Sowohl die fehlende Phosphotyrosin-Bindedomäne als auch der mutante Phänotyp sprechen dafür, dass PBL nicht durch die direkte Interaktion mit der RTK in den linearen Signalweg von HTL involviert ist.

PBL scheint vielmehr in einen parallelen Signalweg involviert zu sein, der parallel zur MAPK-Kinase, direkt zu Veränderungen auf der Ebene des Zytoskeletts führt. Dass die von HTL-vermittelten Zellformveränderungen nicht allein auf die Aktivierung des RAS/MAPK-Signalweges zurückzuführen sind, zeigen auch Experimente mit konstitutiv aktivem RAS. Es ist möglich, den *htl* mutanten Phänotyp durch konstitutiv aktives RAS zu supprimieren (Michelson et al., 1998a). Es findet jedoch keine vollständige Rettung statt. Dies ist ein Zeichen dafür, dass der von HTL-vermittelte RAS/MAPK Signalweg nicht allein für die Zellformveränderungen während der Migration verantwortlich ist. Dieser variable Phänotyp ist auch in den *pbl* mutanten Embryonen zu erkennen, in denen konstitutiv aktives RAS überexprimiert wird. Das zeigt wiederum, dass neben dem PBL Signalweg noch ein paralleler Signalweg existiert, der für die Migration des Mesoderms notwendig ist. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass PBL in einem parallelen Signalweg, zum MAPK-Signalweg agiert, der die Migration der Mesodermzellen ermöglicht.

4.3 Die Funktion von PBL in der Regulation des Zytoskeletts

Die Weiterleitung eines extrazellulären Signals an das Aktinzytoskelett erfolgt über die kleinen GTPasen der Rho-Familie (Chant und Stowers, 1995; Ridley und Hall, 1992b). Wie bereits bei der Bildung des kontraktilen Ringes in der Zytokinese gezeigt werden konnte, ist PBL ein positiver Regulator der kleinen GTPase RHO1 (Hime und Saint, 1992; Lehner, 1992; Prokopenko et al., 1999). In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass PBL nicht nur an RHO1 bindet, sondern in seiner Funktion als GEF auch dessen katalytische Aktivität fördert. Da die Funktion von RHO1 jedoch nicht für die Migration des Mesoderms notwendig zu sein scheint, treten RAC1 und RAC2 in den Vordergrund des Interesses. Ein Grund für den schwächeren Einfluss der GEF-Funktion von PBL auf diese beiden GTPasen, liegt vermutlich im Versuchsansatz selber. So wurde für diesen Versuch lediglich die DH-Domäne von PBL auf ihre GEF-Aktivität hin getestet. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die PH Domäne die Aktivität der DH-Domäne positiv unterstützt. So konnte gezeigt werden, dass die DH-PH-Domäne des GEFs Trio, die Nukleotidaustauschfähigkeit von RAC1 *in vitro* 100-fach besser katalysiert, als die DH-Domäne alleine (Liu et al., 1995). Ein Grund dafür, kann zum einen in der direkten Interaktion der GEF-Domäne mit RAC1 sein (Zheng et al., 1997). Zum anderen ist auch eine Interaktion zwischen der PH-Domäne und RAC1 vorstellbar. Diese Daten sprechen dafür, dass man auch in dieser Arbeit eine eindeutigere Interaktion mit den RAC GTPasen hätte nachweisen können, wenn man zusätzlich die PH-Domäne für das GEF-PBL Konstrukt verwendet hätte. Eine Funktion von RAC1 bei der Vermittlung von Zellfortsätzen

ist gut vorstellbar, da kürzlich gezeigt werden konnte, dass RAC1 *in vivo* für die Bildung von Lamellipodien, als Grundlage der Hämocyten-Beweglichkeit in *Drosophila*, notwendig ist (Stramer et al., 2005).

Für das Säugertierhomolog von PBL, ECT2, wurde kürzlich ein sehr interessanter Befund veröffentlicht. So konnte in einer *in vivo* Studie gezeigt werden, dass ein Konstrukt von ECT2, das neben der DH-PH Domäne zusätzlich den C-Terminus enthält, sowohl mit RHO1, als auch mit RAC1 und CDC42 interagieren kann (Solski et al., 2004). Leider wurde im Rahmen dieser Publikation kein DH-PH-C-ECT2 Konstrukt nur auf seine *in vitro* Funktion hin getestet. Entscheidend ist jedoch die Aussage, dass der C-Terminus von ECT2 dessen Spezifität bezüglich der Ziel-GTPasen *in vivo* beeinflussen kann. So fördert die Expression des DH-PH-C-ECT2 Konstruktes die Bildung von Lamellipodien, während ein DH-PH-ECT2 Konstrukt lediglich Einfluss auf die Stressfibrillen-Bildung besitzt (Solski et al., 2004). Die Gründe für verschiedene Ergebnisse von GEF-Versuchen können also zum einen in der Verwendung unterschiedlicher Konstrukte liegen, welche die GEF Funktion eventuell nicht vollständig ausüben können. Zum anderen spielt aber auch die Expression der zu testenden GEFs eine wichtige Rolle. Ob die Expression in Bakterien oder in Säugertierzellen erfolgt, spielt immer dann eine entscheidende Rolle, wenn die Aktivität von Proteinen durch Modifikationen beeinflusst wird. ECT2 scheint beispielsweise durch Phosphorylierung aktiviert zu werden (Tatsumoto et al., 1999). Es ist möglich, dass die Phosphorylierung, die nur bei der Expression in Säugertieren auftritt, für die Interaktion von ECT2 mit RAC1 notwendig ist. Das würde erklären, weshalb zunächst keine Interaktion von ECT2 mit RAC1 nachgewiesen werden konnte (Miki et al., 1993). Erst nachdem die Forschergruppe um Miki die Konstrukte in Säugertierzellen exprimiert hat, konnte eine Aktivierung von RAC1 durch ECT2 gezeigt werden (Tatsumoto et al., 1999).

Neben der konservierten Cdc2 Phosphorylierungsstelle (Tatsumoto et al., 1999) besitzt PBL auch noch eine MAPK Phosphorylierungsstelle in Exon 7. Diese MAPK Phosphorylierungsstelle ist durch eine Konsensussequenz gekennzeichnet, die Serin und Threonin enthält (Clark-Lewis et al., 1991). Für ECT2 konnte bereits gezeigt werden, dass es nicht durch anti-Phosphotyrosin Antikörper detektiert werden kann (Tatsumoto et al., 1999). Es bleibt jedoch zu klären, ob ECT2 und auch PBL von Serin/Threonin-Kinasen phosphoryliert werden. Eine Phosphorylierung des GEFs könnte neben einer Aktivierung beispielsweise auch die Lokalisation des Proteins beeinflussen. Für eine entsprechende Modifikation von PBL spricht die Western-Blot-Analyse, bei der die detektierten Proteine ein größeres Molekulargewicht aufweisen, als aufgrund der Aminosäuresequenz erwartet würde.

Für eine Funktion des C-Terminus würden übrigens auch die vielen Bereiche konservierter Aminosäuren (Prokopenko et al., 1999 und unveröffentlichte Daten A. v. Impel) sprechen. Es wird also deutlich, dass die GEF-Aktivität nicht nur auf die Anwesenheit der DH-PH-Domäne beschränkt werden kann. Vielmehr muss der Kontext berücksichtigt werden, in dem sie liegt. Im anschließenden Kapitel soll die Regulation von PBL über weitere Domänen näher betrachtet werden.

4.4 Die Regulation über verschiedene Proteindomänen von PBL

Wie schon im vorangehenden Kapitel deutlich wurde, spielt die PH Domäne eine wichtige Rolle bei der Regulation von Proteinen. Neben der bereits geschilderten unterstützenden katalytischen Eigenschaft der *Dbl* Domäne, kommt der PH Domäne auch eine Funktion bei der Lokalisation von Proteinen an der Membran zu. Man findet die PH Domäne nämlich auch in Nicht-GEF Signalproteinen (Cozier et al., 2004; Lemmon et al., 2002). Häufig dient die PH-Domäne dann der Membranlokalisation, da sie an saure Phospholipide binden kann (Harlan et al., 1994). So ist beispielsweise die Membranlokalisation wichtig für die Aktivierung des Rho spezifischen GEFs Tiam1 (Michiels et al., 1997). Gerade im Hinblick auf eine Funktion von PBL bei der Organisation des Aktinzytoskeletts, als Grundlage der Zellformveränderungen, wäre die Steuerung der Membranlokalisation über die PH-Domäne von PBL gut vorstellbar.

Kürzlich ist eine weitere Funktion der PH-Domäne in Bezug auf die Aktivierung von RAC entdeckt worden. So bindet die DH Domäne von ELMO *in trans* an den Dock180-RAC Komplex, was dazu führt, dass RAC im nukleotidfreien Status stabilisiert wird (Lu et al., 2004). Mitglieder der Dock180 Superfamilie stellen neue GEFs für GTPasen der Rho Familie dar. Zusammen mit ELMO bildet Dock180 einen zweiteiligen GEF für RAC. Dieser Mechanismus stellt neben der direkten Interaktion der DH und der PH Domäne (Zheng et al., 1997), eine weitere Möglichkeit dar, wie die PH Domäne die katalytische Aktivität der DH Domäne unterstützen kann. Falls auch bei PBL ein solches zusätzliches Adapterprotein notwendig ist, um die GEF-Aktivität von PBL zu katalysieren, würde man eine entsprechende Aktivität von RAC1 auch nur in einem speziell angelegten *in vitro* Ansatz zeigen können.

Wie die GEF Aktivität von PBL auch verifiziert werden mag, fest steht, dass die Überexpression des DH-PH-C-Konstruktes von ECT2 *in vivo* zu einer konstitutiven Aktivität des Proteins führt, welche sich in einem erhöhten Transformationspotential äußert (Schmidt und Hall, 2002; Zheng, 2001). Dieses Experiment zeigt gleichzeitig, dass der N-Terminus des Proteins *in vivo* als ein negativer Regulator wirkt. Wie bereits in der Einleitung beschrieben,

sind die BRCT Domänen während der Zytokinese für die Vermittlung zwischen dem Mitosespindelapparat aus Mikrotubuli und dem kontraktile Aktin-Myosin-Ring notwendig (Prokopenko et al., 1999).

Nun wird eine weitere Funktion der BRCT Domänen bei der Regulation von ECT2 deutlich. Die BRCT Domänen können die Aktivität von ECT2 regulieren, indem sie intramolekular mit der C-terminalen Hälfte des Proteins interagieren (Kim et al., 2005). Das erklärt, weshalb die Überexpression von *pbl* im Wildtyp-Embryo keinen Effekt auf die Embryonalentwicklung besitzt. In dem Modell von Kim und Mitarbeitern, führt die intramolekulare Interaktion von ECT2 zu einer Maskierung der katalytischen Domäne, die vermutlich durch Phosphorylierung wieder aufgehoben werden kann. Die Defekte in der Zytokinese, die durch die Überexpression der BRCT Domänen hervorgerufen werden, treten in Folge der Inaktivierung von endogenem PBL durch die BRCT Domänen auf. Dieser Phänotyp kann durch die gleichzeitige Expression von Wildtyp-ECT2 wieder gerettet werden (Kim et al., 2005).

Die Überexpression des Δ N-PBL Konstruktes, das die DH und die PH Domäne, sowie den N-Terminus von PBL enthält, sollte daher auch konstitutiv aktiv wirken, da eine Regulation über die BRCT Domänen nicht erfolgen kann. Dass ein solch konstitutiv aktives Konstrukt aber gleichzeitig auch dominant-negativ wirken kann, wird bei der Betrachtung des Mesoderm-Phänotyps deutlich. Erste Defekte treten bereits bei der Invagination der mesodermalen Zellen in das Innere des Embryos auf. Dieser Phänotyp erinnert stark an die Defekte in Embryonen, die mutant für *DRhoGEF2* sind. In der Abwesenheit der maternalen *DRhoGEF2* Aktivität unterbleibt die Invagination mesodermaler Primordien (Barret et al., 1997)(Hacker et al., 1997). Die hohe Ähnlichkeit der Phänotypen sprechen für eine Interaktion des DH-PH-C-Konstruktes mit dem Signalweg von DRhoGEF2. Vermutlich führt die Überexpression des Δ N-PBL Konstruktes dazu, dass DRhoGEF2 mit diesem dominant negativen PBL Konstrukt im Wettbewerb um RHO1 als Substrat steht. Im *pbl* mutanten Hintergrund steht eine größere Menge an RHO1 zur Verfügung. Der dominant-negative Phänotyp in Bezug auf die Invagination des Mesoderms wird unterdrückt. Das Δ N-Konstrukt ist dennoch nicht dazu in der Lage, den *pbl* mutanten Migrations-Phänotyp zu retten. Obwohl das Konstrukt dominant negativ wirkt, sind die Mesodermzellen in der Lage zu wandern.

Es ist nahe liegend, dass dem Konstrukt Domänen fehlen, die für die Migrationsfunktion notwendig sind. Umso erstaunlicher ist es, dass ein Konstrukt, das zusätzlich die NLS und die PEST Domäne enthält, den Migrations-Phänotyp retten kann (Smallhorn et al., 2004).

Es erscheint unwahrscheinlich, dass die Lokalisation von PBL im Zellkern, oder die Anwesenheit eines proteolytischen Signals, zusätzlich notwendig sind, um die

Migrationsfunktion erfüllen zu können. Wahrscheinlicher wäre die folgende Möglichkeit. Die Expression des ΔN -Konstruktes von PBL besitzt die Fähigkeit die Migration zu retten. Da es jedoch konstitutiv-aktiv wirkt, findet womöglich eine ungerichtete Zellwanderung statt. Diese wäre auf die unnatürliche und nicht räumlich begrenzte Aktivierung von PBL zurückzuführen. Besitzt das Konstrukt jedoch zusätzlich die Zellkernlokalisationssequenz, bzw. das proteolytische Signal der PEST Domäne, wird dieser dominante Effekt durch die Lagerung im Zellkern, oder den proteolytischen Abbau unterdrückt. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Deletion der PEST-Domäne von *Vein* (Vn) zu einer erhöhten Aktivität dieses Proteins führt (Donaldson et al., 2004). *Vein* kodiert für einen positiven Liganden des Epidermalen-Wachstums-Faktor-Rezeptors in *Drosophila*, DEGR (Schnepp et al., 1996). Es wäre also interessant herauszufinden, ob PBL auch ein über die proteolytische Degradation reguliert wird. Ein Δ PEST-PBL Konstrukt sollte dann ebenfalls zu einer Aktivierung des Proteins führen. Eine solche Regulation von PBL könnte auch über die Phosphorylierung von PBL erfolgen. Der Mechanismus, wie PEST Domänen von dem 26S Proteasom erkannt werden, ist bisher noch nicht genau bekannt. Der Substraterkennung scheint oftmals jedoch die Ubiquitinierung und/oder die Phosphorylierung voranzugehen (Rechsteiner und Rogers, 1996). Ebenso unklar ist bisher, welchen Einfluss die Zellkernlokalisationssequenz auf die Funktion von PBL hat. Wie die anti-PBL Antikörperfärbungen zeigen, findet man eine starke Anreicherung des PBL Proteins im Zellkern. Es bleibt zu klären, ob es sich hierbei nur um eine Art Depot-Funktion handelt, oder ob PBL eine Funktion im Zellkern ausübt.

Im Zellkern erfolgt auf verschiedenen Ebenen die Regulation der Genexpression. Neben der Transkriptions- und Translationskontrolle möchte ich hier im Besonderen auf einen Mechanismus eingehen, der die Regulation auf der post-transkriptionalen Ebene betrifft, und im Mesoderm stattfindet. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass im *Drosophila* Embryo eine negative Kontrolle des Zellzyklus auf der Basis post-transkriptionaler Regulation stattfindet. So wird die Menge an *stg/cdc25* mRNA im Mesoderm negativ durch das RNA-Bindeprotein HOW, Held Out Wing, reguliert (Nabel-Rosen et al., 2005). HOW ist ein Mitglied der STAR (Signal-Transduktion und RNA) Familie (Vernet und Artzt, 1997). Proteine dieser Familie sind auch in Prozesse, wie RNA-Spleißen, RNA-Zellkernexport und RNA-Stabilität involviert (Li et al., 2000). Da HOW spezifisch im Mesoderm exprimiert wird (Nabel-Rosen et al., 2005), stellt es ein interessantes Protein dar, das an der Regulation von *pbl*, über alternatives Spleißen oder die Vermittlung von mRNA Stabilität beteiligt sein könnte. Denn bisher konnte beispielsweise nicht geklärt werden, weshalb bei dem Western-

Blot mit anti-PBL Antikörper nur drei Proteinformen nachgewiesen wurden, obwohl vier *pbl* Transkripte exprimiert werden. Die Existenz eines solchen RNA Binfaktors stellt eine interessante Variante zur Regulation von PBL dar. Leider konnte die *pbl* mRNA bisher nicht zusammen mit dem HOW Protein isoliert werden (unpublizierte Daten, Thalila Volk).

4.5 Die Funktion von PBL

Trägt man die Ergebnisse dieser Arbeit zusammen, ergibt sich die folgende Modellvorstellung der dualen Funktion von PBL. In der Zytokinese wirkt PBL als GEF für RHO1 und ermöglicht in dieser Funktion die Aktinassemblierung am kontraktilen Ring während der Zytokinese. In der Mesoderm-Migration, wirkt PBL ebenfalls als positiver Regulator kleiner GTPasen der Rho-Familie. Durch die Modifikation des PBL-Proteins, ist in den Mesodermzellen jedoch eine Interaktion mit RAC1 und/oder RAC2 möglich. In dieser Funktion agiert PBL unterhalb oder parallel zum HTL/MAPK-Signalweg. Ein entsprechendes Modell ist in der folgenden Abbildung veranschaulicht (Abb. 30).

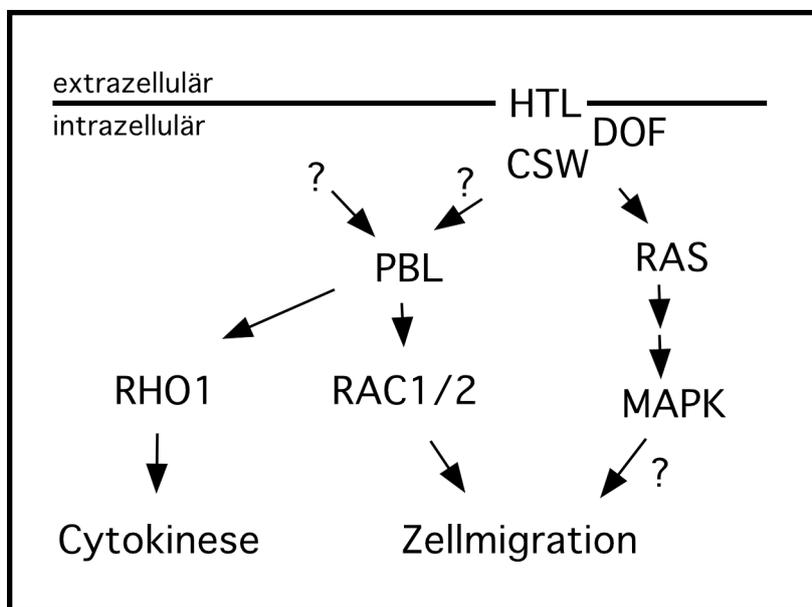


Abb. 30. Modell der dualen Funktion von PBL in der Zytokinese und in der Mesoderm-Migration.

Die Funktion des GEFs PBL in der Zellmigration zu verstehen, ist auch im Hinblick auf die Funktion der Proteine der Dbl-Familie, eine große Gruppe der Proto-Onkogene, von Bedeutung. Man kennt zwar inzwischen die molekulare Struktur der GEF-Domäne, doch ein zukünftiges Ziel wird es sein, herauszufinden, wie die Spezifität der GEFs vermittelt wird. Ebenso wichtig wird es sein, zu verstehen, wie die GEF-Aktivität der Mitglieder der Dbl-Familie in den Komplex der Signalweiterleitung involviert ist, der grundlegende Prozesse der Zellbiologie, wie die Regulation des Aktinzytoskeletts, kontrolliert.

5 Zusammenfassung

Die Zellmigration ist eine essentielle Grundlage der Entwicklung eines tierischen Organismus. *Drosophila melanogaster* ist ein guter Modellorganismus, um verschiedene Prozesse der Zellmigration während der Entwicklung zu untersuchen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Ausbreitung des Mesoderms während der Entwicklung des *Drosophila* Embryos auf einem aktiven Wanderungsprozess der mesodermalen Zellen beruht. Die mesodermale Zellmigration ist essentiell für die Differenzierung der Mesodermderivate. Die Mechanismen, welche die Mesoderm-Migration auf der zellulären Ebene kontrollieren, sind bisher unbekannt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der von *htl* kodierte FGF-Rezeptor für die Zellformveränderungen in der Initialisierungsphase der Mesoderm-Migration notwendig ist. In dieser frühen Phase der Mesoderm-Morphogenese scheint die Aktivierung des HTL-Rezeptors als permissives Signal zu wirken, dass die Zellmigration erlaubt. Im fortschreitenden Wanderungsprozess scheint sich die Funktion von HTL in ein instruktives Verhalten umzuwandeln. Die Fähigkeit zu Wandern, ist nicht mehr allein von der Funktion von HTL abhängig. In dieser Arbeit wurde PBL als neue Komponente im HTL-vermittelten Signalweg identifiziert. Die Daten sprechen für ein Modell, in dem PBL durch die Interaktion mit RAC1 und/oder RAC2 die Umorganisation des Aktinzytoskeletts während der Zellmigration reguliert. Im Gegensatz zu HTL, handelt es sich bei PBL um eine essentielle Komponente der Mesoderm-Migration.

Es konnte gezeigt werden, dass vier vorhergesagten Spleißvarianten der *pbl* mRNA dynamisch im Mesoderm exprimiert werden. Die beiden *pbl* mRNAs A und B scheinen für die bereits beschriebene Funktion von PBL in der Zytokinese essentiell zu sein, während die vier verschiedenen *pbl* mRNAs in der Migration vermutlich eine redundante Funktion besitzen. Immunhistologische Untersuchungen auf der Protein-Ebene konnten die Lokalisation von PBL an Stellen der Zellkonstriktion, oder innerhalb von Zellfortsätzen zeigen. Die Lokalisation lässt in beiden Fällen auf eine Funktion von PBL bei der Organisation des Aktinzytoskeletts schließen.

Die Identifizierung von PBL als neue Komponente der Mesoderm-Migration, liefert einen wichtigen Ansatzpunkt, den Mechanismus besser zu verstehen, der extrazelluläre Signale auf der Ebene des Zytoskeletts in eine entsprechende Zellantwort umwandelt. Diese Ergebnisse tragen dazu bei, den Prozess der Zellmigration auch in anderen Organismen besser zu verstehen.

6 Literatur

- Afshar, K., Stuart, B., und Wasserman, S. A. (2000). Functional analysis of the *Drosophila diaphanous* FH protein in early embryonic development. *Development* **127**, 1887-97.
- Ashburner, M., Thompson, P., Roote, J., Lasko, P. F., Grau, Y., el Messal, M., Roth, S., und Simpson, P. (1990). The genetics of a small autosomal region of *Drosophila melanogaster* containing the structural gene for alcohol dehydrogenase. VII. Characterization of the region around the *snail* and *cactus* loci. *Genetics* **126**, 679-94.
- Barrett, K., Leptin, M., und Settleman, J. (1997). The Rho GTPase and a putative RhoGEF mediate a signaling pathway for the cell shape changes in *Drosophila* gastrulation. *Cell* **91**, 905-15.
- Bate, M., Rushton, E., und Frasch, M. (1993). A dual requirement for neurogenic genes in *Drosophila* myogenesis. *Dev Suppl*, 149-61.
- Battersby, A., Csiszar, A., Leptin, M., und Wilson, R. (2003). Isolation of proteins that interact with the signal transduction molecule Dof and identification of a functional domain conserved between Dof and vertebrate BCAP. *J Mol Biol* **329**, 479-93.
- Baylies, M. K., Martinez Arias, A., und Bate, M. (1995). *wingless* is required for the formation of a subset of muscle founder cells during *Drosophila* embryogenesis. *Development* **121**, 3829-37.
- Beccari, S., Teixeira, L., und Rorth, P. (2002). The JAK/STAT pathway is required for border cell migration during *Drosophila* oogenesis. *Mech Dev* **111**, 115-23.
- Beiman, M., Shilo, B. Z., und Volk, T. (1996). Heartless, a *Drosophila* FGF receptor homolog, is essential for cell migration and establishment of several mesodermal lineages. *Genes Dev* **10**, 2993-3002.
- Bernfield, M., Kokenyesi, R., Kato, M., Hinkes, M. T., Spring, J., Gallo, R. L., und Lose, E. J. (1992). Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol* **8**, 365-93.
- Bour, B. A., O'Brien, M. A., Lockwood, W. L., Goldstein, E. S., Bodmer, R., Taghert, P. H., Abmayr, S. M., und Nguyen, H. T. (1995). *Drosophila* MEF2, a transcription factor that is essential for myogenesis. *Genes Dev* **9**, 730-41.
- Brand, A. H., und Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-15.
- Brown, N. H., Gregory, S. L., und Martin-Bermudo, M. D. (2000). Integrins as mediators of morphogenesis in *Drosophila*. *Dev Biol* **223**, 1-16.
- Campos-Ortega, J. A., und Hartenstein, V. (1985). "The embryonic development of *Drosophila melanogaster*." Springer Verlag, Berlin.
- Carmena, A., Gisselbrecht, S., Harrison, J., Jimenez, F., und Michelson, A. M. (1998). Combinatorial signaling codes for the progressive determination of cell fates in the *Drosophila* embryonic mesoderm. *Genes Dev* **12**, 3910-22.
- Chant, J., und Stowers, L. (1995). GTPase cascades choreographing cellular behavior: movement, morphogenesis, and more. *Cell* **81**, 1-4.
- Chung, C. Y., Funamoto, S., und Firtel, R. A. (2001). Signaling pathways controlling cell polarity and chemotaxis. *Trends Biochem Sci* **26**, 557-66.
- Clark-Lewis, I., Sanghera, J. S., und Pelech, S. L. (1991). Definition of a consensus sequence for peptide substrate recognition by p44mpk, the meiosis-activated myelin basic protein kinase. *J Biol Chem* **266**, 15180-4.
- Cobb, M. H., und Goldsmith, E. J. (1995). How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem* **270**, 14843-6.
- Costa, M., Wilson, E. T., und Wieschaus, E. (1994). A putative cell signal encoded by the *folded gastrulation* gene coordinates cell shape changes during *Drosophila* gastrulation. *Cell* **76**, 1075-89.

- Cozier, G. E., Carlton, J., Bouyoucef, D., and Cullen, P. J.** (2004). Membrane targeting by pleckstrin homology domains. *Curr Top Microbiol Immunol* **282**, 49-88.
- Cui, X., and Doe, C. Q.** (1995). The role of the cell cycle and cytokinesis in regulating neuroblast sublineage gene expression in the *Drosophila* CNS. *Development* **121**, 3233-43.
- David, G.** (1993). Integral membrane heparan sulfate proteoglycans. *Faseb J* **7**, 1023-30.
- De Arcangelis, A., and Georges-Labouesse, E.** (2000). Integrin and ECM functions: roles in vertebrate development. *Trends Genet* **16**, 389-95.
- Debant, A., Serra-Pages, C., Seipel, K., O'Brien, S., Tang, M., Park, S. H., and Streuli, M.** (1996). The multidomain protein Trio binds the LAR transmembrane tyrosine phosphatase, contains a protein kinase domain, and has separate rac-specific and rho-specific guanine nucleotide exchange factor domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5466-71.
- Donaldson, T., Wang, S. H., Jacobsen, T. L., Schnepf, B., Price, J., and Simcox, A.** (2004). Regulation of the *Drosophila* epidermal growth factor-ligand vein is mediated by multiple domains. *Genetics* **167**, 687-98.
- Duchek, P., and Rorth, P.** (2001). Guidance of cell migration by EGF receptor signaling during *Drosophila* oogenesis. *Science* **291**, 131-3.
- Duchek, P., Somogyi, K., Jekely, G., Beccari, S., and Rorth, P.** (2001). Guidance of cell migration by the *Drosophila* PDGF/VEGF receptor. *Cell* **107**, 17-26.
- Dunin-Borkowski, O. M., and Brown, N. H.** (1995). Mammalian CD2 is an effective heterologous marker of the cell surface in *Drosophila*. *Dev Biol* **168**, 689-93.
- Edgar, B. A., and O'Farrell, P. H.** (1989). Genetic control of cell division patterns in the *Drosophila* embryo. *Cell* **57**, 177-87.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A.** (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-35.
- Fantl, W. J., Johnson, D. E., and Williams, L. T.** (1993). Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* **62**, 453-81.
- Foe, V. E., Field, C. M., and Odell, G. M.** (2000). Microtubules and mitotic cycle phase modulate spatiotemporal distributions of F-actin and myosin II in *Drosophila* syncytial blastoderm embryos. *Development* **127**, 1767-87.
- Frasch, M.** (1995). Induction of visceral and cardiac mesoderm by ectodermal Dpp in the early *Drosophila* embryo. *Nature* **374**, 464-7.
- Frasch, M., Hoey, T., Rushlow, C., Doyle, H., and Levine, M.** (1987). Characterization and localization of the even-skipped protein of *Drosophila*. *Embo J* **6**, 749-59.
- Fyrberg, E. A., Bond, B. J., Hershey, N. D., Mixter, K. S., and Davidson, N.** (1981). The actin genes of *Drosophila*: protein coding regions are highly conserved but intron positions are not. *Cell* **24**, 107-16.
- Gabay, L., Seger, R., and Shilo, B. Z.** (1997a). In situ activation pattern of *Drosophila* EGF receptor pathway during development. *Science* **277**, 1103-6.
- Gabay, L., Seger, R., and Shilo, B. Z.** (1997b). MAP kinase in situ activation atlas during *Drosophila* embryogenesis. *Development* **124**, 3535-41.
- Giancotti, F. G., and Ruoslahti, E.** (1999). Integrin signaling. *Science* **285**, 1028-32.
- Gisselbrecht, S., Skeath, J. B., Doe, C. Q., and Michelson, A. M.** (1996). *heartless* encodes a fibroblast growth factor receptor (DFR1/DFGF-R2) involved in the directional migration of early mesodermal cells in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* **10**, 3003-17.
- Glazer, L., and Shilo, B. Z.** (1991). The *Drosophila* FGF-R homolog is expressed in the embryonic tracheal system and appears to be required for directed tracheal cell extension. *Genes Dev* **5**, 697-705.

- Greig, S., und Akam, M.** (1993). Homeotic genes autonomously specify one aspect of pattern in the *Drosophila* mesoderm. *Nature* **362**, 630-2.
- Grosshans, J., Wenzl, C., Herz, H. M., Bartoszewski, S., Schnorrer, F., Vogt, N., Schwarz, H., und Muller, H. A.** (2005). RhoGEF2 and the formin Dia control the formation of the furrow canal by directed actin assembly during *Drosophila* cellularisation. *Development* **132**, 1009-20.
- Gryzik, T., und Müller, H. A.** (2004). FGF8-like1 and FGF8-like2 encode putative ligands of the FGF receptor Htl and are required for mesoderm migration in the *Drosophila* gastrula. *Curr Biol* **14**, 659-67.
- Gumbiner, B. M.** (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**, 345-57.
- Hacker, U., Lin, X., und Perrimon, N.** (1997). The *Drosophila* *sugarless* gene modulates Wingless signaling and encodes an enzyme involved in polysaccharide biosynthesis. *Development* **124**, 3565-73.
- Hacker, U., und Perrimon, N.** (1998). *DRhoGEF2* encodes a member of the Dbl family of oncogenes and controls cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*. *Genes Dev* **12**, 274-84.
- Hakeda-Suzuki, S., Ng, J., Tzu, J., Dietzl, G., Sun, Y., Harms, M., Nardine, T., Luo, L., und Dickson, B. J.** (2002). Rac function and regulation during *Drosophila* development. *Nature* **416**, 438-42.
- Halfon, M. S., Carmena, A., Gisselbrecht, S., Sackerson, C. M., Jimenez, F., Baylies, M. K., und Michelson, A. M.** (2000). Ras pathway specificity is determined by the integration of multiple signal-activated and tissue-restricted transcription factors. *Cell* **103**, 63-74.
- Hall, A.** (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509-14.
- Hanahan, D., Jessee, J., und Bloom, F. R.** (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol* **204**, 63-113.
- Hariharan, I. K., Hu, K. Q., Asha, H., Quintanilla, A., Ezzell, R. M., und Settleman, J.** (1995). Characterization of rho GTPase family homologues in *Drosophila melanogaster*: overexpressing Rho1 in retinal cells causes a late developmental defect. *Embo J* **14**, 292-302.
- Harlan, J. E., Hajduk, P. J., Yoon, H. S., und Fesik, S. W.** (1994). Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* **371**, 168-70.
- Hart, C. M., und Roberts, J. W.** (1994). Deletion analysis of the lambda tR1 termination region. Effect of sequences near the transcript release sites, and the minimum length of rho-dependent transcripts. *J Mol Biol* **237**, 255-65.
- Hicks, M. S., O'Leary, V., Wilkin, M., Bee, S. E., Humphries, M. J., und Baron, M.** (2001). *DrhoGEF3* encodes a new *Drosophila* DH domain protein that exhibits a highly dynamic embryonic expression pattern. *Dev Genes Evol* **211**, 263-7.
- Hime, G., und Saint, R.** (1992). Zygotic expression of the *pebble* locus is required for cytokinesis during the postblastoderm mitoses of *Drosophila*. *Development* **114**, 165-71.
- Hynes, R. O.** (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673-87.
- Ijima, M., Nomura, S., Okada, M., Ikoma, Y., Ito, T., Mitsui, T., Maeda, O., und Mizutani, S.** (2002). Effects of age, hypertension and HRT on serum aminopeptidase A activity. *Maturitas* **43**, 215-21.
- Imam, F., Sutherland, D., Huang, W., und Krasnow, M. A.** (1999). *stumps*, a *Drosophila* gene required for fibroblast growth factor (FGF)-directed migrations of tracheal and mesodermal cells. *Genetics* **152**, 307-18.

- Irvine, K. D., and Wieschaus, E.** (1994). Cell intercalation during *Drosophila* germband extension and its regulation by pair-rule segmentation genes. *Development* **120**, 827-41.
- Iwai, Y., Usui, T., Hirano, S., Steward, R., Takeichi, M., and Uemura, T.** (1997). Axon patterning requires DN-cadherin, a novel neuronal adhesion receptor, in the *Drosophila* embryonic CNS. *Neuron* **19**, 77-89.
- Johnson Hamlet, M. R., and Perkins, L. A.** (2001). Analysis of *corkscrew* signaling in the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway during myogenesis. *Genetics* **159**, 1073-87.
- Kim, J. E., Billadeau, D. D., and Chen, J.** (2005). The tandem BRCT domains of Ect2 are required for both negative and positive regulation of Ect2 in cytokinesis. *J Biol Chem* **280**, 5733-9.
- Kjellen, L., and Lindahl, U.** (1991). Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem* **60**, 443-75.
- Klämbt, C., Glazer, L., and Shilo, B. Z.** (1992). *breathless*, a *Drosophila* FGF receptor homolog, is essential for migration of tracheal and specific midline glial cells. *Genes Dev* **6**, 1668-78.
- Klint, P., Kanda, S., and Claesson-Welsh, L.** (1995). Shc and a novel 89-kDa component couple to the Grb2-Sos complex in fibroblast growth factor-2-stimulated cells. *J Biol Chem* **270**, 23337-44.
- Knirr, S., and Frasch, M.** (2001). Molecular integration of inductive and mesoderm-intrinsic inputs governs even-skipped enhancer activity in a subset of pericardial and dorsal muscle progenitors. *Dev Biol* **238**, 13-26.
- Knust, E., and Müller, H. J.** (1998). *Drosophila* morphogenesis: orchestrating cell rearrangements. *Curr Biol* **8**, R853-5.
- Kouhara, H., Hadari, Y. R., Spivak-Kroizman, T., Schilling, J., Bar-Sagi, D., Lax, I., and Schlessinger, J.** (1997). A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell* **89**, 693-702.
- Kozma, R., Ahmed, S., Best, A., and Lim, L.** (1995). The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* **15**, 1942-52.
- Lauffenburger, D. A., and Horwitz, A. F.** (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* **84**, 359-69.
- Lawrence, P. A., Bodmer, R., and Vincent, J. P.** (1995). Segmental patterning of heart precursors in *Drosophila*. *Development* **121**, 4303-8.
- Lecuit, T., Samanta, R., and Wieschaus, E.** (2002). *slam* encodes a developmental regulator of polarized membrane growth during cleavage of the *Drosophila* embryo. *Dev Cell* **2**, 425-36.
- Lee, T., Hacohen, N., Krasnow, M., and Montell, D. J.** (1996). Regulated Breathless receptor tyrosine kinase activity required to pattern cell migration and branching in the *Drosophila* tracheal system. *Genes Dev* **10**, 2912-21.
- Lehner, C. F.** (1992). The *pebble* gene is required for cytokinesis in *Drosophila*. *J Cell Sci* **103** (Pt 4), 1021-30.
- Lemmon, M. A., Ferguson, K. M., and Abrams, C. S.** (2002). Pleckstrin homology domains and the cytoskeleton. *FEBS Lett* **513**, 71-6.
- Leptin, M.** (1991). *twist* and *snail* as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development. *Genes Dev* **5**, 1568-76.
- Leptin, M.** (1994). Morphogenesis. Control of epithelial cell shape changes. *Curr Biol* **4**, 709-12.
- Leptin, M., and Grunewald, B.** (1990). Cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*. *Development* **110**, 73-84.

- Li, Z., Zhang, Y., Li, D., and Feng, Y.** (2000). Destabilization and mislocalization of myelin basic protein mRNAs in quaking dysmyelination lacking the QKI RNA-binding proteins. *J Neurosci* **20**, 4944-53.
- Lin, X., Buff, E. M., Perrimon, N., and Michelson, A. M.** (1999). Heparan sulfate proteoglycans are essential for FGF receptor signaling during *Drosophila* embryonic development. *Development* **126**, 3715-23.
- Liu, S., Calderwood, D. A., and Ginsberg, M. H.** (2000). Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci* **113** (Pt 20), 3563-71.
- Liu, S. H., Wong, M. L., Craik, C. S., and Brodsky, F. M.** (1995). Regulation of clathrin assembly and trimerization defined using recombinant triskelion hubs. *Cell* **83**, 257-67.
- Liu, X., Wang, H., Eberstadt, M., Schnuchel, A., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., Schkeryantz, J. M., Janowick, D. A., Harlan, J. E., Harris, E. A., Staunton, D. E., and Fesik, S. W.** (1998). NMR structure and mutagenesis of the N-terminal Dbl homology domain of the nucleotide exchange factor Trio. *Cell* **95**, 269-77.
- Lu, M., Kinchen, J. M., Rossman, K. L., Grimsley, C., deBakker, C., Brugnera, E., Tosello-Trampont, A. C., Haney, L. B., Klingele, D., Sondek, J., Hengartner, M. O., and Ravichandran, K. S.** (2004). PH domain of ELMO functions in trans to regulate Rac activation via Dock180. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 756-62.
- Luo, L., Liao, Y. J., Jan, L. Y., and Jan, Y. N.** (1994). Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: *Drosophila* Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Genes Dev* **8**, 1787-802.
- Mazumdar, A., and Mazumdar, M.** (2002). How one becomes many: blastoderm cellularization in *Drosophila melanogaster*. *Bioessays* **24**, 1012-22.
- Michelson, A. M., Gisselbrecht, S., Buff, E., and Skeath, J. B.** (1998a). Heartbroken is a specific downstream mediator of FGF receptor signalling in *Drosophila*. *Development* **125**, 4379-89.
- Michelson, A. M., Gisselbrecht, S., Zhou, Y., Baek, K. H., and Buff, E. M.** (1998b). Dual functions of the heartless fibroblast growth factor receptor in development of the *Drosophila* embryonic mesoderm. *Dev Genet* **22**, 212-29.
- Michiels, F., Stam, J. C., Hordijk, P. L., van der Kammen, R. A., Ruuls-Van Stalle, L., Feltkamp, C. A., and Collard, J. G.** (1997). Regulated membrane localization of Tiam1, mediated by the NH2-terminal pleckstrin homology domain, is required for Rac-dependent membrane ruffling and C-Jun NH2-terminal kinase activation. *J Cell Biol* **137**, 387-98.
- Miki, T., Smith, C. L., Long, J. E., Eva, A., and Fleming, T. P.** (1993). Oncogene *ect2* is related to regulators of small GTP-binding proteins. *Nature* **362**, 462-5.
- Miranti, C. K., and Brugge, J. S.** (2002). Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol* **4**, E83-90.
- Mitchison, T. J., and Cramer, L. P.** (1996). Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* **84**, 371-9.
- Montell, D. J.** (2001). Command and control: regulatory pathways controlling invasive behavior of the border cells. *Mech Dev* **105**, 19-25.
- Montell, D. J., Rorth, P., and Spradling, A. C.** (1992). *slow border cells*, a locus required for a developmentally regulated cell migration during oogenesis, encodes *Drosophila* C/EBP. *Cell* **71**, 51-62.
- 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.

- Murphy, A. M., Lee, T., Andrews, C. M., Shilo, B. Z., and Montell, D. J.** (1995). The *breathless* FGF receptor homolog, a downstream target of *Drosophila* C/EBP in the developmental control of cell migration. *Development* **121**, 2255-63.
- Murphy, A. M., and Montell, D. J.** (1996). Cell type-specific roles for Cdc42, Rac, and RhoL in *Drosophila* oogenesis. *J Cell Biol* **133**, 617-30.
- Nabel-Rosen, H., Toledano-Katchalski, H., Volohonsky, G., and Volk, T.** (2005). Cell divisions in the *Drosophila* embryonic mesoderm are repressed via posttranscriptional regulation of *string/cdc25* by HOW. *Curr Biol* **15**, 295-302.
- Newsome, T. P., Schmidt, S., Dietzl, G., Keleman, K., Asling, B., Debant, A., and Dickson, B. J.** (2000). Trio combines with dock to regulate Pak activity during photoreceptor axon pathfinding in *Drosophila*. *Cell* **101**, 283-94.
- Niewiadomska, P., Godt, D., and Tepass, U.** (1999). DE-Cadherin is required for intercellular motility during *Drosophila* oogenesis. *J Cell Biol* **144**, 533-47.
- Oda, H., Uemura, T., Harada, Y., Iwai, Y., and Takeichi, M.** (1994). A *Drosophila* homolog of cadherin associated with armadillo and essential for embryonic cell-cell adhesion. *Dev Biol* **165**, 716-26.
- Oda, H., Uemura, T., Shiomi, K., Nagafuchi, A., Tsukita, S., and Takeichi, M.** (1993). Identification of a *Drosophila* homologue of alpha-catenin and its association with the armadillo protein. *J Cell Biol* **121**, 1133-40.
- Padash Barmchi, M., Rogers, S., and Hacker, U.** (2005). DRhoGEF2 regulates actin organization and contractility in the *Drosophila* blastoderm embryo. *J Cell Biol* **168**, 575-85.
- Parks, S., and Wieschaus, E.** (1991). The *Drosophila* gastrulation gene *concertina* encodes a G alpha-like protein. *Cell* **64**, 447-58.
- Pawson, T., and Scott, J. D.** (1997). Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* **278**, 2075-80.
- Perkins, L. A., Johnson, M. R., Melnick, M. B., and Perrimon, N.** (1996). The nonreceptor protein tyrosine phosphatase corkscrew functions in multiple receptor tyrosine kinase pathways in *Drosophila*. *Dev Biol* **180**, 63-81.
- Perkins, L. A., Larsen, I., and Perrimon, N.** (1992). *corkscrew* encodes a putative protein tyrosine phosphatase that functions to transduce the terminal signal from the receptor tyrosine kinase torso. *Cell* **70**, 225-36.
- Petit, V., Nussbaumer, U., Dossenbach, C., and Affolter, M.** (2004). Downstream-of-FGFR is a fibroblast growth factor-specific scaffolding protein and recruits Corkscrew upon receptor activation. *Mol Cell Biol* **24**, 3769-81.
- Prokopenko, S. N., Brumby, A., O'Keefe, L., Prior, L., He, Y., Saint, R., and Bellen, H. J.** (1999). A putative exchange factor for Rho1 GTPase is required for initiation of cytokinesis in *Drosophila*. *Genes Dev* **13**, 2301-14.
- Prokopenko, S. N., Saint, R., and Bellen, H. J.** (2000a). Tissue distribution of PEBBLE RNA and pebble protein during *Drosophila* embryonic development. *Mech Dev* **90**, 269-73.
- Prokopenko, S. N., Saint, R., and Bellen, H. J.** (2000b). Untying the Gordian knot of cytokinesis. Role of small G proteins and their regulators. *J Cell Biol* **148**, 843-8.
- Provost, E., and Rimm, D. L.** (1999). Controversies at the cytoplasmic face of the cadherin-based adhesion complex. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 567-72.
- Ranganayakulu, G., Schulz, R. A., and Olson, E. N.** (1996). Wingless signaling induces nautilus expression in the ventral mesoderm of the *Drosophila* embryo. *Dev Biol* **176**, 143-8.
- Rechsteiner, M., and Rogers, S. W.** (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* **21**, 267-71.

- Ridley, A. J., und Hall, A.** (1992a). Distinct patterns of actin organization regulated by the small GTP-binding proteins Rac and Rho. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **57**, 661-71.
- Ridley, A. J., und Hall, A.** (1992b). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**, 389-99.
- Rio, D. C.** (1991). Regulation of *Drosophila* P element transposition. *Trends Genet* **7**, 282-7.
- Ron, D., Zannini, M., Lewis, M., Wickner, R. B., Hunt, L. T., Graziani, G., Tronick, S. R., Aaronson, S. A., und Eva, A.** (1991). A region of *proto-dbl* essential for its transforming activity shows sequence similarity to a yeast cell cycle gene, *CDC24*, and the human *breakpoint cluster gene*, *bcr*. *New Biol* **3**, 372-9.
- Rorth, P.** (2002). Initiating and guiding migration: lessons from border cells. *Trends Cell Biol* **12**, 325-31.
- Roth, S., Stein, D., und Nusslein-Volhard, C.** (1989). A gradient of nuclear localization of the dorsal protein determines dorsoventral pattern in the *Drosophila* embryo. *Cell* **59**, 1189-202.
- Salzberg, A., D'Evelyn, D., Schulze, K. L., Lee, J. K., Strumpf, D., Tsai, L., und Bellen, H. J.** (1994). Mutations affecting the pattern of the PNS in *Drosophila* reveal novel aspects of neuronal development. *Neuron* **13**, 269-87.
- Sanchez-Madrid, F., und del Pozo, M. A.** (1999). Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *Embo J* **18**, 501-11.
- Schejter, E. D., und Wieschaus, E.** (1993). bottleneck acts as a regulator of the microfilament network governing cellularization of the *Drosophila* embryo. *Cell* **75**, 373-85.
- Schlessinger, J., Lax, I., und Lemmon, M.** (1995). Regulation of growth factor activation by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptors? *Cell* **83**, 357-60.
- Schmidt, A., und Hall, A.** (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* **16**, 1587-609.
- Schnepp, B., Grumblin, G., Donaldson, T., und Simcox, A.** (1996). Vein is a novel component in the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway with similarity to the neuregulins. *Genes Dev* **10**, 2302-13.
- Schwartz, M. A., und Shattil, S. J.** (2000). Signaling networks linking integrins and rho family GTPases. *Trends Biochem Sci* **25**, 388-91.
- Seger, R., Ahn, N. G., Posada, J., Munar, E. S., Jensen, A. M., Cooper, J. A., Cobb, M. H., und Krebs, E. G.** (1992). Purification and characterization of mitogen-activated protein kinase activator(s) from epidermal growth factor-stimulated A431 cells. *J Biol Chem* **267**, 14373-81.
- Shishido, E., Higashijima, S., Emori, Y., und Saigo, K.** (1993). Two FGF-receptor homologues of *Drosophila*: one is expressed in mesodermal primordium in early embryos. *Development* **117**, 751-61.
- Shishido, E., Ono, N., Kojima, T., und Saigo, K.** (1997). Requirements of DFR1/Heartless, a mesoderm-specific *Drosophila* FGF-receptor, for the formation of heart, visceral and somatic muscles, and ensheathing of longitudinal axon tracts in CNS. *Development* **124**, 2119-28.
- Silver, D. L., und Montell, D. J.** (2001). Paracrine signaling through the JAK/STAT pathway activates invasive behavior of ovarian epithelial cells in *Drosophila*. *Cell* **107**, 831-41.
- Smallhorn, M., Murray, M. J., und Saint, R.** (2004). The epithelial-mesenchymal transition of the *Drosophila* mesoderm requires the Rho GTP exchange factor Pebble. *Development* **131**, 2641-51.

- Solski, P. A., Wilder, R. S., Rossman, K. L., Sondek, J., Cox, A. D., Campbell, S. L., and Der, C. J.** (2004). Requirement for C-terminal sequences in regulation of Ect2 guanine nucleotide exchange specificity and transformation. *J Biol Chem* **279**, 25226-33.
- Somers, W. G., and Saint, R.** (2003). A RhoGEF and Rho family GTPase-activating protein complex links the contractile ring to cortical microtubules at the onset of cytokinesis. *Dev Cell* **4**, 29-39.
- Staebling-Hampton, K., Hoffmann, F. M., Baylies, M. K., Rushton, E., and Bate, M.** (1994). dpp induces mesodermal gene expression in *Drosophila*. *Nature* **372**, 783-6.
- Stathopoulos, A., Tam, B., Ronshaugen, M., Frasch, M., and Levine, M.** (2004). *pyramus* and *thisbe*: FGF genes that pattern the mesoderm of *Drosophila* embryos. *Genes Dev* **18**, 687-99.
- Steinberg, M. S., and McNutt, P. M.** (1999). Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 554-60.
- Steven, R., Kubiseski, T. J., Zheng, H., Kulkarni, S., Mancillas, J., Ruiz Morales, A., Hogue, C. W., Pawson, T., and Culotti, J.** (1998). UNC-73 activates the Rac GTPase and is required for cell and growth cone migrations in *C. elegans*. *Cell* **92**, 785-95.
- Stramer, B., Wood, W., Galko, M. J., Redd, M. J., Jacinto, A., Parkhurst, S. M., and Martin, P.** (2005). Live imaging of wound inflammation in *Drosophila* embryos reveals key roles for small GTPases during *in vivo* cell migration. *J Cell Biol* **168**, 567-73.
- Strutt, D. I., Weber, U., and Mlodzik, M.** (1997). The role of RhoA in tissue polarity and Frizzled signalling. *Nature* **387**, 292-5.
- Symons, M., and Settleman, J.** (2000). Rho family GTPases: more than simple switches. *Trends Cell Biol* **10**, 415-9.
- Tatsumoto, T., Xie, X., Blumenthal, R., Okamoto, I., and Miki, T.** (1999). Human ECT2 is an exchange factor for Rho GTPases, phosphorylated in G2/M phases, and involved in cytokinesis. *J Cell Biol* **147**, 921-8.
- Tepass, U.** (1999). Genetic analysis of cadherin function in animal morphogenesis. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 540-8.
- Tepass, U., Gruszynski-DeFeo, E., Haag, T. A., Omatyar, L., Torok, 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.
- Thummel, C. S.** (1992). Mechanisms of transcriptional timing in *Drosophila*. *Science* **255**, 39-40.
- van der Geer, P., Hunter, T., and Lindberg, R. A.** (1994). Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* **10**, 251-337.
- Verkhusha, V. V., Tsukita, S., and Oda, H.** (1999). Actin dynamics in lamellipodia of migrating border cells in the *Drosophila* ovary revealed by a GFP-actin fusion protein. *FEBS Lett* **445**, 395-401.
- Vernet, C., and Artzt, K.** (1997). STAR, a gene family involved in signal transduction and activation of RNA. *Trends Genet* **13**, 479-84.
- Vincent, J. P., and O'Farrell, P. H.** (1992). The state of engrailed expression is not clonally transmitted during early *Drosophila* development. *Cell* **68**, 923-31.
- Vincent, S., Wilson, R., Coelho, C., Affolter, M., and Leptin, M.** (1998). The *Drosophila* protein Dof is specifically required for FGF signaling. *Mol Cell* **2**, 515-25.
- Wasserman, R., Li, Y. S., and Hardy, R. R.** (1995). Differential expression of the blk and ret tyrosine kinases during B lineage development is dependent on Ig rearrangement. *J Immunol* **155**, 644-51.

- Weigmann, K., und Lehner, C. F.** (1995). Cell fate specification by *even-skipped* expression in the *Drosophila* nervous system is coupled to cell cycle progression. *Development* **121**, 3713-21.
- Whitehead, I., Kirk, H., und Kay, R.** (1995). Retroviral transduction and oncogenic selection of a cDNA encoding Dbs, a homolog of the Dbl guanine nucleotide exchange factor. *Oncogene* **10**, 713-21.
- Whitehead, I. P., Campbell, S., Rossman, K. L., und Der, C. J.** (1997). Dbl family proteins. *Biochim Biophys Acta* **1332**, F1-23.
- Wilson, R., Battersby, A., Csiszar, A., Vogelsang, E., und Leptin, M.** (2004). A functional domain of Dof that is required for fibroblast growth factor signaling. *Mol Cell Biol* **24**, 2263-76.
- Wilson, R., Vogelsang, E., und Leptin, M.** (2005). FGF signalling and the mechanism of mesoderm spreading in *Drosophila* embryos. *Development* **132**, 491-501.
- Wu, X., Golden, K., und Bodmer, R.** (1995). Heart development in *Drosophila* requires the segment polarity gene wingless. *Dev Biol* **169**, 619-28.
- Yanagishita, M., und Hascall, V. C.** (1992). Cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* **267**, 9451-4.
- Yap, A. S., Briehner, W. M., und Gumbiner, B. M.** (1997). Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 119-46.
- Zalcman, G., Dorseuil, O., Garcia-Ranea, J. A., Gacon, G., und Camonis, J.** (1999). RhoGAPs and RhoGDIs, (His)stories of two families. *Prog Mol Subcell Biol* **22**, 85-113.
- Zamir, E., Katz, M., Posen, Y., Erez, N., Yamada, K. M., Katz, B. Z., Lin, S., Lin, D. C., Bershadsky, A., Kam, Z., und Geiger, B.** (2000). Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nat Cell Biol* **2**, 191-6.
- Zheng, J., Chen, R. H., Corblan-Garcia, S., Cahill, S. M., Bar-Sagi, D., und Cowburn, D.** (1997). The solution structure of the pleckstrin homology domain of human SOS1. A possible structural role for the sequential association of diffuse B cell lymphoma and pleckstrin homology domains. *J Biol Chem* **272**, 30340-4.
- Zheng, Y.** (2001). Dbl family guanine nucleotide exchange factors. *Trends Biochem Sci* **26**, 724-32.

Danksagung

Ich möchte mich bei Arno dafür bedanken, dass er immer ein guter Ansprechpartner war und sich viel Zeit für die Lösung von Problemen genommen hat.

Bei allen Mitgliedern des Instituts für Genetik möchte ich mich für ihre Hilfsbereitschaft bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Nora Hinssen, die mir eine große Stütze im Labor war und Andreas van Impel für die schöne Zusammenarbeit.

Vielen Dank an meine Eltern, meine Schwester, meine Oma und natürlich meinen Freund, Jinny, Moritz und Kria, die mich immer unterstützt und ermutigt haben!

Ohne Euch wäre das alles nicht möglich gewesen!

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die 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 abgesehen von der unten angegebenen Publikation 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 Herrn PD Dr. H.-Arno J. Müller betreut worden.

Düsseldorf, 18.05.2005

Schumacher, S., Gryzik, T., Tannebaum, S. und Müller, H.A. (2004). The Rho-GEF Pebble is required for cell shape changes during cell migration triggered by the *Drosophila* FGF receptor Heartless. *Development* **131**, 2631-2640.

