

**Charakterisierung von PTEN, FKBP59 und
CG4420, Interaktionspartnern des
PDZ-Domänen-Proteins Bazooka aus
*Drosophila melanogaster***

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

vorgelegt von

Walter von Stein
aus Würzburg

Dezember 2005

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

Referent: Prof. Dr. A. Wodarz

Koreferent: Prof. Dr. R. Simon

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Januar 2006

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zellpolarität	1
1.2	Das Zytoskelett	2
1.2.1	Mikrotubuli und der gerichtete Transport zellulärer Bestandteile	3
1.2.2	Das Aktinzytoskelett	5
1.3	Oogenese in <i>Drosophila melanogaster</i>	6
1.4	Embryonalentwicklung in <i>Drosophila melanogaster</i>	8
1.5	Identifikation der <i>par</i>-Gene in <i>C.elegans</i>	12
1.6	Polarität in Epithelzellen	15
1.7	Asymmetrische Teilung von Neuroblasten	17
1.8	Themenstellung	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Chemikalien und Geräte	21
2.2	Molekularbiologische Methoden	22
2.2.1	Transformation elektrokompenter Bakterien	22
2.2.2	Isolierung von DNA	23
2.2.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	25
2.2.4	Hefe-Zwei-Hybrid System	28
2.2.5	Southern Blot	34
2.2.6	SDS-PAGE-Gelelektrophorese und Western-blot	35
2.2.7	Überprüfung der Bindung mit Ubiquitin	36
2.3	Zellkulturtechniken	37
2.3.1	Transfektion der <i>Drosophila</i> Schneiderzellen	37
2.3.2	Einfrieren der Schneiderzellen	38
2.3.3	Herstellung von S2 Zellextrakten	39
2.4	Mikromanipulation von <i>Drosophila melanogaster</i>	39
2.4.1	Keimbahntransformation	39
2.5	Genetische Methoden	42
2.5.1	Fliegenzucht	42
2.5.2	Erzeugung von Keimbahnklonen	42
2.6	Histologische Methoden	45
2.6.1	Verwendete Antikörper	45

2.6.2	Standardprotokoll für Antikörperfärbungen an Embryonen	46
2.6.3	Modifizierung des Standardprotokolls	47
2.6.4	Antikörperfärbungen an Ovarien	47
2.6.5	DNA-Fluoreszenz-Markierung mit Yoyo-1	48
2.6.6	X-Gal Färbung an Embryonen	48
2.6.7	In-situ-Hybridisierung	49
3	Resultate	52
3.1	PTEN bindet an Bazooka im Hefe-Zwei-Hybrid System	52
3.1.1	PTEN und Bazooka kolokalisieren im Embryo	53
3.1.2	PTEN und die Organisation des Aktin-Zytoskeletts in der weiblichen Keimbahn	55
3.1.3	<i>Pten</i> Mutanten zeigen frühe embryonale Entwicklungsdefekte	58
3.1.4	Live-Aufnahmen von <i>Pten</i> Keimbahnklon Embryonen	62
3.2	Die Interaktion von Bazooka und FKBP59	65
3.2.1	Bazooka bindet an FKBP im Hefe-Zwei-Hybrid System	65
3.2.2	Transfektion von <i>Drosophila</i> Schneiderzellen mit <i>FKBP59</i>	66
3.2.3	Bazooka und FKBP59 kolokalisieren in Schneiderzellen	67
3.2.4	Embryonales Expressionsmuster von FKBP 59 im Embryo	68
3.2.5	Erzeugung von FKBP59 Mutanten	69
3.2.6	Potentielle FKBP59 Mutanten zeigen frühe embryonale Entwicklungsdefekte	69
3.2.7	Analyse der Revertanten	70
3.2.8	Erzeugung von FKBP59 überexprimierenden Fliegen	76
3.3	Die Interaktion von Bazooka und CG4420	77
3.3.1	CG4420 bindet an Bazooka im Hefe-Zwei-Hybrid System	77
3.3.2	Transfektion von <i>Drosophila</i> S2-Zellen mit CG4420	77
3.3.3	CG4420 und Bazooka kolokalisieren in Schneiderzellen	78
3.3.4	Erzeugung von CG4420 überexprimierenden Fliegen	79
3.3.5	Erste Hinweise einer Bindung von Ubiquitin an CG4420	79
4	Diskussion	81
4.1	PTEN und der PI3 Kinase Signalweg	81
4.1.1	PTEN Aktivität wird in Aktin-abhängigen Prozessen in <i>Drosophila</i> benötigt	85
4.1.2	PTEN Aktivität könnte durch seine subzelluläre Verteilung reguliert werden	87
4.1.3	PTEN reguliert eventuell aPKC und Cdc42	88
4.2	Die mögliche Bedeutung eines Komplexes zwischen Bazooka und FKBP59	89
4.3	Die Interaktion zwischen CG4420 und Bazooka	92

5	<i>Zusammenfassung</i>	95
6	<i>Literatur</i>	96
7	<i>Anhang</i>	111
7.1	Abkürzungen	111

1 Einleitung

1.1 Zellpolarität

Die Ausbildung einer Zellpolarität spielt bei vielen entwicklungsbiologischen Prozessen eine zentrale Rolle. Häufig bildet die Polarität einer Zelle die Grundlage für gerichtete Sekretion, Signalübertragung oder lokales Zellwachstum. Oft ist Zellpolarität die Voraussetzung für asymmetrische Zellteilungen und damit verbunden für das Festlegen unterschiedlicher Zellschicksale. Wie wird die Polarität etabliert, reguliert und aufrechterhalten? Die Polarisierung einer Zelle beginnt über ein intrinsisches oder extrinsisches Signal an der Zelloberfläche, welches die Polarität der Zelle orientiert. Dann folgt eine Interpretation des Signals über Rezeptoren und Signalmoleküle. Dies löst die verschiedenartigsten Reaktionen in einer Zelle aus: Zellmembranbestandteile können umsortiert oder gebildet werden, das Zytoskelett kann die Zellstruktur ändern und Organelle verschieben oder dafür sorgen, daß bestimmte Proteine an ihren Bestimmungsort transportiert werden. Die Zelle wird asymmetrisch. Dies kann eine morphologische Asymmetrie sein, wie im Falle von migratorischen Zellen, die einen sogenannten Leitsaum (Leading edge) in Richtung ihrer Migration ausbilden. Auch in Epithelzellen, die verschiedene Kompartimente voneinander trennen, ist eine morphologische Polarität offensichtlich (Abb. 1-1) (Review in Nelson, 2003).

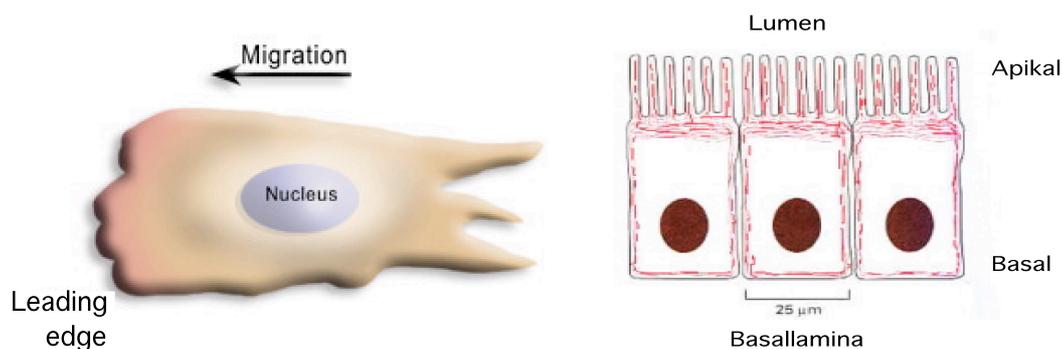


Abbildung 1-1: Eine migratorische Zelle und ein Epithel. Die migratorische Zelle bildet in Richtung ihrer Wanderung einen Leitsaum. Das Epithel trennt Kompartimente. Eine Epithelzelle ist polarisiert und weist eine apikale Membrandomäne, die zum Lumen gewandt ist und eine basolaterale Domäne, die zur Basallamina oder den benachbarten Zellen gerichtet ist, auf (nach Alberts, 1994).

Oft läßt sich allerdings keine morphologische Asymmetrie erkennen, wie zum Beispiel bei den Neuroblasten in *Drosophila*. Die Neuroblasten in *Drosophila* sind runde Zellen, die morphologisch symmetrisch sind. Wenn man diese Zellen jedoch auf die Verteilung einiger Proteine oder mRNAs untersucht, kann man erkennen, daß auch hier eine ausgeprägte Polarität vorhanden ist. Wenn sich Neuroblasten teilen wird auch ein morphologischer Unterschied erkennbar, da eine solche Teilung in zwei Zellen unterschiedlicher Größe resultiert (Abb. 1-2) (Review in Wodarz, 2005).

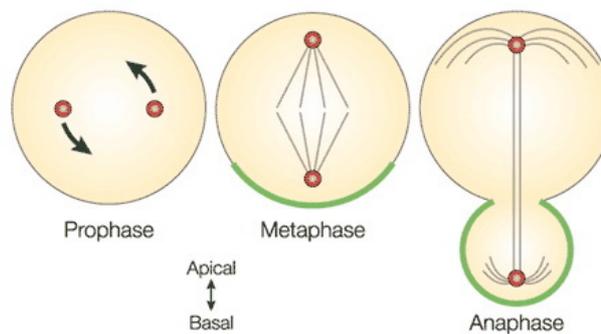


Abbildung 1-2: Die asymmetrische Teilung eines Neuroblasten in *Drosophila*. Zu Beginn der Teilung rotiert die mitotische Spindel um 90°. Anschließend teilt sich der Neuroblast und zwei verschieden große Tochterzellen entstehen. Einige Zellschicksalsdeterminanten werden ausschließlich auf die kleinere Zelle verteilt (Jan und Jan, 2001).

In all diesen Prozessen spielt das Zytoskelett eine grundlegende Rolle. Über das Zytoskelett werden die Zellform und der gerichtete Transport zellulärer Bestandteile reguliert. Aus diesem Grunde soll es hier näher vorgestellt werden.

1.2 Das Zytoskelett

Polarität in Eukaryonten zu etablieren und aufrecht zu erhalten ist eine der Hauptaufgaben des Zytoskeletts. Es ist dafür zuständig, daß Zellen bestimmte Formen annehmen, sich koordiniert bewegen, zytoplasmatische Komponenten und Proteine richtig transportiert und positioniert werden und sich Zell-Zell Kontakte bilden. Das Zytoskelett besteht in der Regel aus drei Komponenten: den Mikrotubuli, dem Aktinzytoskelett, und den intermediären Filamenten. Die Mikrotubuli sind sehr dynamische Strukturen, welche über Motorproteine Organelle oder Vesikel transportieren und somit für deren spezifische Verteilung sorgen. Das Aktinzytoskelett bildet Bündel und Netzwerke, hauptsächlich am Zellkortex direkt unterhalb der Zellmembran. Über das Aktinnetzwerk wird nicht nur die Form einer Zelle reguliert und stabilisiert, sondern auch dessen Motilität gesteuert. In vielen

Zellen gibt es noch die intermediären Filamente, die für die mechanische Stabilität einer Zelle sorgen. In Epithelzellen vieler Organismen durchziehen sie das Zytoplasma zwischen den gegenüberliegenden Zellverbindungen und sorgen so für Stabilität (Alberts et al., 1994). Da in *Drosophila* keine intermediären Filamente existieren, sollen diese hier nicht näher betrachtet werden (Fyrberg und Goldstein, 1990). Die Mikrotubuli und das Aktinnetzwerk sind für die Polarität einer Zelle von besonderer Bedeutung und deswegen sollen diese Komponenten des Zytoskeletts hier etwas ausführlicher betrachtet werden.

1.2.1 Mikrotubuli und der gerichtete Transport zellulärer Bestandteile

Mikrotubuli sind lange, steife Polymere, die aus Tubulinmolekülen geformt werden. Jedes dieser Tubulinmoleküle besteht aus einem Heterodimer von α - und β -Tubulin. Es entsteht eine zylindrische Form, in der die Tubulinheterodimere um einen hohlen Kern gepackt werden. Dieser Zylinder ist polar, mit einem Plus- und einem Minusende. Das Plusende zeichnet sich dadurch aus, daß es über die Aufnahme von neuen Tubulinmolekülen sehr schnell wachsen kann. Das Minusende hingegen ist weniger stabil und tendiert dazu, Untereinheiten zu verlieren, wenn es nicht stabilisiert wird (Amos und Klug, 1974; Bryan und Wilson, 1971; Chretien und Wade, 1991; Erickson, 1974; Gelfand und Bershadsky, 1991).

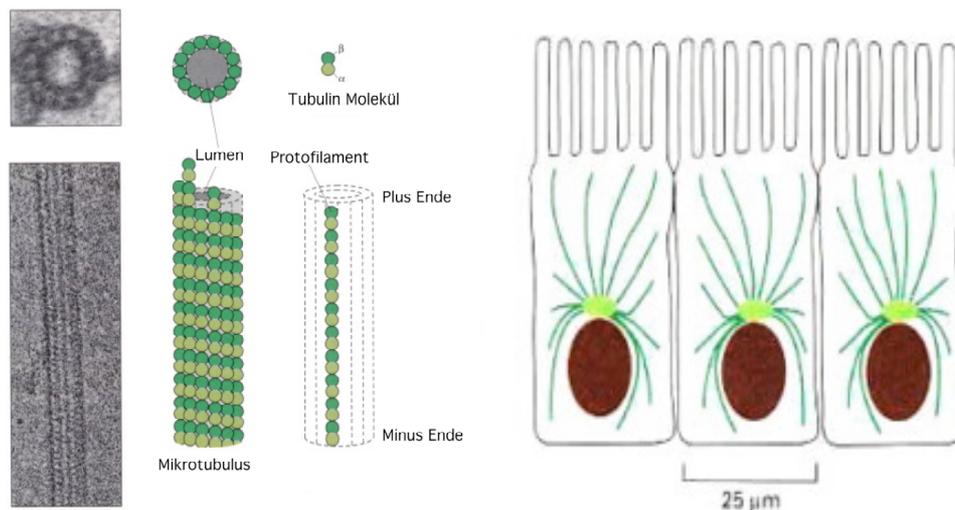


Abbildung 1-3: Der Aufbau von Mikrotubuli und deren Verteilung in Epithelzellen. Mikrotubuli sind lange, hohle Zylinder, die aus Tubulin bestehen. Normalerweise ist das Minusende in einem Mikrotubuli Organisationszentrum (MTOC) verankert, in dem es stabilisiert wird. In den Epithelzellen ist das MTOC das Zentrosom (Gelb)(nach Albert et al., 1994).

In den meisten Fällen besitzen Zellen ein Mikrotubuli Organisationszentrum (Microtubuli Organizing Center, MTOC) wie zum Beispiel die Zentrosomen, in denen das Minusende der Mikrotubuli verankert ist und dadurch stabilisiert wird (Bornens, 2002). Das freie Plusende kann ungehindert weitere Tubulinmoleküle anhängen und somit wachsen. Zu einem gegebenen Zeitpunkt können einige hundert Mikrotubuli aus einem Zentrosom wachsen, von denen einige bis hin zur Zellmembran reichen (Abb. 1-3). Es sind sehr dynamische Strukturen, die, nachdem sie einige Zeit elongieren, auch wieder depolymerisieren, kürzer werden und verschwinden. Das Zentrosom schickt immer neue Mikrotubuli auf den Weg um alte, depolymerisierte Mikrotubuli zu ersetzen. Der Prozeß der Entwicklung neuer Mikrotubuli nennt sich Nukleation. Die Dynamik der Mikrotubuli wird besonders offensichtlich, wenn man sich die Halbwertszeiten betrachtet: die Halbwertszeit der Mikrotubuli beträgt nur circa 10 Minuten, während die Halbwertszeit der Tubulinmoleküle über 20 Stunden betragen kann. Wenn Mikrotubuli ständig polymerisieren und depolymerisieren würden, wäre es schwierig eine stabile Polarität aufrecht zu erhalten. Diese Problematik wird umgangen, indem die willkürlich wachsenden Mikrotubuli in manchen Regionen der Zelle, je nach Bedarf, verankert und stabilisiert werden können. Diese stabilisierten Mikrotubuli werden dann mittels Acetylierung und Detyrosinierung weiter modifiziert und binden schließlich bestimmte Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs), welche die Mikrotubuli weiter stabilisieren und so für eine anhaltende Polarität sorgen (Alberts et al., 1994; Gelfand und Bershadsky, 1991; Mandelkow et al., 1991; Mitchison und Kirschner, 1984). Zu den MAPs gehören auch die Motorproteine, die sich über ATP Hydrolyse richtungsspezifisch entlang der Mikrotubuli bewegen und Lasten wie Organelle oder Vesikel transportieren können. Es wird zwischen den Dyneinen, welche sich Richtung Minusende bewegen und den Kinesinen, welche für den Transport zum Plusende zuständig sind, unterschieden. Über die polare Struktur der Mikrotubuli, deren Verankerung in bestimmten Regionen der Zelle und richtungsspezifischen Transport durch Motorproteine kann eine spezifische Verteilung von Organellen und Proteinen (z. B. über Vesikeltransport) gewährleistet werden (Bloom, 1992; Gelfand und Scholey, 1992; Olmsted, 1986; Skoufias und Scholey, 1993; Vale et al., 1985). Andere Aspekte einer Zelle, wie zum Beispiel Form, Migration und Zusammenhalt, werden nicht über die Mikrotubuli sondern über das Aktinzytoskelett gesteuert.

1.2.2 Das Aktinzytoskelett

Aktinfilamente bestehen aus einer kompakten Helix von einheitlich orientierten Aktinmolekülen. Wie die Mikrotubuli sind auch die Aktinfilamente polare Strukturen mit einem schnell wachsenden Plusende und einem langsam wachsenden Minusende. Im Gegensatz zu Mikrotubuli sind Aktinfilamente jedoch keine „Einzelkämpfer“ sondern sie bilden Netzwerke und Bündel. So finden sich Aktinfilamente direkt unterhalb der Zellmembran. Sie sind über verschiedene Aktin-bindende Proteine vernetzt und bilden den Zellkortex (Abb. 1-4).

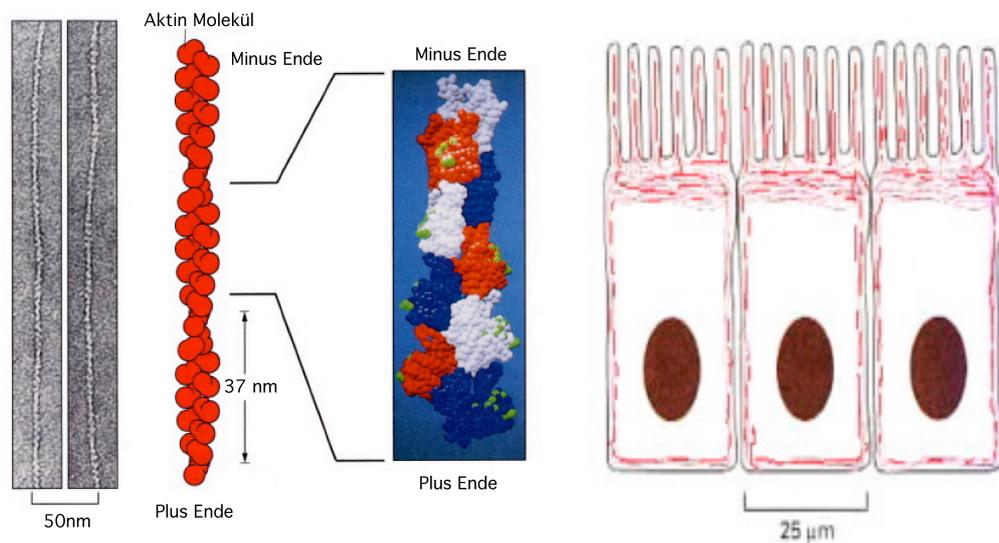


Abbildung 1-4: Das Aktinzytoskelett: Aktinfilamente sind zweisträngige Polymere, die aus Aktin bestehen. Es sind flexible Strukturen die Bündel, zwei-dimensionale Netzwerke oder drei-dimensionale Gele bilden können. Meist ist die Aktinkonzentration in einer Zelle im Zellkortex, direkt unterhalb der Zellmembran am stärksten, was hier an Epithelzellen gezeigt ist (nach Alberts et al., 1994).

Die Nukleation der kortikalen Aktinfilamente geht von der Plasmamembran aus. Verschiedene Regionen der Plasmamembran können die Nukleation verschiedener, aktinfilament-basierender Strukturen auslösen (Alberts et al., 1994; Kabsch und Vandekerckhove, 1992; Mitchison, 1992; Wegner, 1976). Umstrukturierungen des Zellkortex spielen bei der Zytokinese, der Phagozytose und der Zellbewegung eine bedeutende Rolle. Wenn eine Zelle sich über eine Oberfläche bewegt, bildet sich der sogenannte Leitsaum (Leading Edge), der aus Lamellipodien besteht. Die Lamellipodien sind sehr aktinreich und dynamisch und erlauben es der Zelle, sich über kontinuierliche Nukleation neuer Aktinfilamente und der Elongation bestehender Aktinfilamente über die Oberfläche

fortzubewegen (Alberts et al., 1994; Condeelis, 1993a; Condeelis, 1993b; Fukui, 1993; Small, 1989). Wie die Mikrotubuli besitzen auch die Aktinfilamente spezifische Motorproteine, die Myosine, die Lasten, wie zum Beispiel sekretorische Vesikel, entlang der Filamente zu einem spezifischen Ort transportieren können und somit eine weitere Auswirkung auf die Polarität einer Zelle haben (Alberts et al., 1994; Korn und Hammer, 1990; Pollard et al., 1991; Titus, 1993). Das Aktinzytoskelett spielt also eine entscheidende Rolle nicht nur in der Etablierung oder Veränderung der Zellform, sondern auch in der Verteilung von Proteinen entlang der Plasmamembran.

Da nun die Strukturen, die für die Ausprägung von Zellpolarität von Bedeutung sind vorgestellt wurden, werfen sich einige Fragen auf: Welche Proteine steuern diese Prozesse? Gibt es Gemeinsamkeiten zwischen verschiedenen Aspekten der Zellpolarität? Lassen sich evolutionär konservierte Aspekte in der Etablierung oder Aufrechterhaltung der Zellpolarität finden? Diese Fragen sind in Teilen schon beantwortet, aber es gibt noch viele unbekannte Faktoren. Um diese Fragen zu beantworten, wurden in dieser Arbeit Polaritätsaspekte der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* in der Oogenese und der Embryogenese untersucht. Aus diesem Grunde sollen diese beiden Entwicklungsstadien hier kurz dargestellt werden.

1.3 Oogenese in *Drosophila melanogaster*

Die Eikammern von *Drosophila melanogaster* eignen sich auf Grund ihrer Größe besonders gut, um Aspekte die an der Ausbildung und Aufrechterhaltung von Zellpolarität beteiligt sind, zu erforschen. Hierbei ist es wichtig zu verstehen, wie diese Eikammern gebildet werden. Die Fruchtfliege besitzt zwei Eistöcke, die Ovarien. Ein Ovar setzt sich aus circa 15 Ovariolen zusammen. Die Ovariolen münden dann in einen seitlichen Eileiter. Die beiden seitlichen Eileiter vereinigen sich zum zentralen Eileiter. Nach der Befruchtung wird das Ei abgelegt und beginnt sofort seine Entwicklung (Spradling, 1993a) (Abb. 1-5).

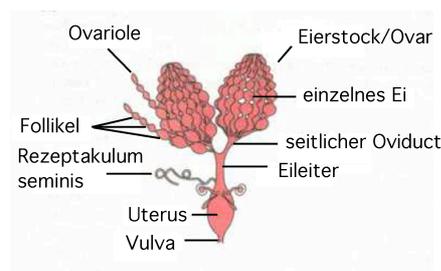


Abbildung 1-5: Der weibliche Genitalapparat von *Drosophila melanogaster* (www.zum.de).

Die eigentliche Entwicklung des Eis findet in den Ovariolen statt. Die jüngsten Stadien befinden sich an der Spitze des Germariums. Hier befinden sich zwei Keimbahnstammzellen. Die Teilung einer Keimbahnstammzelle resultiert in zwei neuen Zellen, die unterschiedliche Größen und Funktionen aufweisen. So entstehen eine neue Keimbahnstammzelle und eine Tochterzelle, der Zystoblast, der weitere 4 mitotische Teilungen mit unvollständigen Zytokinesen durchläuft. Am Ende dieses Prozesses ist die Keimbahnzyste entstanden, die aus 16 Keimbahnzellen besteht. Die Keimbahnzellen sind alle über Ringkanäle miteinander verbunden (Abb. 1-6)(de Cuevas et al., 1997; Munn und Steward, 2000). Eine der Zellen, die mit 4 anderen Zellen über Ringkanäle direkt verbunden ist, entwickelt sich zur Eizelle (Oozyte), die anderen werden zu Nährzellen.

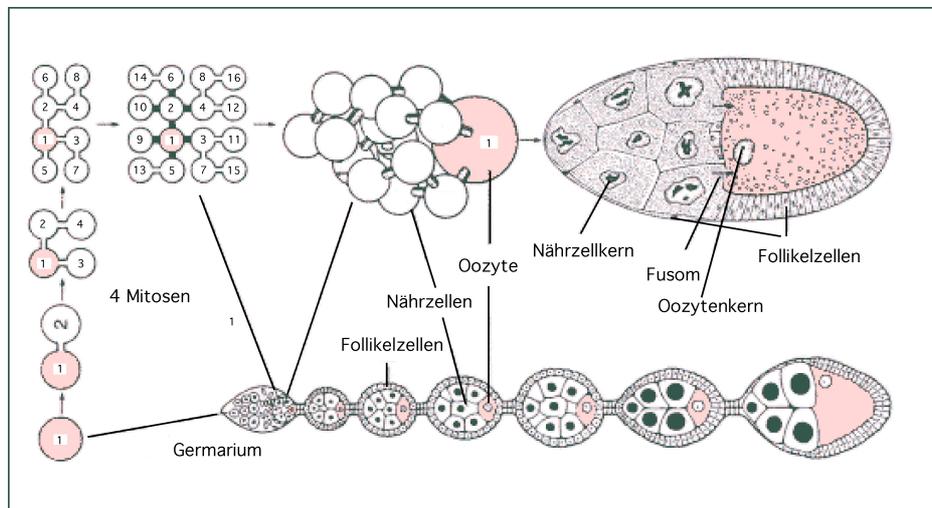


Abbildung 1-6: Aufbau eines Ovariolenstranges. Ein Oogonium (1) durchläuft 4 Mitosen und es entsteht eine Zyste, die aus 16 Zellen besteht. Die entstehenden Zellen bleiben durch die Ringkanäle miteinander verbunden. In der Reihenfolge ihrer Entstehung sind sie nummeriert. Entweder Zelle (1) oder Zelle (2), also eine der Zellen, die über Ringkanäle mit 4 anderen Zellen verbunden ist, wird später zur Eizelle. Die anderen 15 Zellen werden zu Nährzellen. Diese werden polyploid und stellen Stoffe her, die in die Eizelle transportiert werden. Der ganze Komplex ist von Follikelzellen umgeben, die somatischen Ursprungs sind (nach Müller, 1996).

Grundvoraussetzung für die Determination der Oozyte ist ein intaktes Mikrotubulinetzwerk. Die Organisation dieses Netzwerks beruht auf einem Organell, welches sich Fusom nennt. Es handelt sich hier um ein Organell, welches verschiedene Aufgaben in der frühen Oogenese erfüllt und ausschließlich in der sich entwickelnden Zyste zu finden ist. Es besteht aus einem Netzwerk von zytoskelettalen Proteinen wie α - und β -Spektrin, Ankyrin, hu-li-tai shao, und dem Motorprotein Dynein (de Cuevas und Spradling, 1998). Während der Teilungen der Keimzelle erstreckt sich das Fusom von der Zystoblaste in

die anderen Zellen und bildet eine verzweigte Struktur. Während sich die Zystozyten teilen, bleibt das Fusom mit jeweils einem Spindelpol der sich teilenden Zelle verankert und führt die Zellen so durch ein bestimmtes Teilungsschema. Das Fusom selbst wird asymmetrisch auf die entstehenden Zysten verteilt und bildet ein Netzwerk durch alle Zellen. Später agiert es als Gerüst und unterstützt die Wanderung der Zystozytenzentromere in die Oozyte. Ebenso wird durch das Fusom ein für die Oozyte spezifisches Mikrotubuli Organisationszentrum (MTOC) gebildet (Bolivar et al., 2001; Grieder et al., 2000; Lin und Spradling, 1995; Vaccari und Ephrussi, 2002). Diese Prozesse sind für die Spezifikation der Oozyte unabdinglich. Das MTOC wandert zum posterioren Pol der Oozyte. In den nun folgenden Stadien der Oogenese wird die Eizelle repolarisiert. Determinanten für die anteriore/posteriore Achse erreichen ihre endgültigen Positionen. Diese späteren Prozesse hängen auch von den Follikelzellen ab, welche sich während der Entwicklung über die Eikammer ziehen (Roth, 2001). Sie konzentrieren sich über der Oozyte und bilden dort ein säulenartiges Epithel, während sie über den Nährzellen ein Plattenepithel bilden. Die Follikelzellen entwickeln sich nicht aus den Keimbahnzellen sondern sind somatischen Ursprungs. Eine spezialisierte Population der Follikelzellen sind die Grenzzellen. Es handelt sich hier um eine kleine Gruppe von Follikelzellen, die von anterior nach posterior zwischen den Nährzellen hindurch wandern, bis sie zur Oozyte gelangen. Wenn sie dort angekommen sind beginnt eine Bewegung der anterioren, oozytenassoziierten Follikelzellen, den zentripetalen Follikelzellen, in Richtung Grenzzellen, bis sie diese erreichen (Gonzalez-Reyes und St Johnston, 1998; van Eeden und St Johnston, 1999). Später ist es die Rolle der Follikelzellen, eine Vitellinmembran zu sekretieren.

Am Ende wird das Zytoplasma der Nährzellen in die Oozyte transportiert. Dies ist ein Prozeß, der auch vom Zytoskelett abhängt. Die Nährzellen degenerieren und die Follikelzellen bilden eine Schicht über der Eikammer, das sogenannte Chorion. Die Grenzzellen, zusammen mit den zentripetalen Follikelzellen, bilden noch die Mikropyle, durch welche das Spermium in das Ei tritt (Spradling, 1993a).

1.4 Embryonalentwicklung in *Drosophila melanogaster*

Die ausgebildeten Oozyten werden einzeln im Uterus befruchtet (Huettner, 1924; Wolfner, 1997). Sobald das Ei befruchtet ist wird es aktiviert und vollendet die Meiose. Dies resultiert in 4 haploiden Kernen, von denen einer in das Zentrum des Eis wandert. Die anderen 3 bilden die Polarkörperchen, welche einen Komplex am Kortex bilden (Callaini und

Riparbelli, 1996; Riparbelli und Callaini, 1996). Die frühe embryonale Entwicklung findet in einem Synzytium statt und verläuft sehr schnell. So vergehen während der ersten 13 Kernteilungen nur ca. 3 Stunden. Diese Teilungen finden alle ohne Zytokinese statt und es entsteht ein Embryo mit ca. 6000 Kernen, die sich ein gemeinsames Zytoplasma teilen (Tram et al., 2002). Während der vierzehnten Kernteilung beginnt die Zellularisierung und es bildet sich eine Membran zwischen den Zellkernen. Individuelle Zellen entstehen am Kortex des Embryos. Die hohe Geschwindigkeit der ersten Teilungen liegt daran, daß diese ersten dreizehn Teilungen keiner Transkription bedürfen (Edgar und Schubiger, 1986), es wird auf maternale Komponenten, die im Embryo gespeichert sind, zurückgegriffen. Es findet auch keine Zytokinese statt und die G1 und G2 Phasen des Zellzyklus sind extrem verkürzt. Während der ersten drei Teilungen verbleiben die Kerne im anterioren Drittel des Embryos und sind dort sphärenförmig angeordnet. Die Zyklen 4 –6 sind von der axialen Expansion geprägt, in der die Kerne sich ellipsenartig entlang des Embryos verteilen (Baker et al., 1993; Zalokar und Erk, 1976). Die Migration Richtung Kortex beginnt im 8. Zyklus und die ersten Kerne erreichen den posterioren Pol im 9. Zyklus. Dies sind die Kerne, die im 10. Zyklus die Polzellen bilden. Die übrigen Kerne erreichen einheitlich den Kortex, durchlaufen 4 weitere synchrone Teilungen und beginnen dann während der Interphase der 14. Teilung mit der Zellularisierung (Abb. 1-7) (Baker et al., 1993; Foe und Alberts, 1983; Sullivan und Theurkauf, 1995; Zalokar und Erk, 1976). Die Kontrolle der Verteilung der Kerne wird während der ersten 3 Teilungen über astrale Mikrotubuli, die vom Zentrosom gebildet werden, gesteuert. Über die Mikrotubuli wird erreicht, daß die Kerne nicht fusionieren oder zusammenstoßen, sondern einen gewissen Abstand zueinander haben. Nun folgen zwei unterschiedlich regulierte Phasen der Kernwanderung: die axiale Expansion und die kortikale Wanderung. Die axiale Expansion ab Zyklus 4 wird von Mikrofilamenten des Aktinzytoskeletts und nicht von den Mikrotubuli gesteuert. In dieser Phase verteilen sich die Kerne entlang des Embryos. Anschließend folgt die kortikale Wanderung, in der die Kerne zur Plasmamembran wandern. Dieser Prozeß hängt wieder von den Mikrotubuli ab (Baker et al., 1993; von Dassow und Schubiger, 1994; Zalokar et al., 1975).

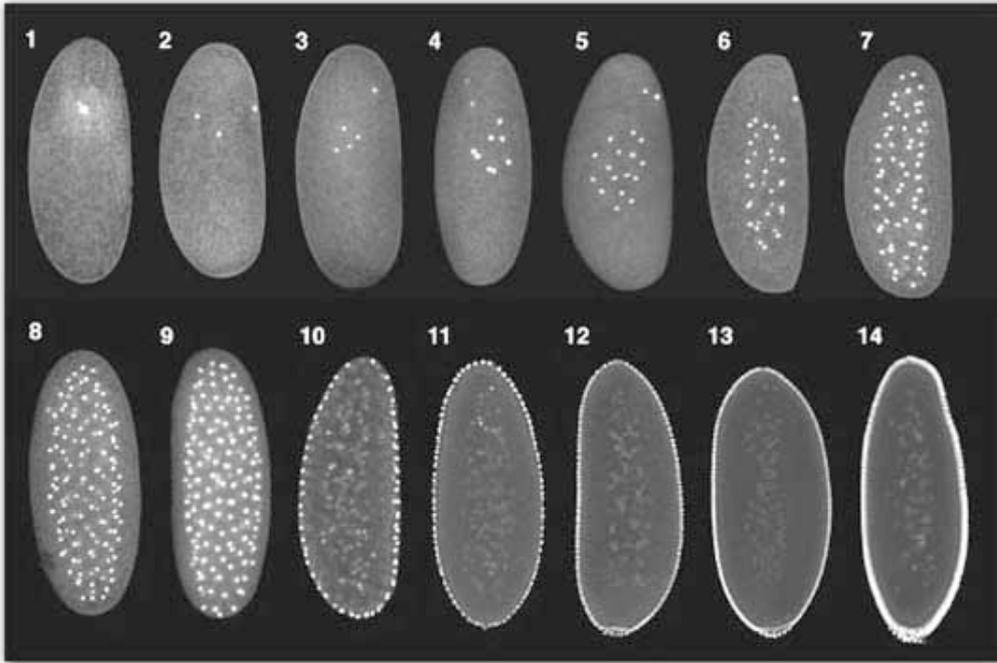


Abbildung 1-7: Verteilung der Zellkerne während der frühen Embryogenese. Die ersten 13 Zellteilungen sind innerhalb von 3 Stunden abgeschlossen. Es findet keine Zytokinese statt und so entsteht ein Synzytium aus ungefähr 6000 Kernen. Während der ersten 3 Teilungen verbleiben die Kerne im anterioren Drittel des Embryos (1-4). Anschließend folgt die axiale Expansion und die Kerne verteilen sich entlang des Embryos (5-7). Die Migration in Richtung Kortex beginnt im 8. Zyklus. Die Kerne erreichen den Kortex und bilden dort eine gut organisierte Schicht (9-13). Während der Interphase der 14. Kernteilung beginnt die Zellularisierung (14)(<http://bio.research.ucsc.edu/people/sullivan/research.html>).

Die Teilungen 10 bis 13 finden direkt im aktinreichen Kortex unterhalb der Plasmamembran statt. Wenn die Kerne zum Kortex kommen, wird das gleichmäßig verteilte Aktin umgeordnet. Während der Interphase konzentriert sich Aktin apikal eines jeden Kerns und dessen Zentrosomen, welche zu diesem Zeitpunkt auch apikal des Kerns angelagert sind (Abb. 1-8) (Karr und Alberts, 1986; Warn und Magrath, 1983; Warn et al., 1984). In der Prophase wandern die Zentrosomen zu den gegenüberliegenden Polen und auch das Aktin verteilt sich, so daß es einen Ring um die Zentrosomen und den dazwischenliegenden Kern bildet. Interessanterweise entsprechen diese Ringe in ihrer Zusammensetzung den kontraktilen Ringen, die sich in der Zytokinese bilden. Die Ringe sind mit der Plasmamembran assoziiert. Entlang dieser Ringe bilden sich die Pseudofurchen, die sich jeweils seitlich der Zentrosomen, zwischen den benachbarten Kernen bilden. Während der Ana- und Telophase wird die Furche wieder zurückgebildet. Die Zentrosomen werden nun verdoppelt, wandern wieder nach apikal und der Prozeß beginnt erneut (Warn und Magrath, 1983; Warn et al., 1984)(Abb. 1-8).

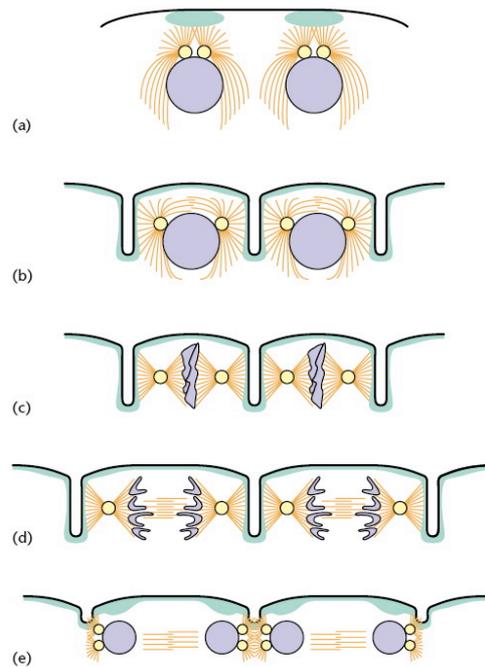


Abbildung 1-8: Bildung der Pseudofurche. (a) Während der Interphase bildet das Aktin (grün) eine Haube oberhalb des Kerns (blau) und seiner Zentrosomen (gelb). (b) In der Prophase wandern die Zentrosomen zu den entgegengesetzten Polen und das Aktin bildet einen Ring apikal des Kerns und seiner Zentrosomen. (c) In der Metaphase erreicht die Furche ihre größte Tiefe von ca. 10 µm und trennt so die Kerne voneinander ab. (d und e) Während der Ana- und Telophase degeneriert die Furche. Die Zentrosomen werden verdoppelt und wandern letztendlich wieder zum apikalen Pol des Kerns (Tram et al., 2002).

In der vierzehnten Teilung verbleiben die Kerne in der Interphase und der Prozeß der Zellularisierung beginnt. Dieser ist erneut abhängig von der Ausbildung von Mikrotubuli, welche von den apikalen Zentrosomen ausgehen und sich basal entlang des gestreckten Kerns anlagern. Diese Mikrotubuli führen die Furche in einer langsamen ersten Phase und dann einer zweiten schnellen Phase entlang des Kerns. Sobald sie eine Länge von ca. 35 µm erreicht haben bilden sie einkernige Zellen (Abb. 1-9) (Tram et al., 2002). Sobald die Zellularisierung abgeschlossen ist, beginnt die Gastrulation. Aus der einzelligen Schicht entstehen Endo-, Meso- und Ektoderm. Aus diesen Gewebepremordien bilden sich alle larvalen Organe. So wird aus dem Endoderm der Mitteldarm, aus dem Mesoderm entstehen Muskeln, das Dorsalgefäß (Herz), Blut und Fettkörper, und aus dem Ektoderm werden die Epidermis, das zentrale Nervensystem und der Vorder- und Hinterdarm gebildet (Gilbert, 2003).

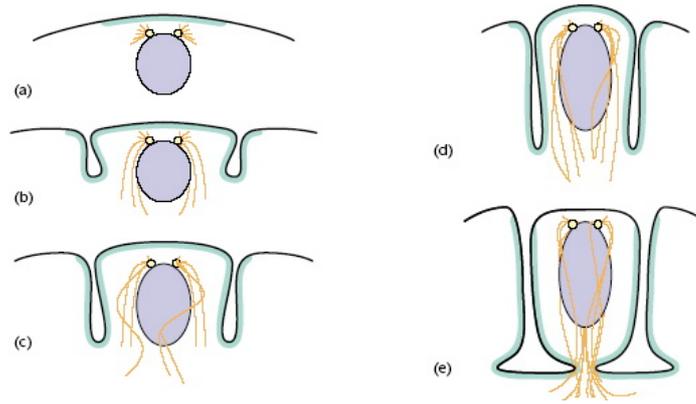


Abbildung 1-9: Bildung der Zellularisierungsfurche. (a) $t=0$, Aktin (grün) bildet eine Haube oberhalb des Kerns (blau) und seinen Zentrosomen (gelb). Aster Mikrotubuli werden gebildet (rot). (b) $t=10$, Die Membran beginnt zu invaginieren und Aktin ist am Kortex und an der Furchenfront konzentriert. Mikrotubuli elongieren in Richtung Zytoplasma. (c) $t=20$, langsame Phase. Mikrotubuli umgeben den gestreckten Kern. Aktin ist nach wie vor am Kortex und entlang der Furche konzentriert. (d) $t=40$, schnelle Phase. Furchenfront invaginiert sehr schnell, sobald sie am Kern vorbei ist. Kurz vor Ende der Zellularisierung (e) $t=60$ erreicht die Furche die Dotterschicht im Zytoplasma und beginnt die sich formende Zelle abzuschneiden. Ein kontraktiler Ring wird gebildet, welcher unter anderem aus Aktin besteht (Tram et al., 2002).

Nachdem nun die frühen Entwicklungsprozesse in *Drosophila* dargestellt wurden, sollen einige der Proteine, die bei der Etablierung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität von Bedeutung sind, vorgestellt werden. Um Proteine zu identifizieren, die an der Ausbildung der Polarität beteiligt sind, wurden in verschiedenen Organismen genetische Screens durchgeführt. Da der Ursprung des asymmetrischen Aufbaus eines Organismus bis in das früheste Einzellstadium zurückreicht, suchte man nach Polaritätsdefekten in der Eientwicklung.

1.5 Identifikation der *par*-Gene in *C.elegans*

Bereits die erste Teilung des einzelligen Embryos in *C.elegans* ist asymmetrisch. Die als P0 bezeichnete Zelle teilt sich entlang einer anterior/posterioren Achse und es entsteht eine größere Zelle, die AB Zelle und eine kleinere Zelle, die P1 Zelle. Die *C.elegans* Oozyte enthält die gleichmäßig verteilten P-Granula, große ribonukleäre Partikel, die in wild-typ Oozyten in die P1 Zelle segregiert werden (Kemphues et al., 1988). Eine Studie letaler maternaler Effekt-Mutanten führte zur Identifikation der ersten 4 *par*-Gene (Partitioning defective), *par1-4*. Die Mutationen führen zu einer abnormalen Spindelpositionierung und zu einer Fehlverteilung der P-Granula (Kemphues et al., 1988). Später wurden noch *par-5* und *par-6* identifiziert (Hung und Kemphues, 1999; Morton et al., 2002). Ein Protein, welches mit den PAR-Proteinen interagiert ist die atypische Proteinkinase C (PKC-3) (Izumi et al.,

1998; Ohno, 2001). Im Nematoden *C.elegans* beginnt die Polarisierung des Eis nach der Befruchtung. Das ausschlaggebende Signal stammt von den Zentrosomen des Spermiums, die eine Verbindung zum Aktinzytoskelett des Eis bilden und die Polarisierung initiieren (Rappleye et al., 2002). Dort wo das Spermium in die Eizelle eindringt bildet sich später der posteriore Pol. Sobald das Spermium in die Eizelle eingedrungen ist, kann man eine Bewegung des Zytoplasmas in Richtung Pronukleus des Spermiums beobachten, die über die Bildung von Mikrotubuli, die von den Zentrosomen des Spermiums ausgehen, angetrieben wird (Goldstein und Hird, 1996; Pellettieri und Seydoux, 2002; Sadler und Shakes, 2000; Wallenfang und Seydoux, 2000). Es folgt eine dramatische Umorganisation der Polaritätsproteine. Par-1, eine Serin Threonin Kinase, und Par-2, ein Protein mit Ring-finger Domäne, lokalisieren in der posterioren Hälfte des Kortex. PAR-3 und PAR-6, zwei PDZ-Domänen Proteine, zusammen mit der PKC-3, werden anterior angelagert (Abb. 1-10).

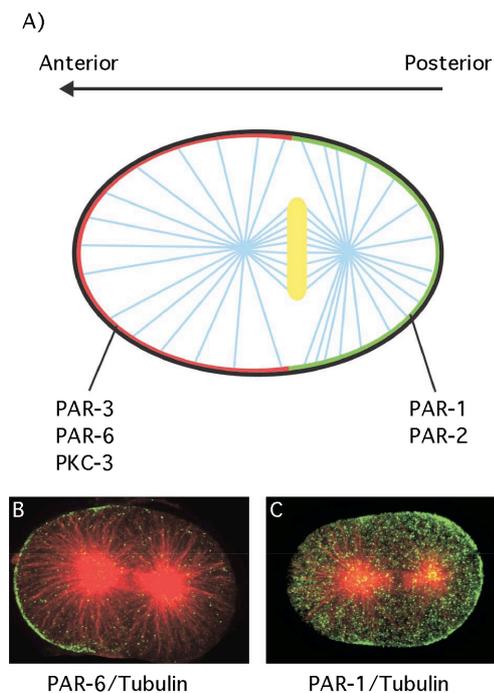


Abbildung 1-10: Zellpolarität in der *C.elegans* Zygote. A) Der Kortex der Zygote ist in distinkte anteriore und posteriore Domänen aufgeteilt. PAR-3, PAR-6 und PKC-3 (rot) sind im anterioren Kortex lokalisiert. PAR-1 und PAR-2 (grün) befinden sich im posterioren Kortex. Die mitotische Spindel befindet sich näher am posterioren Pool, was in der Generation von zwei unterschiedlich großen Tochterzellen resultiert. Aster Mikrotubuli (blau) gehen aus dem Spindelpol hervor und erreichen den Kortex. Das Metaphasenchromosom ist in gelb gezeigt. B+C) Immunfluoreszenzfärbung von wild-typ *C.elegans* Zygoten mit anti- α -Tubulin (rot) und in grün PAR-6 (B) oder PAR-1 (C) (Wodarz, 2002).

Bei diesem Prozeß sind die Proteine voneinander abhängig. PAR-3, PAR-6 und PKC-3 werden benötigt, um PAR-2 zu lokalisieren. Umgekehrt ist auch PAR-2 notwendig, um die

Anlagerung von PAR-3, PAR-6 und PKC-3 in der anterioren Hälfte zu gewährleisten. PAR-1 jedoch wird nicht benötigt, um die übrigen PARs zu lokalisieren, es ist jedoch selbst auf alle anderen PARs angewiesen, um korrekt lokalisiert zu werden. Das bedeutet, daß die Interaktion zwischen PAR-3/PAR-6/PKC-3 und PAR-2 distinkte anteriore und posteriore Domänen generiert, was anschließend in der Lokalisierung von PAR-1 resultiert. Die genauen Mechanismen dieser Lokalisierung sind nicht bekannt (Boyd et al., 1996; Etienne-Manneville und Hall, 2001; Guo und Kemphues, 1995; Hung und Kemphues, 1999; Tabuse et al., 1998). Die Anordnung der PAR Proteine und der PKC-3 ist Grundlage für alle folgenden Asymmetrien, wie der Segregation der P-Granula und der asymmetrischen Positionierung der ersten mitotischen Spindel. Die spezifische Verteilung dieser Proteine unterteilt die Eizelle in verschiedene Domänen und stellt die Positionskordinaten für die Verteilung zytoplasmatischer Faktoren für die folgenden Zellteilungen. Am Beispiel des Einzelembryos von *C.elegans* kann man erkennen wie eine Zelle, die ursprünglich keine Polarität aufweist, über ein Signal, in diesem Falle vom eindringenden Spermium ausgehend, zelluläre Prozesse in Gang setzt, die in einer Zelle resultieren, die ausgeprägte Polarität aufweist. Mittlerweile konnten in einer Vielzahl von Organismen *par*-Gene identifiziert werden, die an vielen Aspekten in der Ausprägung von Zellpolarität beteiligt sind (Abb. 1-11).

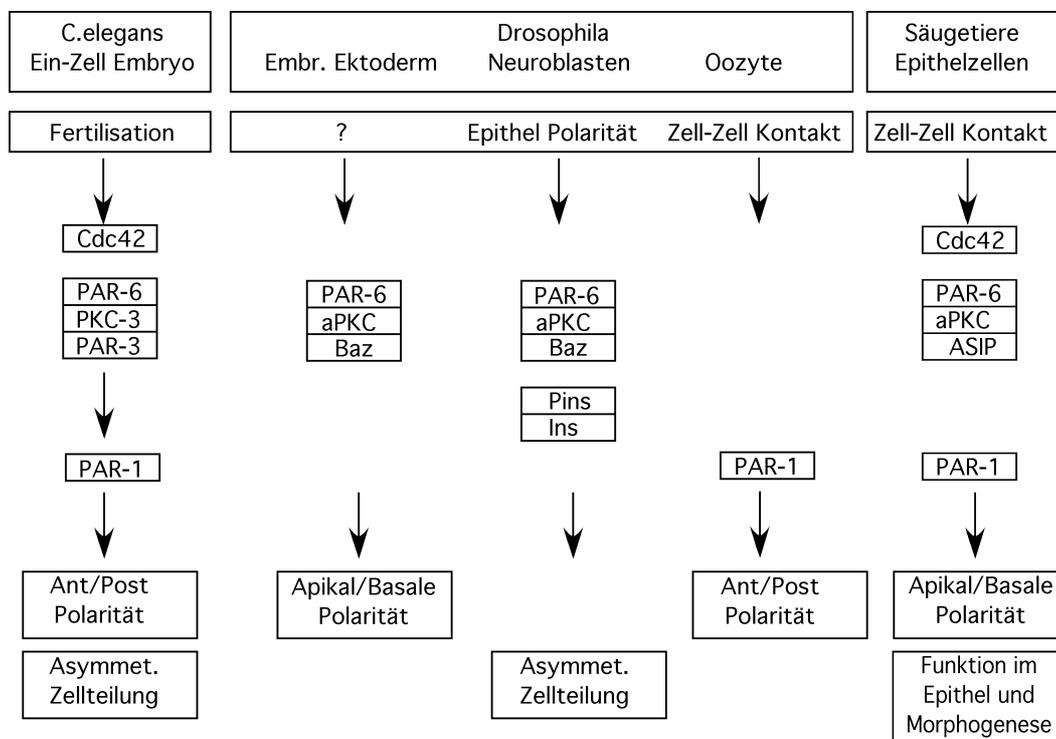


Abbildung 1-11: Der hochkonservierte PAR/aPKC Komplex. (nach Ohno, 2001)

Im Folgenden soll die Bedeutung dieser Proteine in der Etablierung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität in *Drosophila melanogaster* zum einen in Epithelzellen und zum anderen während der asymmetrischen Teilung von Neuroblasten vorgestellt werden.

1.6 Polarität in Epithelzellen

Bei Epithelien handelt sich um ein- oder mehrlagige Zellschichten, die alle inneren und äußeren Körperoberflächen der vielzelligen tierischen Organismen bedecken. Die Zellen liegen dicht beieinander und sind reich an Zellkontakten. Demzufolge besitzt das Gewebe nur kleine Interzellularräume mit entsprechend wenig Interzellulärsubstanz. Eine allen Epithelzellen gemeinsame Eigenschaft ist ihre Polarität: sie haben eine apikale Seite, die dem Äußeren (z.B. bei der Haut) oder dem Lumen (z.B. beim Darm oder Drüsen) zugewandt ist und eine basale Seite, die über eine Basallamina mit dem darunterliegenden Gewebe verbunden ist. Die Polarität von Epithelzellen ist durch strukturelle und funktionelle Unterschiede von apikaler und basolateraler Membran geprägt. Epithelien sind auf vielfältige Weise und je nach Organ spezifisch differenziert. Oberflächenepithelien haben vor allem Schutzfunktion (z.B. die Haut), können Stoffe aufnehmen (Absorption, z.B. Darmschleimhaut) und bilden eine Barriere, die das jeweilige Organ von der Umgebung abgrenzt (was vor allem durch spezielle Zellkontakte zwischen den Epithelzellen gewährleistet wird). Für die Zelle bedeutet dies, daß die Proteinkomposition der verschiedenen Membrandomänen unterschiedlich sein muß, und daß innerhalb der Zelle ein gerichteter Transport stattfinden muß. Ebenso muß verhindert werden, daß Komponenten des Lumens frei zwischen den Zellen diffundieren können. Dies wird über eine rigide Verbindung zwischen den einzelnen Zellen gewährleistet. Im Falle von Invertebraten ist dies die Adherens Junction (AJ) und die darunter liegende Septate Junction. Bei Vertebraten findet sich zusätzlich zur AJ die Tight Junction (TJ). AJs spielen eine zentrale Rolle in der Etablierung und Aufrechterhaltung eines Epithels (Nelson, 2003). Cadherine vermitteln die Zell-Zell Adhäsion über eine Interaktion deren extrazellulärer Domänen. Der zytoplasmatische Teil der Cadherine bindet an β -Catenin, welches über α -Catenin mit F-Aktin verbunden ist. Diese Komponenten bilden die Zonula Adherens, die jede Epithelzelle gürtelartig umschließt (Tepass et al., 2001). Die basal zur AJ gelegenen Septate Junction bildet eine semipermeable Barriere, die die Diffusion von Ionen und Molekülen zwischen den Epithelzellen verhindert. Der Komplex aus AJ und SJ bildet die Grenze zwischen der apikalen und der basolateralen Membrandomäne (Tepass et al., 2001). Die Struktur dieser Zell-Zell Verbindungen ist Grundvoraussetzung für die Aufrechterhaltung der Zellpolarität.

Drei Proteinkomplexe spielen bei der Organisation der apiko-basolateralen Polarität, in Verbindung mit der AJ, eine bedeutende Rolle: Der Bazooka (Baz), der Crumbs (Crb) und der Discs large (Dlg) Komplex. Der Baz Komplex besteht aus den Proteinen Bazooka (das PAR-3 Homolog von *C.elegans*), PAR-6, atypical Protein Kinase C (aPKC), und der GTPase Cdc42 (Kuchinke et al., 1998; Petronczki und Knoblich, 2001; Wodarz et al., 2000). Dieser Komplex lokalisiert direkt apikal der ZA im Kortex und formiert sich schon während der Zellularisierung (Harris und Peifer, 2004). Hier wird Baz unabhängig von der aPKC oder PAR-6 apikal angereichert. Diese Rekrutierung von Baz ist vom Aktinzytoskelett und dem Mikrotubulinetzwerk abhängig. Es ist wahrscheinlich, daß ein gerichteter Transport über einen Dyneinmotor entlang der Mikrotubuli stattfindet (Harris und Peifer, 2004). Sobald Bazooka seine apikale Position erreicht, wird es in einem apikalen Gerüst verankert und sorgt, wahrscheinlich selbst auch als Gerüstprotein, für die Positionierung der AJ. Anschließend akkumulieren auch aPKC und PAR-6 an der apikalen Membran (Harris und Peifer, 2005). Im Falle von PAR-6 geschieht das über die aktivierte GTPase Cdc42 (Hutterer et al., 2004). Der Crb Komplex bildet sich bei der Gastrulation und befindet sich apikal der ZA. Er besteht aus dem Transmembranprotein Crb, dem zytoplasmatischen PDZ-Protein Stardust (Sdt) und dem Pals1-associated TJ Protein (Patj) (Bachmann et al., 2001; Hong et al., 2001; Hutterer et al., 2004; Pielage et al., 2003; Tepass und Knust, 1993). Crumbs bindet Moesin und β -heavy-Spektrin und stellt so eine Verbindung zum apikalen Zytoskelett dar (Medina et al., 2002). Der Dlg-Komplex besteht aus den PDZ-Domänen Proteinen Dlg (Woods und Bryant, 1991), Scribble (Scrib) (Bilder und Perrimon, 2000) und dem Myosin TypII Bindeprotein Lethal giant larvae (Lgl) (Mechler et al., 1985). Er befindet sich entlang der basolateralen Membrandomäne, basal der ZA. Die Proteine dieses Komplexes sind notwendig, um die Proteine der ersten beiden Komplexe auf die apikale Lokalisation zu beschränken und spielen auch für die korrekte Positionierung der ZA eine Rolle (Bilder und Perrimon, 2000; Bilder et al., 2003; Tanentzapf und Tepass, 2003). Der Baz und der Crb Komplex kolokalisieren in der apikolateralen Region des Zytokortex und interagieren direkt über eine Bindung von PAR-6 und Patj. Auch die aPKC kann an Crb und Patj binden. Diese Bindung erhöht die Kinaseaktivität der aPKC, die crumbs phosphoryliert, und ist für die Aufrechterhaltung der apikalen Lokalisation des Crumbs Komplexes notwendig (Sotillos et al., 2004). Ein weiteres Substrat der aPKC ist Lgl, eine Komponente des Dlg-Komplexes. Die aPKC dephosphoryliert Lgl und inaktiviert es dadurch. Inaktiviertes Lgl dissoziiert von der Membran und es ist wahrscheinlich, daß Lgl so von der apikalen Membrandomäne ausgeschlossen wird (Betschinger et al., 2003; Hutterer et al., 2004).

Zellpolarität in Epithelien ist eng verbunden mit den Zell-Zell Verbindungen, die die Plasmamembran in verschiedene Domänen unterteilt. Wie aber wird Polarität in Zellen ohne solche Verbindungen etabliert und aufrechterhalten? Dies soll am Beispiel von *Drosophila* Neuroblasten dargelegt werden.

1.7 Asymmetrische Teilung von Neuroblasten

Neuroblasten sind die Vorläuferzellen des zentralen Nervensystems. Sie delaminieren aus dem Epithel des ventralen Neuroektoderms und teilen sich wiederholt auf eine asymmetrische Art und Weise, wobei eine kleinere Gangliemutterzelle (GMZ) und ein größerer Neuroblast entstehen (Betschinger und Knoblich, 2004; Wodarz und Huttner, 2003). Zellschicksalsdeterminanten, wie Prospero und Numb, segregieren ausschließlich in die GMZ und initiieren dort die GMZ spezifische Genexpression (Hirata et al., 1995; Knoblich et al., 1995; Spana und Doe, 1995). Während der Delamination behalten die Zellen ihre apikal-basale Polarität, was man anhand der Verteilung verschiedener Proteine und mRNAs nachweisen kann (Abb. 1-12)(Betschinger und Knoblich, 2004; Wodarz und Huttner, 2003).

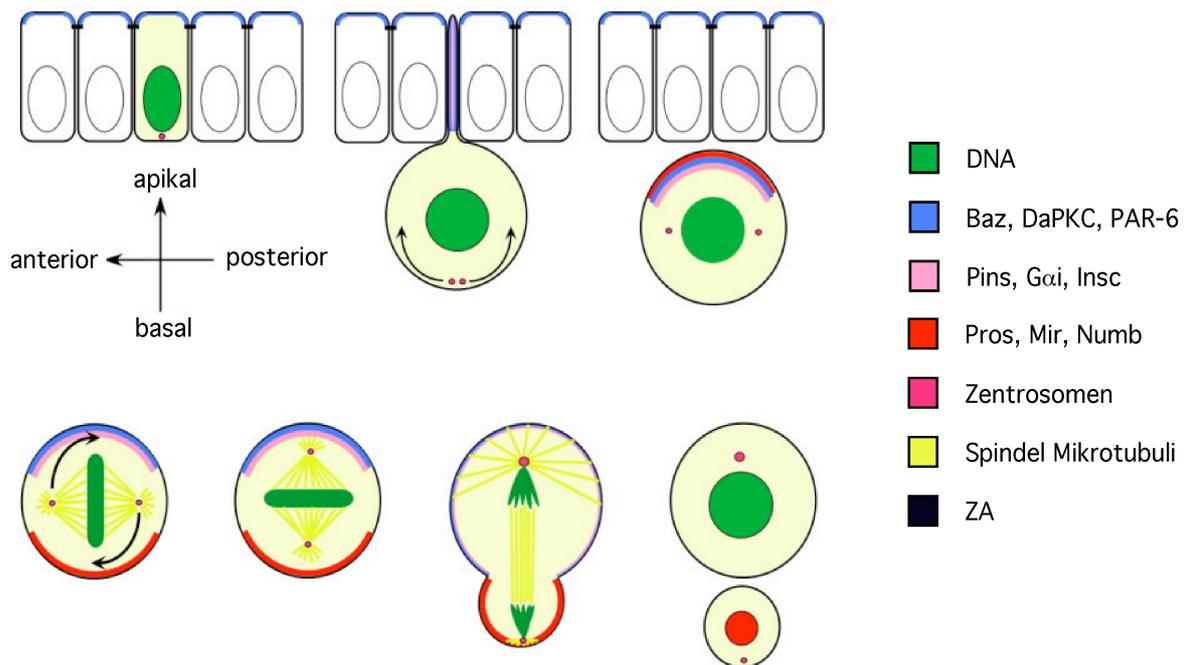


Abbildung 1-12: Ein Neuroblast delaminiert aus dem Neuroektoderm und teilt sich (Wodarz und Huttner, 2003). Die subzelluläre Verteilung einiger Polaritätsgene, Zellschicksalsdeterminanten und deren Adapterproteine ist gezeigt. Im Epithel und im delaminierenden Neuroblasten ist aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit nur der PAR/aPKC Komplex gekennzeichnet.

Die Polarität der Zelle wird über Proteine aufrechterhalten, die selbst polar im Kortex der Neuroblasten angeordnet sind (Ohno, 2001; Wodarz, 2002). Zu Beginn der Delamination wird Inscuteable (Insc) exprimiert. Insc bindet über Baz an den apikal lokalisierten PAR/aPKC Komplex (Ohno, 2001). Der PAR/aPKC Komplex interagiert mit dem Dlg/Lgl Komplex und dem Pins/Goi Komplex. Über das Zusammenspiel dieser 3 Komplexe werden die Polarität des Neuroblasten und die asymmetrische Teilung reguliert. Die Zellschicksalsdeterminanten, wie zum Beispiel der Transkriptionsfaktor Prospero, das Notch regulierende Protein Numb und deren Bindepartner Miranda und Partner of Numb lokalisieren in der Metaphase einer Neuroblastenteilung am basalen Kortex. In der Zytokinese werden sie ausschließlich in die GMZ segregiert (Abb. 1-12). Die basale Lokalisation der Zellschicksalsdeterminanten ist vom apikalen PAR/aPKC Komplex und dem ubiquitär entlang des Kortex lokalisierten Dlg/Lgl Komplex abhängig (Ohno, 2001; Wodarz, 2002). Lgl wird von der aPKC phosphoryliert und somit inaktiviert. Dies resultiert in einer Konformationsänderung von Lgl und das Protein kann nicht mehr mit dem Zytoskelett assoziieren. Es wird von der apikalen Seite des Neuroblasten ausgeschlossen. So kann Lgl die kortikale Lokalisation der Zellschicksalsdeterminanten nur am basalen Kortex fördern (Betschinger et al., 2005; Betschinger et al., 2003). Der PAR/aPKC Komplex antagonisiert die Funktion des Dlg/Lgl Komplexes also nicht nur in Epithelien (Bilder et al., 2003; Hutterer et al., 2004; Tanentzapf und Tepass, 2003), sondern auch in Neuroblasten (Rolls et al., 2003). Eine weitere Bedeutung von Lgl könnte in der Zielführung von exozytotischen Vesikeln liegen, die Proteine und Lipide mit sich führen, die für die Lokalisation der Zellschicksalsdeterminanten Voraussetzung sind. In der Hefe interagiert ein Lgl-Homolog mit dem t-SNARE sec-9 an der Plasmamembran (Lehman et al., 1999). In der Maus interagiert ein Lgl Homolog mit dem t-SNARE Syntaxin-4 an der basolateralen Membran (Musch et al., 2002). Über eine solche Bindung von Lgl an SNARE Proteine könnte erreicht werden, daß Proteine von bestimmten Domänen ausgeschlossen werden, indem die Vesikel nicht an die Membran docken können (Lehman et al., 1999; Musch et al., 2002).

Ein intaktes Aktinzytoskelett ist für die Verteilung der Zellschicksalsdeterminanten essentiell (Ohno, 2001; Wodarz, 2002). Über Lgl könnte eine Verbindung zum Aktinzytoskelett gegeben sein, da es einen Komplex mit non-muscle Myosin II bildet (Strand et al., 1994). Myosin II wird für die basale Lokalisation der Zellschicksalsdeterminanten benötigt, aber kolokalisiert zu keinem Zeitpunkt der Mitose mit ihnen. Während der Pro- und Metaphase ist Myosin II verstärkt apikal lokalisiert. Während der Zytokinese lokalisiert

Myosin II an der Teilungsfurche. Myosin II verhindert die Bindung von Mir an Aktin, was zu einem Ausschluß von Mir und Pros aus den Regionen, in denen Myosin II vorhanden ist, führen könnte (Barros et al., 2003). Die asymmetrische Verteilung von Mir hängt auch von dem Motorprotein Myosin VI ab. Myosin VI bindet direkt an Mir und zeigt eine partielle Kolo-kalisation mit Mir in zytoplasmatischen Partikeln. Es ist durchaus möglich, daß Miranda über die Interaktion mit Myosin VI entlang der Aktinfilamente transportiert wird (Petritsch et al., 2003).

Polarität in Neuroblasten zeigt sich nicht nur anhand der polaren Verteilung verschiedener Proteine und mRNAs, sondern auch anhand einiger zellulärer Prozesse, die während der Teilung eines Neuroblasten stattfinden. Nachdem der Neuroblast delaminiert ist, rotiert seine Spindel um 90°. So wird die richtige Lokalisation der Zellen nach der Zytokinese und die korrekte Verteilung der Zellschicksalsdeterminanten gewährleistet. Ein weiteres Phänomen der Neuroblastenteilung ist, daß zwei unterschiedlich große Zellen entstehen. Die Kontrolle dieser Prozesse wird über den PAR/aPKC Komplex und die heterotrimerischen G-Proteine erreicht, die einen Einfluß auf die Spindelgeometrie haben. *Insc*, *Pins* und *G α i* bilden einen Komplex (Schaefer et al., 2000), der sich im apikalen Kortex des Neuroblasten anlagert und mit dem PAR/aPKC Komplex über eine direkte Interaktion von Baz an *Insc* verbunden ist (Schaefer et al., 2000; Schober et al., 1999; Wodarz et al., 1999). Der *Pins/G α i* und der PAR/aPKC Komplex sind jedoch voneinander unabhängig, was deren apikale Lokalisation betrifft (Cai et al., 2003; Izumi et al., 2004). Ist eines der drei Gene des *Pins/G α i* Komplexes mutant, kommt es zu keiner Rotation der mitotischen Spindel. Die Zellschicksalsdeterminanten sind in *Pins* und *G α i* Mutanten korrekt lokalisiert, was in *Insc* Mutanten nicht der Fall ist (Cai et al., 2003; Kraut und Campos-Ortega, 1996; Schaefer et al., 2000; Yu et al., 2003; Yu et al., 2000). Mutationen in nur einem Gen des *Pins/G α i* oder des PAR/aPKC Komplexes resultieren in unterschiedlich großen Tochterzellen. In einer Doppelmutante, die aus einer Kombination von Mutanten in entweder *Pins* oder *G α i* und einer Komponente des PAR/aPKC Komplexes oder *Insc* besteht, sind die Tochterzellen gleichgroß (Cai et al., 2003; Fuse et al., 2003; Izumi et al., 2004; Yu et al., 2003; Yu et al., 2000). Dies bedeutet, daß auch die asymmetrischen Größenverhältnisse der entstehenden Zellen auf einem apikalen Signal beruhen, das entweder vom PAR/aPKC Komplex und *Insc* oder vom *Pins/G α i* Komplex stammt. Der PAR/aPKC Komplex und der *Pins/G α i* Komplex zeigen also in diesem Zusammenhang eine gewisse Redundanz.

An den ausgeführten Entwicklungsprozessen wird deutlich, welche Bedeutung Zellpolarität für Zellen oder Zellverbände hat, und daß deren Etablierung und Aufrechterhaltung für eine Vielzahl von zellulären Prozessen unabdinglich ist. Reguliert werden diese Prozesse über einige hochkonservierte Proteinkomplexe.

1.8 Themenstellung

Viele Gene, deren Produkte an der Etablierung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität und Integrität beteiligt sind, konnten im Laufe der vergangenen Jahre identifiziert werden. Jedoch ist das exakte räumliche und zeitliche Zusammenspiel dieser Komponenten bislang nur teilweise verstanden, da bislang nicht alle möglichen Interaktionspartner identifiziert werden konnten. Für das Verständnis des gesamten Prozesses der Zellpolarität sind diese Informationen essentiell. Vor dieser Arbeit wurde ein Hefe-Zwei-Hybrid Screen durchgeführt, in dem verschiedene potentielle Interaktionspartner des Proteins Bazooka identifiziert werden konnten. Im Rahmen dieser Arbeit sollten nun diese potentiellen Interaktionspartner molekular und genetisch analysiert und phänotypisch durch immunohistochemische Untersuchungen charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Geräte

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

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

Sämtliche Lösungen für molekularbiologische Arbeiten wurden mit Demineralisierten Wasser angesetzt und autoklaviert oder, falls dies nicht möglich war, sterilfiltriert.

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

Kitsysteme:

- Nucleobond AX, *Macherey-Nagel*, Düren
- Nucleospin Extract Kit, *Macherey-Nagel*, Düren
- GeneRacer Kit, *Invitrogen*, Groningen, Niederlande
- DIG RNA Labeling Mix, *Boehringer/Roche Diagnostics*, Mannheim

Photoarbeiten und Bildverarbeitung:

Röntgenfilm:	Fuji SuperRX, <i>Fuji</i> , Tokyo, Japan
Röntgenfilm-Entwickler:	Tetenal Roentogen, <i>Tetenal</i> , Norderstedt
Röntgenfilm-Fixierer:	Tetenal Roentogen Superfix, <i>Tetenal</i> , Norderstedt
Photolichtmikroskop:	Zeiss Axiophot 2, <i>Zeiss</i> , Oberkochen Zeiss Axioplan 2, <i>Zeiss</i> , Oberkochen
Konfokales Mikroskop:	Leica TCS NT, <i>Leica</i> , Heidelberg
Computersystem:	Macintosh PowerPC, <i>Apple</i> , Ismaning
Bildverarbeitung:	Adobe Photoshop 7, <i>Adobe Systems</i> , San Jose, USA Canvas 8, <i>Deneba Systems</i> , Miami, USA Volocity, <i>Improvision</i> , Lexington, USA OpenLab, <i>Improvision</i> , Lexington, USA

Sonstige Geräte:

Transformation elektrokompenter Zellen:	Gene Pulser II, BioRad
OD-Messungen:	BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg
Zentrifugen:	Biofuge fresco, Heraeus Instruments, Osterode Biofuge pico, Heraeus Instruments, Osterode Beckmann J2-21
Thermocycler:	MiniCycler, Biozym Diagnostics, Oldendorf
UV-Crosslinker:	UV Stratalinker 2400, Stratagene

2.2 Molekularbiologische Methoden

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

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des Nucleospin Extract Kit, *Macherey-Nagel*, Düren nach Angaben des Herstellers. DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma *SEQLAB*, Göttingen, durchgeführt.

2.2.1 Transformation elektrokompenter Bakterien

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

- Ligation 1:5 bis 1:10, isolierte DNA 1:50 bis 1:100 in H₂O verdünnen
- auf Eis 1 μ l der DNA-Lösung zu 50 μ l kompetenten Zellen geben, mischen und in vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettieren
- Elektroporation durchführen, die Bakteriensuspension mit 450 μ l LB auffüllen und in ein Eppendorf-Gefäss überführen
- 1h bei 37°C inkubieren
- eine geeignete Menge auf eine LB_{amp}-Agarplatte (100 μ g/ml Ampicillin) ausstreichen und ü.N. bei 37°C inkubieren

Lösungen:

- LB: 1% Bactotrypton
0.5% Bactoyeast
1% NaCl
- LB-Agar: 6.3g Agar/300ml LB
- Ampicillin: 100mg/ml Stammlösung in H₂O

2.2.2 Isolierung von DNA**2.2.2.1 Präparation von Plasmid DNA**

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

- 1ml einer ü/N-Kultur für 2 min bei 13000 rpm abzentrifugieren
- Pellet in 150 µl P1 resuspendieren
- 150 µl P2 zusetzen, invertieren
- 5 min bei RT inkubieren
- 150 µl P3 zusetzen, invertieren
- 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren, Überstand in frisches Eppendorf-Gefäß überführen und mit 300 µl Isopropanol fällen
- 30 min bei 13000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet mit kaltem 70% Ethanol waschen und 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Pellet lufttrocknen und in 20 µl dH₂O aufnehmen

Lösungen:

- P1: 50mM Tris-HCl pH 8.0
10mM EDTA
100µg/ml RnaseA
gelagert bei 4°C
- P2: 200mM NaOH
1% SDS
- P3: 3.0M Kaliumacetat pH 5.5

Für Klonierungen, Sequenzierungen, *in vitro*-Transkriptionen und die Transformation von Fliegen wird DNA in größeren Mengen und von höherer Reinheit benötigt ('Midi-Präp'). Zu diesem Zweck wurde gemäß den Angaben des Herstellers das Plasmid Midi Kit der Firma Macherey-Nagel, Düren (Nucleobond AX), eingesetzt.

2.2.2.2 Präparation von genomischer DNA aus Fliegen

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

- 30 Fliegen in Eppendorf-Gefäß sammeln und in flüssigem Stickstoff schockgefrieren
- 200 μ l Puffer A hinzugeben und Fliegen mit Bio-Vortexer (*Biospec Products*, Bartlesville, USA) homogenisieren, weitere 200 μ l dazugeben und weiter homogenisieren
- für 30 min bei 65°C inkubieren
- Zugabe von 800 μ l einer LiCl/KAc-Lsg zur Fällung der Proteine, anschließend mindestens für 10 min auf Eis inkubieren
- Zentrifugation für 15 min bei RT und 13000 rpm
- 1 ml des Überstandes in ein neues Eppendorf-Gefäß übertragen und DNA durch Zugabe von 600 μ l Isopropanol und anschließender Zentrifugation für 15 min bei RT und 13000 rpm fällen
- Pellet mit 70% EtOH waschen, trocknen und in 150 μ l TE aufnehmen

Lösungen:

- Puffer A :
 - 100 mM Tris-HCl, pH 7.5
 - 100 mM EDTA
 - 100 mM NaCl
 - 0,5% SDS
- LiCl/KAc-Lsg.:
 - 1 Teil 5 M KAc; 2,5 Teile 6 M LiCl
- TE:
 - 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
 - 1 mM EDTA, pH 8.0

2.2.2.3 DNA-Extraktion aus Embryonen mittels Chelex

Chelex (Sigma) ist ein chelatierendes Harz, das eine hohe Affinität für polyvalente Metallionen besitzt. Es ist sowohl in der Lage, die Degradation von DNA durch Metallionen während des Erhitzens von biologischen Proben zu verhindern als auch Kationen aus der Probe zu entfernen, die wichtig für die Renaturierung von Enzymen sind, die eine spätere Manipulation der Probe beeinflussen könnten. Chelex liegt in Form von kleinen Kügelchen vor, die nicht wasserlöslich sind. Es wird in einer 5%igen Gewicht/Volumen-Mischung in sterilem Wasser angesetzt (Walsh et al., 1991).

- 5 Embryonen in ein Eppendorf-Gefäß mit dH₂O überführen
- Überstand möglichst vollständig abziehen

- Embryonen in flüssigem Stickstoff schockgefrieren
- Mörser herstellen: dazu eine 1 ml Plastikspitze über einer Flamme erhitzen und die geschmolzene Spitze in ein Eppendorf-Gefäß drücken
- Probe aus dem Stickstoff holen und noch im gefrorenen Zustand mit dem Mörser zerkleinern; für jede Probe einen neuen Mörser benutzen
- 50 μ l Chelex dazugeben und abermals mörsern
- für 10 min in kochendes Wasser stellen
- auf Raumtemperatur abkühlen lassen und anschließend kurz zentrifugieren

Für eine PCR-Reaktion werden 1-10 μ l des Überstandes eingesetzt.

2.2.2.4 DNA-Extraktion aus einzelnen Fliegen

- betäubte Fliege in ein Eppendorf-Gefäß überführen
- Fliege in flüssigem Stickstoff schockgefrieren
- Fliege in eine Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen) geben, 50 μ l SB-Lösung hinzufügen und für 10 sec mörsern
- Vertiefung mit Tesafilm abdichten und für 15 min auf RT inkubieren
- Platte für 5 min zwischen zwei 100°C warme Heizblöcke stellen (Inaktivierung der Proteinase K)
- den unteren Heizblock entfernen und die Platte zusammen mit dem oberen Heizblock auf RT abkühlen lassen

Für eine PCR-Reaktion werden 5 μ l des Überstandes eingesetzt.

Lösungen:

- SB: 10mM Tris-HCl, pH 8.2
1 mM EDTA
25 mM NaCl
200 μ g/ml Proteinase K

2.2.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion erlaubt die gezielte Amplifikation ausgewählter DNA-Sequenzen. Zwei auf den entgegengesetzten DNA-Strängen lokalisierte Oligonukleotide (Primer) dienen dabei als Startstelle für eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase. Durch sich wiederholende Zyklen aus Aufschmelzen der DNA, Bindung der Primer und Strangsynthese wird das zwischen den Primern liegende DNA-Segment exponentiell vervielfältigt. Die Aufreinigung aller PCR-Produkte erfolgte mit dem NucleoSpin Extract Kit, *Macherey-Nagel*, Düren.

Bei der Wahl des Primers sollte auf einige Eigenschaften geachtet werden:

- Die Länge sollte zwischen 18 und 30 Nukleotiden liegen.
- Der GC Gehalt sollte zwischen 40% und 60% liegen.
- Die Annealingtemperaturen sollten möglichst gleich sein.
- Die letzten 2 oder 3 Basen am 3'-Ende eines Primers sollten sich nicht komplementieren.
- 3 aufeinanderfolgende Gs oder Cs sollten am 3'-Ende vermieden werden.
- Kein T am 3'-Ende.
- Primer sollten sich untereinander nicht komplementieren.

Ein Standard PCR Programm lautet:

Schritt 1:	Denaturierung	96°C	2 min
Schritt 2:	Denaturierung	96°C	30 sec
Schritt 3:	Annealing	50°C-68°C	60 sec
Schritt 4:	Extension	72°C	1 min pro Kb
Schritt 5:	Gehe 10x zu Schritt 2		
Schritt 6:	Denaturierung	96°C	30 sec
Schritt 7:	Annealing	55°C-68°C	60 sec
Schritt 8:	Extension	72°C	1 min 30 sec pro Kb
Schritt 9:	Gehe 25x zu Schritt 6		
Schritt 10:	Extension	72°C	5 min
Schritt 11:		4°C	Unendlich
Schritt 12:	End		

Standard PCR Ansatz:

- 100 ng Template DNA
- 2 μ l Nukleotide (10 mM pro Nukleotid)
- je 0.5 μ l Primer
- 5 μ l 10X Buffer
- 4 μ l 25 mM MgCl₂
- 1 μ l Taq-Polymerase
- X μ l H₂O
- Gesamtvolumen: 50 μ l

Folgende Primer wurden verwendet:

Name	Sequenz	Verwendung	Abb./Anmerkung
UP	ACC ACC TTA TGT TAT TTC ATC ATG	Charakterisierung der Revertanten	2-22: Primer UP
5SP-FK	CTC GGC AGA TTA CAT TTG GAG AG	Charakterisierung der Revertanten	2-22: Primer A 2-24: Primer 1
3'FKBPE _{exc}	CCG TAA GCG TAG TTT GGA GCA CAT	Charakterisierung der Revertanten, Generation einer DIG-Sonde für Southern-blot	2-22: Primer B 2-24: Primer 3 2-25: Sonde 2-27: Sonde
3SP-FK08A	GCG GCC CTC GAA ACT ACC AGA AAT	Charakterisierung der Revertanten	2-24: Primer 4
3SP-FK18B	CGC GGA GGT TCG GTC TA	Charakterisierung der Revertanten	2-24: Primer 5
FKE	TAG CGG CGG TGG TAA AGA AAC GAG	Charakterisierung der Revertanten	2-24: Primer 6
3SP-FK34	CGC GGG CCG AGG ATA AA	Charakterisierung der Revertanten	2-24: Primer 7
FKP1	CCG CCC GGT GCA GTA TGA AGG	Charakterisierung der Revertanten	2-24: A forward
FK1rev	AAT CAC CGC CGT AAG CCG ACC AC	Charakterisierung der Revertanten	2-24: A reverse
FORC	GCA AGT GGG CGT GAT GA	Charakterisierung der Revertanten	2-24: B forward
REVC	TGA GGG GGC AAT AAA CAG TA	Charakterisierung der Revertanten	2-24: B reverse
FKP3	ACC CGC TCT CCG CAA CAC ATT CAC	Charakterisierung der Revertanten	2-24: C forward
FK3rev	GGG ATA ATA CCG CGC CAC ATA GCA	Charakterisierung der Revertanten	2-24: C reverse
FK12141-F	CCG CCG GAT GCT ACT CTG AT	Charakterisierung der Revertanten	2-28: 1 forward
FK12407-R	CGC ATG AAT GTG ATA AAC CTA CCC	Charakterisierung der Revertanten	2-28: 1 reverse
FK14229-F	CGC AAT CGC CGC TCG TTT CTT TAC	Charakterisierung der Revertanten	2-28: 2 forward
FK14539-R	AGC TTG GCC TCG CAC TTC TCG	Charakterisierung der Revertanten	2-28: 2 reverse

FK15557-F	CGC CAG CCG GGT GTT TC	Charakterisierung der Revertanten	2-28: 3 forward
FK15859-R	GCT CTG CGC CGA CGA CTC AAT C	Charakterisierung der Revertanten	2-28: 3 reverse
5'FKBPExc	TTA TTC CTA TTA GCT TGT TCG TCA	Generation einer DIG-Sonde für Southern-blot	2-25: Sonde 2-27: Sonde
3'FlagExc	TTT AGG ATC CAG CTT TAA ATC TCT GTA GGT AGT	Exzision eines Inserts aus pUAST Vektor	BamHI
5'FlagExc	GGA AGA TAT CAA CAT GGA TTA CAA GGA TGA	Exzision eines Inserts aus pUAST Vektor	EcoRV
FKESTfor	CAG CCT CGA GTG CCG GAA GGG AAT AAA ATC	Amplifikation von FKBP cDNA aus EST Klon	XhoI
FKESTrev	TAA GTC TAG AGA CCA TTT CTT CAT TAC ATT ACT G	Amplifikation von FKBP cDNA aus EST Klon	XbaI

2.2.4 Hefe-Zwei-Hybrid System

Das hier verwendete Hefe-Zwei-Hybrid System beruht auf dem Matchmaker Zwei-Hybrid-System von CLONTECH Laboratories, Inc.

Das Ziel des Zwei-Hybrid-Systems ist es, eine Interaktion zweier Proteine aufzuspüren oder nachzuweisen. Dieses System bietet die Möglichkeit, einen Screen an einer cDNA-Bank durchzuführen, um neue Interaktionen zu finden und um gezielt Interaktionen bestimmter Proteine überprüfen.

Um einen Screen durchzuführen, fusioniert man das gewünschte Protein (den Köder) an die DNA-Binde-Domäne eines Transkriptionsfaktors (Gal4BD) dessen Aktivierungsdomäne fehlt. Desweiteren benötigt man eine Plasmid-Bank in der die „Beute“-Proteine an eine entsprechende Aktivierungs-Domäne (GAL4AD) fusioniert sind. In dem ursprünglichen Screen wurde eine Matchmaker cDNA-Bank benutzt, die aus 0-24 Std alten Embryonen hergestellt wurde. Diese beiden Vektoren werden nun in einen Hefestamm (Y190) kotransformiert. Der Hefestamm enthält zwei Reportergene (*lacZ* und *His*), welche nur transkribiert werden, wenn der Gal4BD/Gal4AD Komplex an die Promotorsequenz der Reportergens (GAL4-UAS) bindet. Der Gal4BD/AD Komplex wird nur gebildet, wenn die Köder und Beuteproteine interagieren.

Will man die Interaktion zweier bestimmter Proteine überprüfen, so kloniert man jeweils eines der Proteine (oder auch nur eine Domäne) in den Beutevektor und das andere in

den Ködervektor. Die verschiedenen Vektoren tragen Marker, mittels derer man auf bestimmte Transformationsereignisse selektionieren kann.

In dem hier durchgeführten Screen wurden folgende Hefestämme und Vektoren benutzt 8 (siehe auch Abb. 2-1):

Vektor/Hefestamm	Selektionsmarker	Insert
pGBT9 (Köder)	trp ⁺	Gal4BD fusioniert mit verschiedenen Domänen des <i>Drosophila melanogaster</i> Bazooka proteins
pACT2 (Beute)	leu ⁺	Gal4AD fusioniert mit den zu testenden Konstrukten
Y190	trp ⁻ , leu ⁻ , his ⁻	UAS-β-GAL, UAS-His

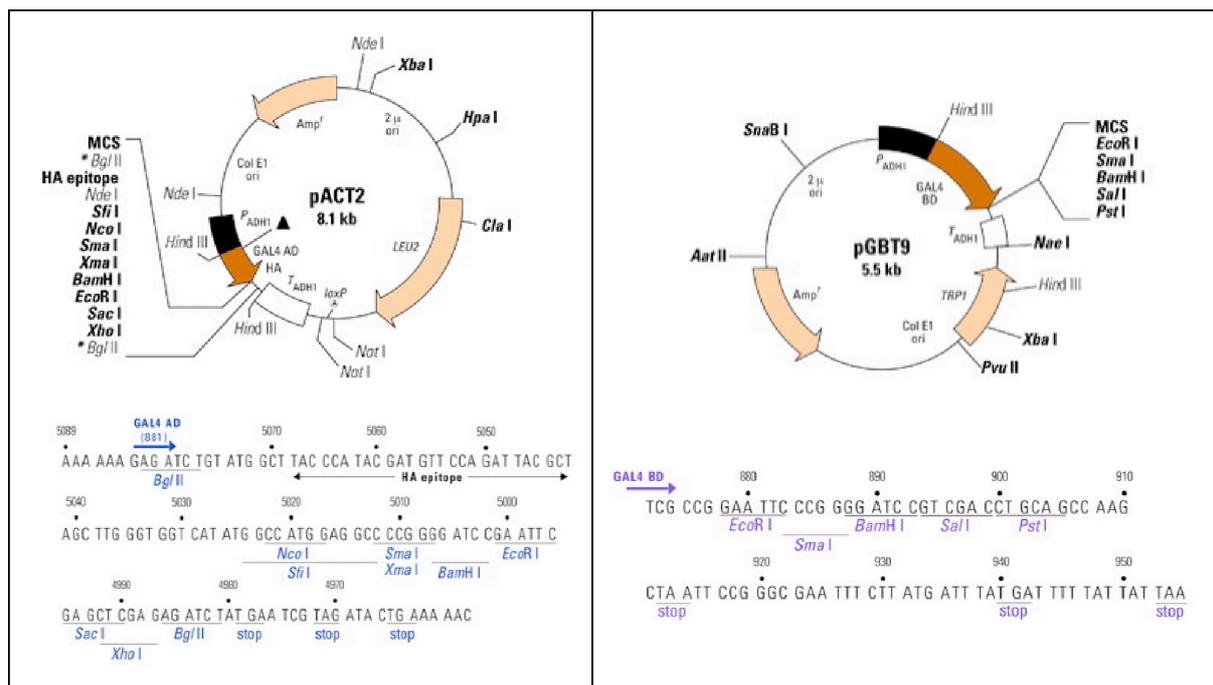


Abbildung 2-1: Die im Hefe-Zwei-Hybrid System verwendeten Vektoren und deren multiple cloning sites (von Clontech).

Transformiert man die Hefe mit diesen beiden Vektoren und plattiert sie dann auf trp⁻, leu⁻, his⁻-Platten aus, so wachsen nur solche Kolonien, in denen eine Kotransformation stattgefunden hat und in der Beute und Köder interagieren. Solche positiven Kolonien werden einem X-Gal-Test unterzogen. Kommt es zu einer Interaktion der beiden Proteine oder Proteindomänen, so wird das lacZ-Gen transkribiert.

Um dies zu testen, transferiert man die positiven Kolonien auf einen Nitrozellulose-Filter und untersucht sie auf β -Galctosidase-Aktivität. Zellen, die in Gegenwart von X-Gal wachsen und β -Galactosidase exprimieren, färben sich blau. Um diese Interaktion zu verifizieren, werden die Plasmide isoliert und in Bakterien transformiert. Die einzelnen Bakterienkolonien werden auf ihre Plasmid-DNA getestet. Solche, die den Beuteplasmid tragen, werden in einer ü/N-Kultur in LB_{amp} Medium amplifiziert.

Nun kann man die DNA aus den Bakterien isolieren (DNA Mini-Präp oder DNA Midi-Präp) und als abschließenden Test in die Hefe zusammen mit dem Ködervektor retransformieren. Färben sich die gewachsenen Kolonien unter Zugabe von X-Gal erneut blau, so ist die Interaktion bestätigt.

Als Kontrolle diente ein pGBT9 Vektor, der als Köderplasmid das menschliche LaminC enthielt. Wird ein gefundener Klon mit dieser Kontrolle kotransformiert, so sollte in einem X-Gal Test keine Blaufärbung sichtbar sein.

Folgende Konstrukte wurden getestet:

Konstrukt	Aminosäuren	Konstrukt	Aminosäuren
Bazoon C-terminus	724-1464	Bazooka PDZ 1-3	291-737
Bazooka N-terminus	1-318	Klon CG4420	2-417
Bazooka PDZ1	291-407	Klon FKBP59	167-439
Bazooka PDZ 2	401-548	PTEN 2a	316-511
Bazooka PDZ 3	603-737	PTEN 2b	297-511
Bazooka PDZ 1-2	291-548	PTEN 2 Δ TYL	297-508
Bazooka PDZ 2-3	401-737	PTEN 3	297-509

2.2.4.1 Hefetransformation

Es werden entweder 20 ml oder 100 ml Kulturen angeimpft. Die Angaben in [Klammern] beziehen sich auf die 100 ml Kulturen des Screens.

Die Hefekulturen wachsen über Nacht. Am nächsten Morgen wird die Kultur auf eine OD von 0.2 verdünnt. Nach circa 3 Stunden (OD_{600} sollte zwischen 0.6 und 0.9 liegen) wird die Kultur in ein JA-20 Röhrchen überführt [4 x 25 ml].

- \cup 5000 rpm, 5 min, RT, anschließend Überstand vorsichtig abgießen.
- In 10 ml ddH₂O resuspendieren.
- \cup 6000 rpm, 5 min, RT, anschließend Überstand vorsichtig abgießen.
- In 10 ml 0.1M LiAc resuspendieren.
- \cup 6000 rpm, 5 min, RT, anschließend Überstand vorsichtig abgießen.
- In 300 μ l 0.1M LiAc resuspendieren (Wegen des Restvolumens nur circa 280 μ l zugeben) und in ein 1.5 ml Eppendorf-Gefäß überführen [4 x 375 μ l, wegen des RV nur circa 350 μ l zugeben].
- Inkubieren: 15-20 min, 30°C. Währenddessen:
- 6 [10] Eppendorf-Gefäße mit 300 μ l [900 μ l] PTL-Lösung füllen.
- 2 μ l [6 μ l] denaturierte Hering Sperma DNA zugeben.
- je 2 μ l [6 μ l] Köder- und Beuteplasmid zugeben.
- je 50 μ l [150 μ l] der Kompetenten Zellen in die oben vorbereiteten Eppendorf-Gefäße geben.
- Vortexen: Höchste Stufe, 4 sec.
- Inkubieren: 30 min, 30°C.
- Hitzeschock: 20 min, 42°C.
- \cup kurz auf 7000 rpm, RT, anschließend Überstand vorsichtig abnehmen.
- 1 ml YPDA zugeben.
- Vortexen: Höchste Stufe, bis homogene Lösung entsteht.
- Inkubieren: 1 std, 30°C.
- \cup kurz auf 7000 rpm, RT, anschließend Überstand vorsichtig aber komplett entfernen.
- Selektives Medium zugeben, Zellen resuspendieren und ausplattieren:
- Für große Platten: 400 μ l [1200 μ l, 3 x 400 μ l ausplattieren].
- Für kleine Platten: 100 μ l [300 μ l, 3 x 100 μ l ausplattieren].
- Platten für circa 5 Tage in 30°C-Schrank stellen.
- Positive Kolonien wachsen wie normale Hefe-Zellen und sind leicht identifizierbar.

Lösungen:

- 10 X Drop-out Lösung (Trp-, Leu-, His-):
 - L-Isoleucin 300mg/L
 - L-Valin 1500mg/L
 - L-Adenin hemisulfat Salz 300mg/L
 - L-Arginin HCl 200mg/L
 - L-Lysin HCl 300mg/L
 - L-Methionin 200mg/L
 - L-Phenylalanin 500mg/L
 - L-Threonin 2000mg/L
 - L-Tyrosin 300mg/L
 - L-Uracil 200mg/L
 - Weggelassen werden L-Histidin HCl Monohydrat (200mg/L), L-Leucin (1000mg/L), und L-Tryptophan (200mg/L)
 - Die Lösung wird autoklaviert und bei 4°C bis zu einem Jahr gelagert.

- SD-Synthetisches Medium für Hefe-Transformationen
 - 6.7g/L Yeast Nitrogen Base
 - Je nach gewünschter Selektion fehlende Aminosäuren zugeben (in einfacher Konzentration).
 - 850ml H₂O (für His⁻ Medium/Platten nur 800ml)
 - Nur für Agar-Platten: 17g Agar zugeben
 - pH auf 5.6 einstellen (mit NaOH)
 - Autoklavieren
 - Lösung auf mindestens 65°C abkühlen lassen.
 - 100ml Drop-out Lösung zugeben
 - 50ml 40% Glucose (autoklaviert) zugeben.
 - Nur bei His⁻ Medium/Platten 50ml 3-Amino-Triazol (3-AT, sterilfiltriert) zugeben.
 - Eventuell Platten gießen, 3 Tage unter Abzug stehen lassen, und anschließend im Kühlraum lagern (4°C).

- PTL-Lösung (immer frisch ansetzen):
 - 4ml PEG 3350
 - 500µl 1M LiAc
 - 500µl H₂O
 - Gut vermischen

2.2.4.2 X-Gal Test

Mittels des X-Gal-Tests läßt sich eine β -Galactosidase-Aktivität nachweisen. Dies ist ein Zeichen dafür, daß das *lacZ*-Gen, welches in diesem Falle als Reporter-Gen genutzt wird, transkribiert wird.

- Positive Kolonien werden auf *trp⁻, leu⁻*-Platten transferiert und 2 Tage lang bei 30°C inkubiert, bis die Kolonien einen Durchmesser von circa 2 mm erreichen.
- Mittels einer Nitrozellulosemembran wird ein Abdruck der Kolonie/Kolonien erzeugt.
- Die Nitrozellulosemembran mit den daran heftenden Hefekolonien für circa 20 sec in flüssigen Stickstoff tauchen.
- Die Nitrozellulosemembran auf ein mit X-Gal-Färbelösung eingeweichtes Stück Whatman-Papier geben (Hefekolonien nach oben). Dies geschieht am

besten in einer Petri-Schale.

- Inkubieren: 30°C.
- Positive Kolonien färben sich nach 2-30 std blau.

Lösungen:

- | | | | |
|--|---|---|------|
| - Z-Puffer: | 16.1g/l Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O | = | 60mM |
| | 5.5g/l NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O | = | 40mM |
| | 0.75g/l KCl | = | 10mM |
| | 0.246g/l MgSO ₄ ·7H ₂ O | = | 1mM |
| | pH 7.0 | | |
| - X-Gal: | 20mg/ml X-Gal in DMF | | |
| - X-Gal Färbelösung (immer frisch ansetzen): | 2ml Z-Puffer | | |
| | 27µl β-Mercaptoethanol | | |
| | 167µl X-Gal | | |

2.2.4.3 Plasmid Isolation

Die Plasmid-DNA wurde mit dem Y-DER Yeast Plasmid Isolation Kit der Firma Pierce, II, USA, isoliert. Eine typische Plasmidisolierung läuft folgendermaßen ab:

- Eine 10 ml Übernachtskultur in Leu⁻-Medium mit einer positiven Kolonie animpfen.
- Am nächsten Morgen: ∪ 5000 rpm, 5 min, RT (in JA-20 Röhrchen), Überstand vorsichtig abgießen.
- Zellen in 1 ml ddH₂O resuspendieren und in ein 1.5 ml Eppendorf-Gefäß überführen.
- ∪ 8000 rpm, 5 min, RT, Überstand vorsichtig abgießen.
- Zellen in Y-DER Reagenz resuspendieren (8 µl Reagent/1mg Pellet)
- Durch Pipettieren mischen, bis eine homogene Lösung entsteht (Luftbläschen vermeiden, anschließend inkubieren: 65°C, 10 min.
- ∪ 13000 rpm, 5 min, RT, Überstand vorsichtig abgießen.
- 400 µl DNA Releasing Agent A zugeben.
- 400 µl DNA Releasing Agent B zugeben.
- Durch Pipettieren mischen bis eine homogene Lösung entsteht (Luftbläschen vermeiden), anschließend inkubieren: 65°C, 10 min.
- 200 µl Protein Removal Reagent zugeben und Eppendorf-Gefäß mehrmals invertieren.
- ∪ 13000 rpm, 5 min, RT.
- Überstand in neues Eppendorf-Gefäß überführen.

- 600 μ l Isopropanol zugeben und Gefäß mehrmals invertieren.
- Genomische DNA präzipitieren: \cup 13000 rpm, 10 min. Überstand vorsichtig abnehmen, Pellet nur schwer oder gar nicht erkennbar.
- Waschen: 1.5 ml 70% Ethanol zugeben, Gefäß mehrmals invertieren.
- \cup 13000 rpm, 1 min, Überstand vorsichtig abnehmen.
- Pellet lufttrocknen und anschließend in 30-50 μ l ddH₂O (oder TE) resuspendieren.
- Mit der so gewonnenen Plasmid DNA Bakterien transformieren.

2.2.5 Southern Blot

Southern blotting beschreibt den Transfer von elektrophoretisch aufgetrennter DNA auf eine Membran, gefolgt von einer Hybridisierung mit markierten Sonden zum Nachweis spezifischer DNA-Fragmente. Dieser Versuch wurde durchgeführt um die P-Element Exzisionen genauer zu charakterisieren.

- Genomische DNA mit Restriktionsenzymen (hier entweder EcoRI oder BglII) auftrennen.
- 8%iges Agarosegel mit aufgetrennter DNA beladen und bei 80 V in TAE Puffer laufen lassen, bis die DNA über das gesamte Gel verteilt ist.
- Gel 20 min in 0.3 N HCl depurinisieren, kurz in H₂O abspülen.
- Gel 30 min in Denaturierungslösung inkubieren, kurz in H₂O abspülen.
- Apparatur aufbauen und ü/N in 10xSSC blotten (Abb. 2-2).
- Apparatur abbauen, Nylonmembran trocknen und DNA bei 80000 μ J am Stratalinker fixieren.

Lösungen:

- 20 X SSC: 3 M NaCl
0.3 M Natriumcitrat, pH 7.4
- Denaturierungslösung: 0.5 M NaOH
1.5 M NaCl
- Neutralisierungslösung: 0.5 M Tris-Cl pH8.0
1.5 M NaCl

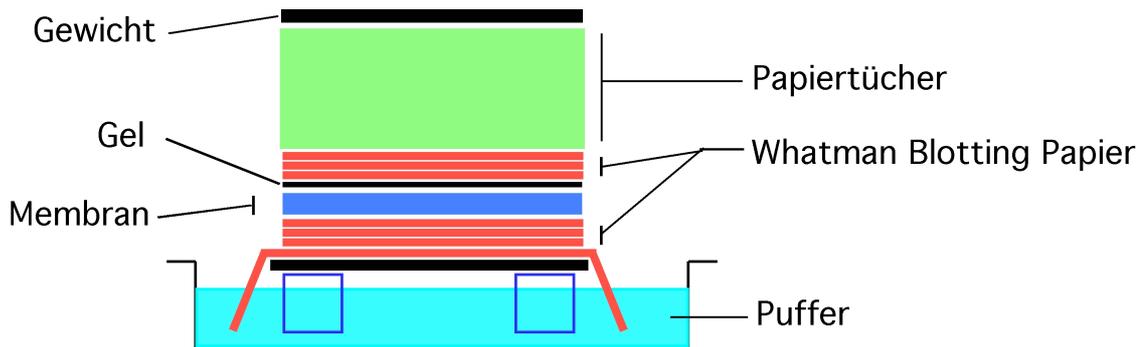


Abbildung 2-2: Der Aufbau eines Southernblots.

Die genomische DNA der Revertanten wurde entweder mit EcoRI oder BglIII verdaut und die DNA wurde mit einer Digoxigenin markierten Sonde detektiert.

2.2.6 SDS-PAGE-Gelelektrophorese und Western-blot

Für SDS-PAGE-Gelelektrophorese und Western-blotting wurde ein kombiniertes Gelelektrophorese-/Nassblotgerät der Firma *Biorad*, München ('Mini Trans-blot'), gemäß den Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Proteine wurden in 10%igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt, im Western-blot auf Nitrozellulosemembranen (*Schleicher und Schüll*, Dassel) übertragen und der Transfer durch eine Ponceau S-Färbung überprüft. Bei der Proteindetektion wurde weiterhin wie folgt vorgegangen:

- Nitrozellulosemembran für 1h in Blockierlösung inkubieren
- Inkubation mit dem entsprechend verdünnten ersten Antikörper in Blockierlösung (möglichst kleines Volumen, 3-5 ml) ü.N. bei 4°C auf dem Taumler
- 4 x 15 min in 1xTBST waschen
- Inkubation mit dem 1:5000-1:10000 verdünnten zweiten Antikörper (HRP-gekoppelt) in Blockierlösung für 2h bei RT auf dem Taumler
- 4 x 15 min in 1xTBST waschen
- Detektion mit dem Chemilumineszenz-Substrat (BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD), *Boehringer/Roche Diagnostics*, Mannheim) nach Herstellerangaben

Lösungen:

- Trenngel (10%):
 - 2.5ml 30% Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1)
 - 2.8ml 1M Tris pH 8.8
 - 38 μ l 20% SDS
 - 2.1ml H₂O
 - 30 μ l 10% APS
 - 8 μ l TEMED
- Sammelgel:
 - 310 μ l 30% Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1)
 - 235 μ l 1M Tris pH 6.8
 - 10 μ l 20% SDS
 - 1.3ml H₂O
 - 10 μ l 10% APS
 - 5 μ l TEMED
- 1xTBST:
 - 50mM Tris pH 7.5
 - 150mM NaCl
 - 0.1% Tween
- Blockierlg.:
 - 3% Milchpulver
 - 1% BSA in 1xTBST

2.2.7 Überprüfung der Bindung mit Ubiquitin

GST-Fusionsproteine wurden in E.coli Zellen exprimiert und anschließend in Lysispuffer resuspendiert. Die Lysis erfolgte über Sonifikation der Zellen. Die GST-Fusionsproteine wurden mit Glutathion-Sepharose 4B Perlen (*Amersham Pharmacia Biotech*) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Für das Ubiquitin-Binde Assay wurden 50 μ l Perlen mit gebundenem GST-Protein benutzt. Bindungsassays wurden in einem Volumen von 400 μ l durchgeführt (mit TBS auffüllen). Es wurde 1 μ l Tetraubiquitin (*Bio Trend, Köln*) zugegeben. Die Mischung wurde 2 std bei 4 °C in einem Überkopfschüttler inkubiert. Die Perlen wurden mit 6500 rpm abzentrifugiert und 3 mal mit TBS gewaschen. Die Perlen wurden anschließend in SDS-PAGE Puffer für 15 sec gekocht und es wurde eine Wester-blot Analyse durchgeführt. Als Antikörper diente der anti-Ubiquitin Antikörper (*Dako*), der 1:2000 verdünnt wurde. Detektion des Tetraubiquitins erfolgte mittels einer Chemiluminiszenzreaktion (ECL; *Amersham Pharmacia Biotech*).

Lösungen:

- Lysispuffer:
 - 50mM Tris-Hcl pH 7.5
 - 100mM NaCl
 - 10% Glycerol, 1% Triton
 - 1mM Dithiothreitol
 - Proteaseinhibitoren
 - 1mM PMSF
- TBS:
 - 20 mM Tris-HCl, pH 7.5
 - 0.5 M NaCl
 - 0.05% Tween 20

2.3 Zellkulturtechniken

2.3.1 Transfektion der *Drosophila* Schneiderzellen

Drosophila Schneiderzellen (S2-Zellen) sind Epithelzellen aus einer embryonalen *Drosophila melanogaster* Zelllinie (Schneider, 1972). Nach einer Transfektion mit einem oder mehreren Vektoren, die die gewünschten Gene enthalten, lassen sich diese in den S2-Zellen exprimieren. Man kann dann mittels Antikörperfärbungen deren Lokalisation in den Zellen nachweisen. Man kann auch Proteinextrakte herstellen und Western-blot Analysen durchführen. Schneiderzellen werden bei 25°C gehalten.

Folgendes Protokoll wurde zur Transfektion der S2-Zellen verwendet:

Tag 1:

- S2-Zellen in 6-Well Platten verteilen (1Well/Test)

Tag 2:

- 0.39 ml CaCl₂ in Eppendorfgefäß füllen
- 5 µg Aktin Gal4 DNA und 5 µg Proben DNA zugeben
- Vortexen
- 0.4 ml 2XHEBS in PP-Röhrchen geben
- Bei gleichzeitigen vorsichtigen Vortexen Inhalt des Eppis in PP-Röhrchen tropfenweise zugeben. Niederschlag sollte ausfallen
- Inhalt des PP-Röhrchens tropfenweise in ein Well geben
- Einige Stunden bei 25°C inkubieren
- Zelllösung in 15 ml Bluecap umfüllen. Dabei Zellen vorsichtig auf und ab pipettieren um sie vom Boden zu lösen
- ⤵ 1000 rpm, 5 min
- Kammern eines mit Polylysin beschichteten Chamberslides mit 500µl Medium füllen
- (Falls der Vektor einen methallothionein Promotor enthält, 5 µl CuSO₄ zugeben)
- Nach ⤵ Überstand vorsichtig absaugen und 2 ml frisches Medium auf die Zellen geben. Zellen resuspendieren und 2-3 Tropfen in die Kammern geben
- Chamberslide übernacht bei 25°C inkubieren.

Tag 3:

- Falls es sich um einen Hitzeschock Vektor handelt, Zellen 30 min bei 37°C inkubieren, anschließend 2 std bei 25°C inkubieren
- Medium vorsichtig absaugen, Zellen sollten am Boden festhaften
- Zellen 1 x mit PBS waschen
- 0.5 ml Fixierlösung in jede Kammer geben und 15 min inkubieren
- Fixierlösung absaugen, 500 µl PBT auf Zellen geben und 15 min inkubieren, anschließend PBT absaugen
- Primären Antikörper in PBT+5%NHS auf die Zellen geben (200 µl)
- In einer feuchten Kammer inkubieren. 2 std bei RT oder übernacht bei 4°C

Tag 4:

- Zellen mit PBT waschen
- Sekundären Antikörper in PBT+5%NHS für 1 std zugeben
- 3 x mit PBT waschen
- Kammern und Gummidichtung entfernen
- Auf jedes Feld, auch auf die, die nicht benutzt wurden, einen Tropfen Glycerin-Propylgalat geben und mit Deckglas abdecken

Lösungen:

- Kompletmedium: 10% FBS und 5.5 ml Penicillin/Streptavidin (100x) in 500ml Flasche mit Schneiderzellmedium geben
- Fixierlösung: PBS+4% Formaldehyd

2.3.2 Einfrieren der Schneiderzellen

Schneiderzellen können problemlos in flüssigem Stickstoff eingefroren werden und später wieder aufgetaut werden:

- Einfriermedium in 50 ml Bluecap ansetzen und sterilfiltrieren
- Zellen \cup 1000 rpm, 5 min und Überstand absaugen
- Zellen in 4 ml Einfriermedium resuspendieren und auf 4 Eppendorfgefäße, die zum Einfrieren in flüssigen Stickstoff geeignet sind, verteilen
- Eppendorfgefäße 1 Tag in Isopropanol auf -70°C einfrieren, dann in Stickstoff einfrieren

Lösungen:

- Einfriermedium: 10% FBS und 10% DMSO zu Komplettmedium geben

2.3.3 Herstellung von S2 Zellextrakten

Proteine können in S2 Zellen gezielt exprimiert werden und anschließend isoliert werden.

- S2-Zellen verdünnen und einige Tage wachsen lassen. Sie müssen sich in der Log-Phase befinden
- Im Falle eines Vektors mit einem methallothionein Promotor Expression mit CuSO_4 induzieren (ü/N, 1mM CuSO_4)
- Zellen \cup 5min, 1000 rpm, anschliessend Überstand absaugen
- Pellet in PBS waschen, \cup 5 min, 1000 rpm, Überstand absaugen
- Pellet in TNT resuspendieren, TNT muß eiskalt sein und Proteaseinhibitoren enthalten (1 ml TNT pro T-25 Flasche)
- 15 min auf Eis inkubieren
- \cup , 10 min, 4°C, 13.000 rpm
- Überstand in neues Eppendorfgefäß überführen

Für eine Western-blot Analyse 40-50 μg auf ein Gel auftragen

Lösungen:

- TNT: 50mM Tris-Cl, pH8.0
150mM NaCl
1% Triton X-100

2.4 Mikromanipulation von *Drosophila melanogaster***2.4.1 Keimbahntransformation**

Die Keimbahntransformation von *Drosophila melanogaster* stellt eine einfache Methode zur Erzeugung transgener Fliegenstämme dar. Für den Gentransfer werden dabei transponierbare Elemente, sogenannte P-Elemente, genutzt. Diese benötigen eine Transposase sowie als deren Erkennungssequenzen flankierende 'inverted repeats', um in ein Genom integrieren zu können. Für die Technik der Keimbahntransformation sind diese beiden Komponenten auf unterschiedlichen Plasmiden lokalisiert. Während in den P-Element-Transformationsvektoren die zu übertragende DNA zwischen den 'inverted repeats'

lokalisiert ist, stellt ein sogenanntes Helfer-Plasmid (pUChs $\pi\Delta$ 2-3) die Transposase zur Verfügung, die in trans für eine Integration des P-Elementes ins Fliegen-genom sorgt.

2.4.1.1 Herstellung der Injektionslösung und der Injektionskapillaren

Sowohl die DNA des P-Element-Transformationsvektors, als auch die des Helferplasmids wurden mit dem Nucleobond AX Midi Kit der Firma *Macherey-Nagel*, Düren, isoliert und für den Injektionsmix etwa 4 μ g P-Element-Transformationsvektor und 1 μ g Helfer-Plasmid (pUChsp Δ 2-3) gemischt. Desweiteren wurden 1 μ l 10xInjektionspuffer sowie 1 μ l 2% Phenolrot zugefügt und mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 10 μ l aufgefüllt. Vor dem Befüllen der Kapillaren mit der Injektionslösung wird dieser 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um Schwebeteilchen, die die Kapillare verstopfen könnten, abzutrennen.

Glaskapillaren (GB120F-10, *Science Products GmbH*, Hofheim) wurden mit dem Flaming/Brown Micropipette Puller (*Sutter Instrument Co.*, USA) mit dem 2-Schritt-Programm 33 gezogen und danach 5 min unter einem Anstellwinkel von ca. 30° geschliffen (*Bachofer*, Reutlingen). Die Befüllung der Kapillare erfolgte mit Hilfe einer ausgezogenen Glaspipette von hinten.

Programm 33:

- | | | | | |
|-----|------------|------------|-----------|-----------|
| 1.) | Heat = 460 | Pull = 0 | Vel. = 30 | Del. = 50 |
| 2.) | Heat = 460 | Pull = 100 | Vel. = 60 | Del. = 5 |

Lösungen:

- 10 x Injektionspuffer: 5mM KCl, 0.1mM Na-Phosphatpuffer, pH 6.8

2.4.1.2 Mikroinjektion

Für die Injektionen werden w^- -Embryonen (w^{1118}) benutzt. Da alle P-Element-Transformationsvektoren ein w^+ -Gen tragen, welches ins Fliegen-genom mitintegriert, können transgene Fliegen anhand ihrer Augenfarbe (von schwach gelb bis dunkelrot, je nach Insertionsort) erkannt werden.

Die Injektion in den posterioren Teil der w^- -Embryonen erfolgt vor Bildung der Polzellen, welche die spätere Keimbahn der Fliege bilden. Nur so bietet sich die Möglichkeit, dass die DNA bei der Zellbildung internalisiert und ins Genom der Polzellen integriert wird.

Dies ist bis etwa 1.5 std nach Befruchtung möglich, weil der Embryo bis dahin ein Synzytium von sich teilenden Kernen darstellt (Campos-Ortega und Hartenstein, 1997).

Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, die *w*-Fliegen zur Eiablage etwa zwei Tage vor Beginn der Mikroinjektion auf Apfelsaft-Agarplatten zu setzen und diese häufiger zu wechseln, da dann mehr Eier gelegt werden und die Embryonen einer Ablage vom Alter her synchronisiert sind.

w-Fliegen werden für ca. 20 min auf Apfelsaft-Agarplatten gesetzt und die abgelegten Eier von Hand oder chemisch (2 min in einem 1:1 Gemisch aus Natriumhypochlorid und H₂O, anschliessend gut waschen) dechorionisiert. Anschliessend werden die Embryonen in gleicher Orientierung auf einem Apfelsaft-Agarblöckchen aufgereiht und auf ein vorher mit Kleber bestrichenes Deckglas übertragen. Nun lässt man die Embryonen unter optischer Kontrolle trocknen, bis sich bei Berührung mit einer Präpariernadel in der Vitellinmembran Falten bilden. Das Deckglas wird auf einem Objektträger fixiert und die Embryonen mit 3S Voltalef-Öl überschichtet. Die Injektionen erfolgen mittels Druckluft (Pneumatic PicoPump PV 820, *World Precision Instruments Inc.*, Sarasota, USA) unter dem Durchlicht-Mikroskop (Zeiss Axiovert 25) mit dem motorisierten Mikromanipulator (Piezo Manipulator PM 10). Die Injektion in den Embryo kann durch den Phenolrot-Zusatz in der Injektionslösung gut kontrolliert werden. Fertig injizierte Embryonen werden mit 3S Voltalef-Öl überschichtet und bis zum Schlüpfen in einer feuchten Kammer bei 18°C aufbewahrt. Geschlüpfte L1-Larven werden zu 50 Individuen in ein vorbereitetes frisches Fliegenröhrchen (Brei wird angefeuchtet, aufgelockert und mit einem Tupfer Hefe versehen) gesammelt und bis zum Schlüpfen der adulten Fliegen ebenfalls bei 18°C gehalten.

Lösungen:

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

2.4.1.3 Isolierung und Balancierung transgener Fliegen

Den geschlüpfen Tieren (G₀) aus der F1-Generation kann nicht angesehen werden, ob eine Insertion der injizierten DNA erfolgt ist, da diese in der Regel nicht die somatischen,

sondern nur die Keimbahnzellen betrifft. Aus diesem Grund wird jedes G_0 -Tier gegen 3 Tiere mit dem Genotyp $w^+/w^+(Y); Gla/CyO$ (weißäugig mit zweitchromosomalem Balancer) gekreuzt. Unter deren Nachkommen befinden sich rotäugige Tiere, wenn es zu einer Keimbahntransformation des G_0 -Tieres gekommen ist. Zur Ermittlung des Insertionsortes des P-Elementes auf dem ersten, zweiten oder dritten Chromosom bedarf es weiterer Kreuzungen gegen erst-, zweit- und drittchromosomale Balancerchromosomen. Stämme, die homozygot nicht lebensfähig sind, werden balanciert etabliert und gehalten. Im Falle von Mehrfachinsertionen wird versucht, diese zu trennen, separat auszukreuzen und zu etablieren.

2.4.1.4 Konstrukte zur Erzeugung transgener Fliegen

Die DNA des im Hefe-2-Hybrid Systems gefundenen Klons CG4420 wurde mit NotI und XhoI verdaut. Der pUAST-Flag Vektor wurde mit den gleichen Enzymen gespalten. Es folgte eine standard Ligation.

Um die komplette cDNA von FKBP zu erhalten wurde ein EST Klon bestellt. Aus diesem wurde mittels PCR die DNA amplifiziert. Den Primern wurden Schnittstellen für Restriktionsenzyme zugefügt, um die DNA in den pUAST Vektor zu klonieren. Die DNA und der pUAST-Flag Vektor wurden mit NotI und XhoI gespalten und es folgte eine standard Ligation.

2.5 Genetische Methoden

2.5.1 Fliegenzucht

Die Haltung der Fliegen erfolgte auf Standardmedium bei 18°C, RT und 25°C. Eiablagen wurden auf Apfelsaft-Agarplatten angesetzt, die zur Stimulation der Eiablage mit einem Tupfer Hefe versehen wurden.

Lösungen:

Standardmedium: 356g Maisschrot, 47.5g Sojamehl, 84g Trockenhefe, 225g Malzextrakt, 75ml 10% Nipagin, 22.5ml Propionsäure, 28g Agar, 200g Zuckerrübensirup \Rightarrow mit 4.9l dH₂O auffüllen.

2.5.2 Erzeugung von Keimbahnklonen

Die Keimbahnklone wurden mit dem FLP-DFS-System (Flipase- dominant female sterile)erzeugt, welches dazu dient, durch Rekombination weibliche Keimzellen zu erzeugen, die für eine bestimmte Mutation homozygot sind. Der Embryo, der aus dieser Keimzelle hervorgeht, wird kein wildtypisches Genprodukt des betroffenen Gens erhalten, wenn nicht

eine wildtyp-Kopie des Gens durch den paternalen Chromosomensatz eingebracht wird. Auf diese Art und Weise kann die Bedeutung der maternalen Komponente für die Ausprägung des mutanten Phänotyps untersucht werden. *Drosophila* Weibchen besitzen zwei Ovarien mit je 15-17 Ovariolschläuchen, in denen sich die Eikammern bilden. Die einzelne Eikammer beginnt die Entwicklung am anterioren Teil des Ovariolschlauchs mit vier mitotischen Teilungen. Dabei entstehen 15 Nährzellen und eine Oozyte. Wenn die Keimzelle homozygot mutant ist, entstehen Eier ohne besagtes Genprodukt. Um diese Eier von solchen zu unterscheiden, die aus heterozygoten Eikammern entstanden sind, wird eine Sterilmutation (*ovo^D*) eingesetzt, die in heterozygoten Weibchen die Oogenese blockiert. Da dieser Effekt zellautonom und dominant ist, gehen nur aus Ovarien, die homozygot wildtypisch für die Sterilmutation und homozygot mutant für das untersuchte Gen sind, Eier hervor, denen das maternale Genprodukt fehlt. Werden die Weibchen, in denen Ovarien vorliegen, die für das untersuchte Gen durch Rekombination homozygot mutant sind, mit heterozygoten Männchen gekreuzt, entstehen genotypisch zwei Embryo-Klassen: Solche, die weder maternales noch zygotisches Genprodukt besitzen und die, die vom Vater eine wild-typ Kopie des Gens erhalten haben. Ist der Phänotyp der Keimbahnklon-Embryonen gegenüber dem zygotischen Phänotyp verstärkt, hat das Gen eine maternal aktive Komponente. Anhand der entstehenden zwei Embryo-Klassen läßt sich dann noch die Frage beantworten, ob und inwiefern das vom Vater eingebrachte wildtyp-Gen den maternalen Phänotyp retten kann (paternale Rettung). Bei dem Flp-DFS-System (Flipase-dominant female sterile [*ovo^{D1}*]) wird das Flipase-Rekombinationssystem der Hefe genutzt, um sequenzspezifische Rekombination in *Drosophila* zu erzeugen. Durch P-Element vermittelte Keimbahntransformation wurden die Flipase und ihre Zielsequenzen, sogenannte FRT-Sequenzen, die aus 599 bp langen invertierten Sequenzwiederholungen bestehen, vom 2 μ m Plasmid der Hefe auf *Drosophila* übertragen. Die Flipase wurde hinter einen Hitzeschockpromotor in einen P-Elementvektor, der das *rosy⁺*-Gen als Marker trägt kloniert. Das sogenannte FRT-Element besteht aus einem P-Element-Vektor, der ein *white⁺*-Minigen enthält, flankiert von zwei FRT-Sequenzen. Durch einen Hitzeschock kann die Flipase aktiviert werden und Rekombination zwischen zwei FRT-Sequenzen verschiedener FRT-Elemente im *Drosophila*-Genom katalysieren (Golic & Lindquist, 1989). Von Chou & Perrimon (1992) wurde dieses System erstmals zur Erzeugung von Keimbahnklonen genutzt. Hierzu wurden Chromosomen erzeugt, die *fs(1)ovo^{D1}* und FRT-Elemente tragen. Damit eine Rekombination zwischen dem *fs(1)ovo^{D1}* tragenden Chromosom und dem zu untersuchenden Allel stattfinden kann, muß dieses Allel mit demselben FRT-Element rekombiniert werden (Abb. 2-3).

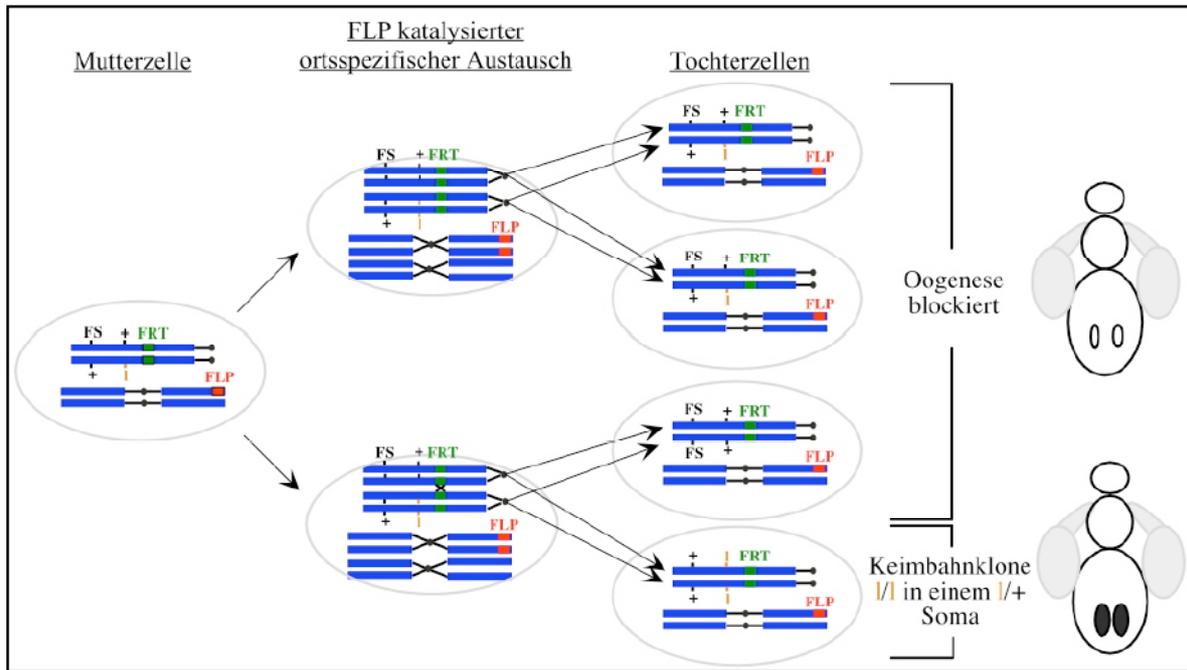


Abbildung 2-3: Schematische Darstellung der „Flp-DSF“-Technik (verändert nach Chou & Perrimon, 1992). Die *FLP*-Rekombinase induziert ortsspezifischen Austausch: hier ist ein chromosomaler Austausch gezeigt, der im Euchromatin einer Fliege des Genotyps *Fs + FRT/ + I FRT; FLP/ +* auftritt. In diesem Schema ist die *FRT*-Insertion auf dem X-Chromosom proximal zu beiden *Fs* und *I* dargestellt. Der autosomal lokalisierte *hsp70-FLP* kann durch Hitzeschock ausreichend Rekombinaseaktivität erzeugen, um ortsspezifischen chromosomalen Austausch an der Position der *FRT*-Sequenzen zu katalysieren. Nomenklatur: Atrophische Ovarien sind als leere Ovale, entwickelte Ovarien als schwarze Ovale markiert. *FLP*-Rekombinase-Ziel-Sequenzen (*FRT*) sind als grüne Kästchen und *FLP* als rote Kästchen gezeigt. Dominant weiblich steril (*Fs*), rezessive, zygotisch letale Mutation (*I*), *hsp70-FLP* (*FLP*).

Es wurden die Allele *Pten*^{DJ189} (Gao et al., 2000) und *Pten*^{c494} (Huang et al., 1999) benutzt um Keimbahnklone zu erzeugen. Die Weibchen hatten folgende Phänotypen: *y w P[ry⁺ FLP]¹², Pten P[hs neo ry⁺ FRT]^{2L-40A}/P[mini w⁺ ovo^{D1}]^{2L-13X13} P[hs neo ry⁺ FRT]^{2L-40A}*. Um Keimbahnklone in Ovarien durch Abwesenheit von GFP zu markieren wurden folgende Weibchen benutzt: *P[w^{+mC} Ubi-GFP(S65T)nls]^{2L} P[hs neo ry⁺ FRT]^{2L-40A}*. Überexpressionen von PTEN mittels des UAS GAL4 Systems (Brand und Perrimon, 1993) wurde mit UAS PTEN2 (Huang et al., 1999) und UAS PTEN3 (Goberdhan et al., 1999) Fliegen durchgeführt. Als Treiber diente der Fliegenstamm *P[w^{+mC}=Act5C-GAL4]^{17bF01}*. Oregon R Fliegen dienten als wild-typ Fliegen.

2.6 Histologische Methoden

2.6.1 Verwendete Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Referenz
Ratte α -PTEN	1:200	(Ramrath)
Kaninchen α -PTEN	1:500	(Ramrath)
Kaninchen α -Baz	1:500	(Wodarz et al., 1999)
Ratte α -Baz	1:200	(Wodarz et al., 2000)
Maus α -Neurotaktin BP106	1:10	Developmental Studies Hybridoma Bank
Ratte α -Vasa	1:5000	(Tomancak et al., 1998)
Kaninchen α -Staufen	1:500	(St Johnston et al., 1991)
Ziege α -PKC zeta C20	1:1000	Santa Cruz
Maus α - α -Tubulin	1:500	SIGMA
Maus α - β -Gal	1:1000	Promega
Kaninchen α - β -Gal	1:5000	Promega
Ratte α -FKBP59	1:200	
Kaninchen α -CG4420	1:500	
Esel α -Ratte Cy2	1:200	Jackson Laboratories
Esel α -Kaninschen Cy2	1:200	Jackson Laboratories
Esel α -Maus Cy2	1:200	Jackson Laboratories
Esel α -Ratte Cy3	1:200	Jackson Laboratories
Esel α -Kaninchen Cy3	1:200	Jackson Laboratories
Esel α -Maus Cy3	1:200	Jackson Laboratories
Esel α -Ratte Cy5	1:200	Jackson Laboratories
Esel α -Kaninchen Cy5	1:200	Jackson Laboratories
Esel α -Maus Cy5	1:200	Jackson Laboratories
Ziege α -Ratte Alexa	1:200	Jackson Laboratories

Ziege α -Kaninchen Alexa	1:200	Jackson Laboratories
Ziege α -Maus Alexa	1:200	Jackson Laboratories

2.6.2 Standardprotokoll für Antikörperfärbungen an Embryonen

- Embryonen für ca. 4 min in Natriumhypochlorid dechorionisieren, anschließend gut mit H₂O waschen
- Embryonen mit Pinsel in Eppendorfgefäß mit Fixierlösung überführen und 15-20 min am Über-Kopf-Rotor fixieren
- zum Devitellinisieren untere (wässrige) Phase abziehen, durch Methanol ersetzen und 30 sec kräftig schütteln; Embryonen absinken lassen und Überstand abnehmen
- Embryonen zunächst 10 min in Methanol inkubieren, dann 3 x 20 min mit PBT waschen
- Embryonen 1 std mit 5-10% normalen Ziegen Serum (NGS) (in PBT) "blocken", um unspezifische Antikörperbindungen zu reduzieren
- Primären Antikörper in Blockinglösung verdünnen und über Nacht bei 4°C oder für 2 std bei RT inkubieren
- Primären Antikörper abziehen, Embryonen 3 x 20 min mit PBT waschen
- Sekundäre Antikörper in Blockinglösung verdünnen und für 2 std bei RT inkubieren
- Sekundäre Antikörper abziehen, Embryonen 3 x 20 min mit PBT waschen
- Der Nachweis der Markierung erfolgt entweder durch eine enzymatische Farbreaktion (bei HRP- oder AP-gekoppelten sekundären Antikörpern) oder durch Fluoreszenzmikroskopie bei Fluoreszenz gekoppelten sekundären Antikörpern. Bei der Arbeit mit Fluoreszenzgekoppelten Antikörpern kann an dieser Stelle direkt in Glycerin/Propylgalat eingedeckelt werden.

Enzymatische Farbreaktion:

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

- Embryonen in Kanadabalsam (*Roth*, Karlsruhe) einbetten

Lösungen:

- Fixierlösung: 268 ml PBS
33 ml Formaldehyd (37%)
300 ml Heptan
- PBT : 1 x PBS mit 0,1% Triton X-100
- PBS (10 x): 1,3 M NaCl
70mM NaHPO₄
30mM NaH₂PO₄
- Färbelösung : 800 µl PBT + 200 µl DAB-Lösung (vorher mit 1-2 µl 30%
H₂O₂ aktiviert)
- DAB –Stammlsg.: 1 mg DAB (3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid)/ml in PBS, bei -20°C
gelagert
- Glycerin/Propylgalat: 75% Glycerin /in H₂O
50mg/ml Propylgalat

2.6.3 Modifizierung des Standardprotokolls

Für einige Antikörper muß das oben beschriebene Standardprotokoll modifiziert werden, um das Resultat zu verbessern. Für manche Antikörper empfiehlt sich eine 11%ige oder eine 37%ige Formaldehydfixierung, bei anderen Antikörpern, führt eine Hitzefixierung zur Ergebnisverbesserung. Für die Aktin- und Tubulinfärbungen wurde 37%iges Formaldehyd benutzt und MeOH wurde durch 80% EtOH ersetzt.

Hitzefixierung (nach H.- A.J. Müller, 1996) :

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

2.6.4 Antikörperfärbungen an Ovarien

- Ovarien aus adulten Fliegen in PBS präparieren. Fliegen am Tag zuvor mit Hefe versorgen
- 15 min in 4% Formaldehyd/PBS fixieren

- 10 min in PBS + 0.1% Tween waschen
- 3 std in PBS + 0.5% Triton + 5% BSA blocken
- mit primären Antikörper in PBS + 0.1% Tween + 1% BSA ü/N bei 4°C inkubieren
- 3 x 10 min mit PBS + 0.1% Tween waschen
- mit sekundärem Antikörper in PBS + 0.1% Tween + 1% BSA 2 std inkubieren
- 3 x 10 min mit PBS + 0.1% Tween waschen
- Eindeckeln

2.6.5 DNA-Fluoreszenz-Markierung mit Yoyo-1

Zur Markierung von DNA in histologischen Präparaten wurde der Fluoreszenzmarker Yoyo-1 (Molecular Probes, Eugene, OR) verwendet. Während der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wird DNase-freie RNase (200 µg/ml) zu den Embryonen gegeben und diese anschließend mehrfach mit PBT gewaschen. Yoyo (1:10 000) wird für 15 Min hinzu gegeben und die Embryonen danach gründlich mit PBT gewaschen.

2.6.6 X-Gal Färbung an Embryonen

- Embryonen dechorionisieren
- 10 min in 1:1 4% Formaldehyd : Heptan fixieren und anschließend untere, wässrige Phase und Heptanphase abziehen
- 1:1 frisches Heptan : 80% Ethanol hinzu geben und für 30 sek kräftig schütteln
- devitellinisierten Embryonen sinken ab
- mehrmals mit PBT waschen
- Embryonen in 1 ml Färbepuffer vorinkubieren
- zur Farbreaktion Embryonen in 1 ml Färbelösung für längere Zeit bei 37°C inkubieren. Färbung unter dem Binokular kontrollieren und gegebenenfalls Farbreaktion mit PBT abstoppen

Lösungen:

- Färbelösung: 20µl 10% X-GAL (5-Br-4-Cl-3-Indolyl-β-D-Galactosid)-DMSO in 1ml X-Gal-Puffer (X-Gal Puffer bei 50°C vorwärmen, X-Gal DMSO zugeben und noch einige Min bei 50°C vorinkubieren)
- X-Gal Puffer: 150 mM NaCl
1 mM MgCl₂
10 mM Na-Phosphatpuffer pH 7.2
3.3 mM K₃Fe(CN)₆
3.3 mM K₄Fe(CN)₆

2.6.7 In-situ-Hybridisierung

Erkenntnisse über die räumliche und zeitliche Verteilung von Transkripten in Geweben lassen sich durch deren Detektion mithilfe von DNA- bzw. RNA-Sonden gewinnen. Bei der Herstellung der Sonden wird Digoxigenin-markiertes dUTP (DIG-dUTP) eingebaut und nach erfolgter Hybridisierung mit einem gegen das Digoxigenin gerichteten Antikörper in-situ nachgewiesen (Tautz und Pfeifle, 1989).

2.6.7.1 In-situ-Hybridisierung der Ovarien

- Ovarien adulter Fliegen in PBS präparieren
- 20 min in 4% PFA/PBS fixieren, anschließend 3 x kurz in PBS waschen
- 2 min auf Eis in 4% PFA/PBS + 0.5% Glutaraldehyd fixieren
- 3 x 10 min in PBS waschen
- 20 min in 4% PFA/PBS + 0.1% Triton + 0.1% Desoxycholat fixieren
- mehrmals kurz in PBS waschen, anschließend mehrmals 5 min in PBT waschen
- ProteinaseK Behandlung: 5 min in 1 ml PBT mit 2.8 μ l ProteinaseK (20 mg/ml)
- 2 x 2 min in Glycin waschen: 20 μ l Glycin (100 mg/ml) in 1 ml PBT
- 2 x 5 min in PBT waschen
- 20 min in 4% PFA/PBS fixieren
- 5 x 3 min in PBT waschen
- kurz in 1:1 PBT:Hybridisierlösung waschen
- Vorhybridisierung für mindestens 60 min bei 50°C in Hybridisierlösung
- Hybridisierung ü/N bei 50°C
 - Vorinkubation DIG-AP: 1 ml PBT + 10 μ l DIG-AP (= 1:100) für mind. 60 min auf Embryonen geben
- 30 min bei 50°C in Hybridisierlösung waschen
- 30 min bei 50°C in 1:1 PBT:Hybridisierlösung waschen
- 4 x 15 min bei 50°C in PBT waschen
- 1 x 10 min bei RT in PBT waschen
- 60 min bei RT oder ü/N bei 4°C mit dem vorinkubierten α -DIG-AP Antikörper inkubieren (Endkonzentration = 1:2000 in PBT)
- 4 x 15 min mit PBT waschen
- waschen mit Färbepuffer (NBT-Puffer)
- Färbung: 1 ml PBT + 4.5 μ l NBT + 3.5 μ l B-CIP

Lösungen:

- 4% Paraformaldehyd/PBS:
 - 8g Paraformaldehyd
 - 160ml H₂O
 - 65°C
 - + 2N NaOH bis PFA in Lösung geht
 - + 1N HCl bis pH 7.0
 - + 20ml 10xPBS
 - + 200ml H₂O
- Hybridisierlösung:
 - 50% Formamid
 - 5xSSC
 - 100µl Hefe RNA
 - 50µl Heparin
 - 100µg/ml Lachssperm DNA
 - 0.1% Tween
- NBT Puffer:
 - 100mM NaCl
 - 50mM MgCl₂
 - 100mM Tris, pH 9.5
 - 0.1% Tween

2.6.7.2 In-situ-Hybridisierung der Embryonen

- Embryonen mit Na-hypochlorid dechorinisieren
- Embryonen 20 min in 1:1 PBS + 11% Formaldehyd:Heptan fixieren
- Embryonen devitellinisieren: wässrige Phase entfernen und mit MeOH auffüllen. Anschließend kräftig schütteln. Devitellinisierte Embryonen sinken ab und können in Eppendorf Gefäß überführt werden.
- Embryonen mit MeOH und dann mit EtOH waschen. Embryonen können jetzt in EtOH eingefroren werden.
- Waschen mit MeOH, dann mit 1:1 MeOH/ PBT+5% Formldehyd
- 20 min in PBT + 5% Formaldehyd fixieren
- 3 x mit PBT waschen
- ProteinaseK Behandlung: 5 min in 1 ml PBT mit 2.5 µl ProteinaseK (20 mg/ml)
- 2 x 2 min in Glycin waschen: 20 µl Glycin (100 mg/ml) in 1 ml PBT
- 2 x 5 min in PBT waschen
- 15 min in PBT + 5% Formaldehyd fixieren
- 5 x 2 min in PBT waschen
- 2 min waschen in 1:1 PBT:Hybridisierlösung
- 2 min waschen in Hybridisierlösung
- mindestens 60 min bei 50°C in Hybridisierlösung vorhybridisieren
- Hybridisierung erfolgt in kleinem Volumen mit 10-50 ng hitzedenaturierter Probe bei 50°C ü/N

- Vorinkubation DIG-AP: 1 ml PBT + 10 μ l DIG-AP (= 1:100) für mind. 60 min auf Embryonen geben
 - 30 min bei 50°C in Hybridisierlösung waschen
 - 30 min bei 50°C in 1:1 PBT:Hybridisierlösung waschen
 - 4 x 15 min bei 50°C in PBT waschen
 - 1 x 10 min bei RT in PBT waschen
 - 60 min bei RT oder ü/N bei 4°C mit dem vorinkubierten α -DIG-AP Antikörper inkubieren (Enkonzentration = 1:2000 in PBT)
 - 4 x 15 min mit PBT waschen
 - waschen mit Färbepuffer (NBT-Puffer)
 - Färbung: 1 ml PBT + 4.5 μ l NBT + 3.5 μ l B-CIP
- Lösungen wie bei Ovarien.

3 Resultate

Um die Rolle des PAR/aPKC Komplexes in der Ausbildung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität in verschiedenen Zelltypen und Entwicklungsprozessen näher zu erforschen wurde ein Hefe-Zwei-Hybrid Screen durchgeführt (Ramrath, 2002; von Stein, 2001). So wurden potentielle Interaktionspartner des Proteins Bazooka identifiziert, die in dieser Arbeit näher analysiert und charakterisiert wurden. Die so gefundenen putativen Interaktionspartner wurden auf eine in-vivo Interaktion überprüft, indem zuerst Antikörper gegen die gefundenen Proteine produziert wurden und anschließend Kolokalisationsstudien durchgeführt wurden (Ramrath, 2002; von Stein, 2001; von Stein et al., 2005). Die Kolokalisation wurde in Zellsystemen (*Drosophila* S2 Zellen), Ovarien und Embryonen untersucht. Es wurden teilweise Blots und Antikörperfärbungen angefertigt. Schließlich wurden noch Fliegen mit Mutationen in den betroffenen Genen untersucht und transgene Fliegen generiert, die die zu untersuchenden Proteine mittels des UAS/Gal4 System überexprimieren.

3.1 PTEN bindet an Bazooka im Hefe-Zwei-Hybrid System

In dem Hefe-Zwei-Hybrid Screen wurden ursprünglich 7 Millionen Transformanten erzeugt (von Stein, 2001). Als cDNA Bank diente DNA aus Fliegenembryonen, die 0-24 Stunden alt waren. Aus den 7 Millionen Transformanten konnten Klone isoliert werden, die mit den 3 PDZ Domänen des Bazooka Proteins interagieren. Ein Klon konnte dem Protein PTEN (Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten) zugeordnet werden. PTEN wurde bereits zuvor in einem gleich angesetzten Screen 2 mal isoliert werden (Ramrath, 2002). Die 3 Klone enthielten die C-terminale Region der Spleißvariante 2 des Proteins PTEN (PTEN2) (Smith et al., 1999). PTEN2 beinhaltet ein konserviertes C-terminales PDZ-Binde Motiv (TYL) (Songyang et al., 1997). Anschließend wurden weitere Interaktionen überprüft, um zu sehen, welche der 3 PDZ Domänen von Bazooka für die Interaktion verantwortlich sind, und ob das PDZ-Binde Motiv von PTEN Voraussetzung für diese Interaktion ist. Um dies zu erreichen, wurden die PDZ-Domänen von Bazooka einzeln und als Paare in den Ködervektor kloniert (Ramrath, Dissertation) und auf eine Interaktion mit PTEN untersucht. Zusätzlich zu PTEN2 wurde auch eine PTEN Mutante, der das PDZ-Binde Motiv fehlt (PTEN Δ TYL) und eine PTEN isoform (PTEN3), die bis auf das Fehlen des PDZ Bindemotifs zu PTEN2 identisch ist, benutzt. Als weitere Kontrolle wurden der C-terminus und der N-terminus auf eine Interaktion mit den verschiedenen PTEN Konstrukten untersucht (von Stein et al., 2005). Das Ergebnis zeigte, daß die PDZ Domänen 2 und 3 als

Paar Voraussetzung für eine Interaktion mit PTEN sind und daß nur die PTEN2 Isoform mit dem PDZ-Binde Motiv in der Lage ist, mit Bazooka zu interagieren (Abb. 3-1).

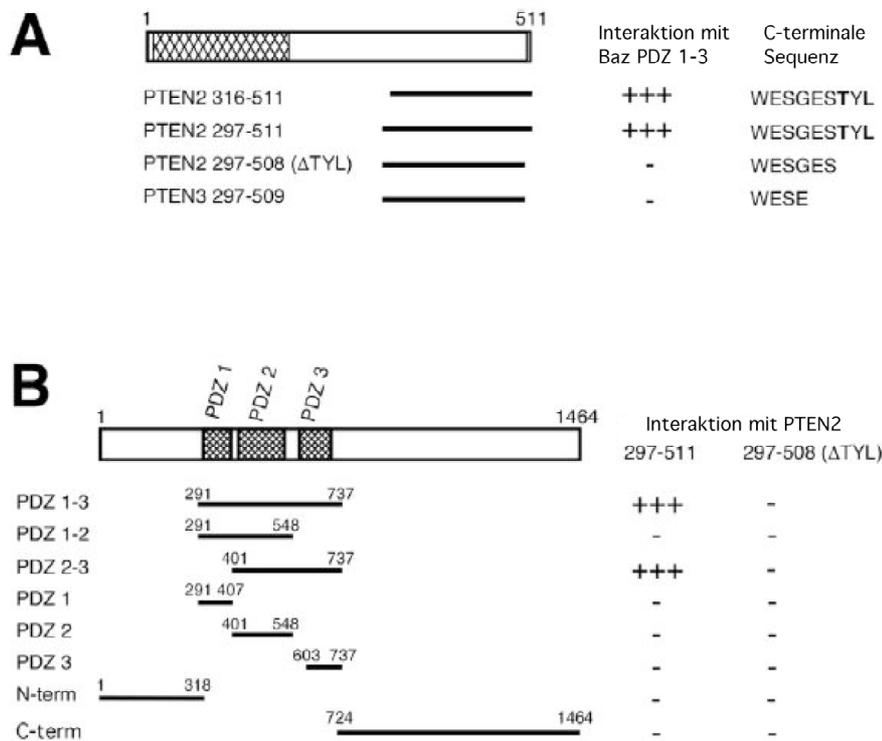


Abbildung 3-1: PDZ Domänen 2 und 3 von Baz binden direkt an das C-terminale PDZ Bindemotiv von PTEN2 im Hefe-Zwei-Hybrid System. (A) In dem Hefe-Zwei-Hybrid Screen mit den 3 PDZ Domänen als Köder konnten 3 Klone, die dem C-terminalen Bereich von PTEN2 entsprachen, isoliert werden. Ein Klon umfaßte die Aminosäuren 316-511 und zwei Klone umfaßten die Aminosäuren 297-511. Weder eine Deletionsmutante, der die 3 C-terminalen Aminosäuren fehlen, noch PTEN3 bindet an die PDZ Domänen von Baz. (B) Verschiedene Regionen von Baz wurden auf eine Interaktion mit dem C-terminus von PTEN2 und mit der Deletionsmutante getestet. So konnte die Interaktion auf die PDZ Domänen 2 und 3 eingegrenzt werden.

3.1.1 PTEN und Bazooka kolokalisieren im Embryo

Die Interaktion von PTEN und Baz, die im Hefe-Zwei-Hybrid System gezeigt wurde, konnte mit Koimmunoprecipitationsexperimenten bestätigt werden (von Stein et al., 2005). Um eine Interaktion in-vivo nachzuweisen wurden zwei polyklonale Antikörper gegen PTEN erzeugt (Ratte und Kaninchen) (Ramrath, 2002). Die beiden Antikörper sind spezifisch gegen PTEN gerichtet. Bazooka und PTEN bilden einen Komplex in *Drosophila* Schneiderzellen, die mit den beiden Proteinen kotransfiziert wurden (Ramrath, 2002; von Stein et al., 2005). Die Antikörper konnten jedoch endogenes PTEN in Embryonen nicht nachweisen, was entweder an einer zu geringen Expression von PTEN oder an einer nicht

ausreichenden Sensitivität des Antikörpers liegen könnte. Wenn PTEN jedoch mittels des UAS-GAL4 Systems überexprimiert wurde (Brand und Perrimon, 1993), zeigt sich, daß PTEN apikal in Epithelzellen lokalisiert ist (Abb. 3-2, Pfeile), einen apikalen Halbmond in sich teilenden Neuroblasten bildet (Abb. 3-2, Sternchen) und dort mit Bazooka kolokalisiert (Ramrath, 2002; von Stein et al., 2005).

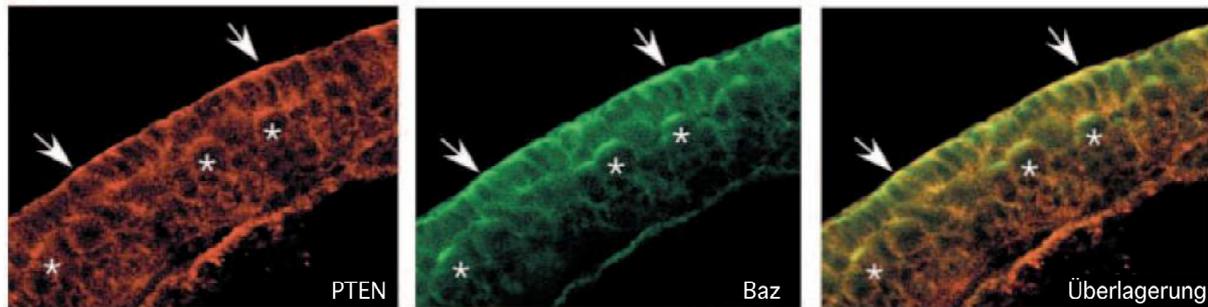


Abbildung 3-2: PTEN2 und Bazooka kolokalisieren im Embryo. Ein Embryo der PTEN2 ubiquitär unter der Kontrolle eines maternalen Gal4 Treibers exprimiert wurde mit Antikörpern gegen PTEN und Bazooka gefärbt. Beide Proteine kolokalisieren am apikalen Kortex der Epidermis (Pfeile) und im apikalen Kortex von Neuroblasten (Sterne). Der Embryo befindet sich im Stadium 10 (Campos-Ortega und Hartenstein, 1997). Genotyp des Embryos: $P\{w^{+mc}=matalpha4-GAL-VP16\}V67;UAS Pten2$.

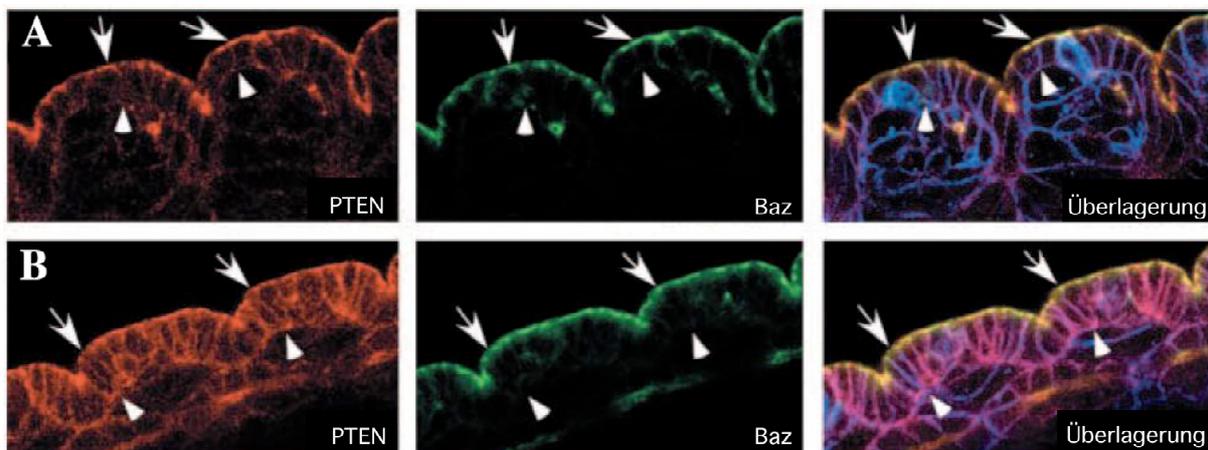


Abbildung 3-3: Die strikte apikale Kolokalisation von Bazooka und PTEN hängt vom PDZ-Binde Motiv ab. (A) Ein PTEN2 überexprimierender Embryo zeigt eine Kolokalisation von PTEN und Bazooka im apikalen Kortex der Epithelzellen. Eine Überlagerung mit Neurotaktin (blau), welches die basolaterale Membran markiert, ist nicht zu erkennen. (B) Ein PTEN3 überexprimierender Embryo zeigt, daß PTEN nicht mehr restriktiv an der apikalen Membran lokalisiert, sondern sich über die ganze Membran verteilt und auch im Zytoplasma vorhanden ist. Eine Überlagerung mit Neurotaktin ist deutlich zu erkennen (lila). Die Embryonen befinden sich im Stadium 13 (Campos-Ortega und Hartenstein, 1997). Genotypen der Embryonen: (A): $P\{w^{+mc}=Act5C-GAL4\}17bF01;UAS Pten2$. (B): $P\{w^{+mc}=Act5C-GAL4\}17bF01/UAS Pten3$

Es wurden Antikörperfärbungen an Embryonen durchgeführt, die entweder PTEN2 (PTEN + PDZ BD, Abb. 3-3a) oder PTEN3 (PTEN Δ PDZ BD, Abb 3-3b) überexprimierten. Nur Embryonen von PTEN2 Fliegen weisen eine Kolokalisation der Proteine auf. In

Embryonen, die PTEN3 überexprimierten, war PTEN nicht nur entlang der gesamten Membran, sondern auch im Zytoplasma nachzuweisen. PTEN war zwar nach wie vor auch apikal lokalisiert, das Expressionsmuster war jedoch nicht auf diese Region begrenzt. Die apikale Anreicherung von PTEN beruht also auf einer Bindung des C-terminalen PDZ-binde Motivs von PTEN mit Bazooka (Abb. 3-3).

3.1.2 PTEN und die Organisation des Aktin-Zytoskeletts in der weiblichen Keimbahn

Da nun gezeigt wurde, daß PTEN und Bazooka im Embryo kolokalisieren sollte als Nächstes untersucht werden, welche Rolle PTEN im Embryo spielt. Embryonen, denen zygotisches PTEN fehlt, sterben in späten Embryonal- oder frühen Larvalstadien, ohne offensichtliche Defekte in der Embryonalentwicklung zu zeigen. Antikörperfärbungen gegen Polaritätsproteine wie Bazooka und Miranda zeigten keine Defekte in der Epithelpolarität oder der Neuroblastenpolarität. Auch die asymmetrische Teilung der Neuroblasten war normal. Dies bestätigte frühere Beobachtungen (Goberdhan et al., 1999; Huang et al., 1999). Aus diesem Grund wurden Keimbahnklone generiert, denen maternales und zygotisches PTEN (*Pten*^{mat.zyg}) fehlte. In diesen Keimbahnklonen konnten schon während der Oogenese starke Defekte festgestellt werden.

In wild-typ Eikammern im Stadium 10 (Spradling, 1993b) findet sich Aktin entlang der Zellgrenzen der Nährzellen und ist besonders in den Ringkanälen (Abb. 3-4b, Pfeilspitzen) angereichert. Die Ringkanäle sind Strukturen, welche die Stabilität der zytoplasmatischen Brücken zwischen den Nährzellen und der Oozyte stabilisieren. Ebenso findet sich Aktin direkt unterhalb der Plasmamembran der Oozyte (Abb. 3-4b). In *Pten* Keimbahnklonen jedoch ist die Organisation des Aktins stark beeinträchtigt. So findet sich Aktin hier nicht mehr entlang der Zellgrenzen, sondern füllt das Zytoplasma der Nährzellen. Auch die Aktinverteilung unterhalb der Oozytenmembran ist stark reduziert (Abb. 3-5b). Überraschenderweise zeigten diese stark geschädigten Oozyten eine normale Verteilung von Polaritätsdeterminanten wie Staufen (Abb. 3-5c, Im Vergleich Abb. 3-6c), *oskar* mRNA, und Vasa.

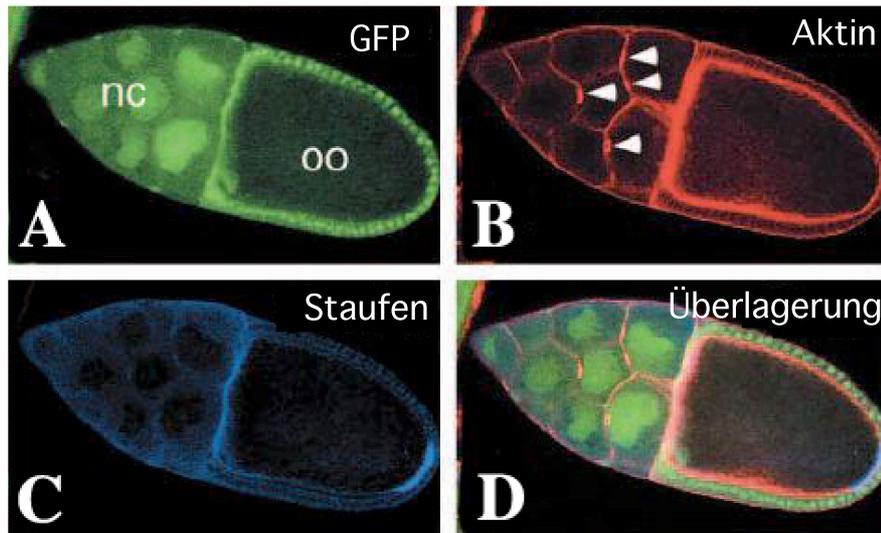


Abbildung 3-4: Verteilung von Aktin und Staufen in einer wild-typ Eikammer des Stadiums 10. (A) GFP zeigt an, daß es sich um eine wild-typ Eikammer handelt. (B) Aktin befindet sich an den Zellgrenzen der Nährzellen, in den Ringkanälen und unterhalb der Plasmamembran der Oozyte. (C) Staufen Protein befindet sich am anterioren und posterioren Pol der Oozyte. Anterior ist links. nc, Nährzelle (nurse cell); oo, Oozyte. Die Färbungen stammen von Keimbahnklonen, die mit $PTEN^{D1189}$ Fliegen generiert wurden.

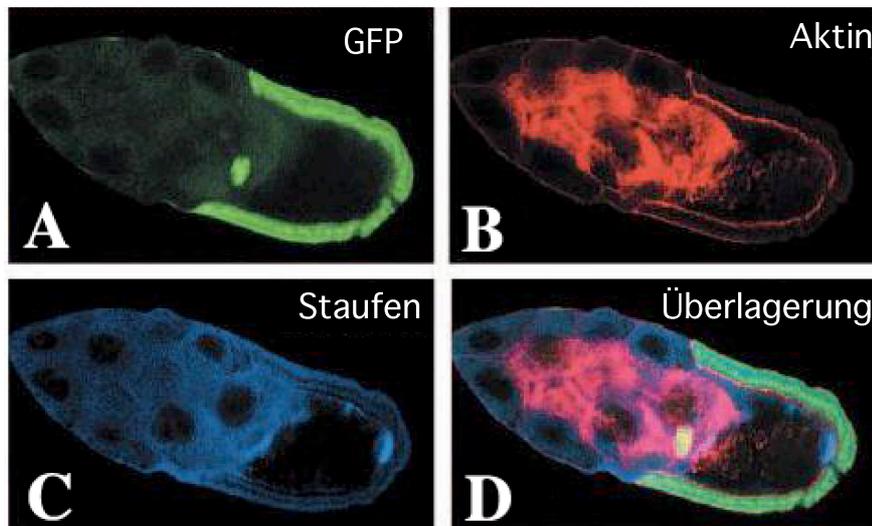


Abbildung 3-5: Die Verteilung von Aktin und Staufen in *Pten* Keimbahnklonen in einer Eikammer des Stadiums 10. (A) Das Fehlen von GFP in den Nährzellen markiert Keimbahnklone. (B) Aktinverteilung zeigt starke Defekte, während die Verteilung des Proteins Staufen (C) keine Defekte aufweist. Anterior ist links. Die Färbungen stammen von Keimbahnklonen, die mit $PTEN^{D1189}$ Fliegen generiert wurden.

Die Nährzellen an sich scheinen zu degenerieren und oft sind einige Überreste von Ringkanälen zu sehen. Auch die Zellkerne der Nährzellen nehmen ungewöhnliche Positionen ein und sie gelangen teilweise bis in die Oozyte (Abb. 3-6d). Eine Konsequenz dieser Defekte ist, daß die Eier, die diese Fliegen legen, wesentlich kleiner und abgerundeter sind als die Eier von wild-typ Fliegen (Abb. 3-7).

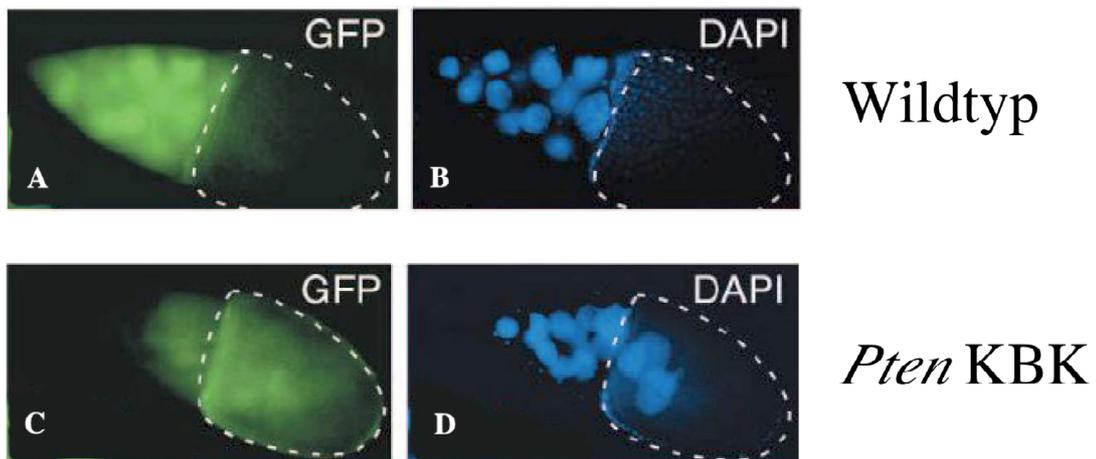


Abbildung 3-6: Kernfärbung mittels DAPI. B: In wild-typ Eikammern des Stadiums 10 penetrieren keine Zellkerne (blau, DAPI) in die Oozyte D: In vielen Eikammern des Stadiums 10 von *Pten* Keimbahnklonen penetrieren die Nährzellkerne die Oozyte. Klone von homozygoten *Pten* mutanten Zellen werden durch die Abwesenheit von GFP Fluoreszenz markiert. Das schwache GFP Fluoreszenzsignal in C kommt von den Follikelzellen, da diese Aufnahmen mit einem konventionellen Epifluoreszenzmikroskop gemacht wurden. Die Oozyte ist mit einer gestrichelten Linie umrandet. Anterior ist links. Die Färbungen stammen von Keimbahnklonen, die mit PTEN^{DJ189} Fliegen generiert wurden.

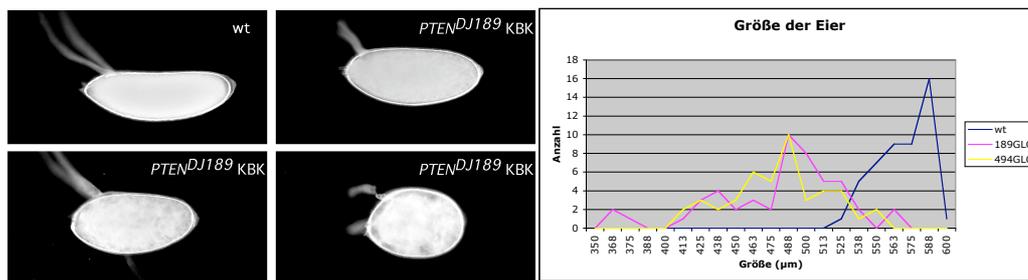


Abbildung 3-7: Die Eier von *Pten* Keimbahnklonen sind kleiner als wild-typ Eier. Wild-Typ Eier sind länglich und schlank, wohingegen die Eier von *Pten* Keimbahnklonen kürzer und rundlicher sind. Anterior ist links. Rechts ist die Anzahl der Eier in bestimmten Größen gezeigt. Es wurden jeweils 50 Eier ausgewertet. Die mikroskopischen Aufnahmen stammen von Keimbahnklonen, die mit PTEN^{DJ189} Fliegen generiert wurden.

Über die endogene Verteilung von PTEN in wild-typ Ovarien läßt sich keine Aussage machen, da unsere Antikörper das endogene PTEN nicht intensiv genug färbt und Überexpression in der Oogenese sich mit unseren Konstrukten nicht verwirklichen ließ, da

der Promotor des benutzten pUAST Vektors in der maternalen Keimbahn nicht aktiviert wird. Es gibt einen modifizierten pUAST Vektor, den pUASP Vektor, in dem das Promotorelement ausgetauscht wurde um eine Expression von Zielgenen in der maternalen Keimbahn zu ermöglichen (Duffy, 2002; Rorth, 1998).

3.1.3 *Pten* Mutanten zeigen frühe embryonale Entwicklungsdefekte

Wie bereits erwähnt sind die Eier von *Pten* Keimbahnklonen kleiner und abgerundeter als die von wild-typ Fliegen. Viele dieser Eier entwickeln sich nicht weiter, wobei noch geklärt werden muß, ob manche dieser Eier überhaupt befruchtet werden. Die Embryonen, die sich weiterentwickeln, weisen Defekte auf.

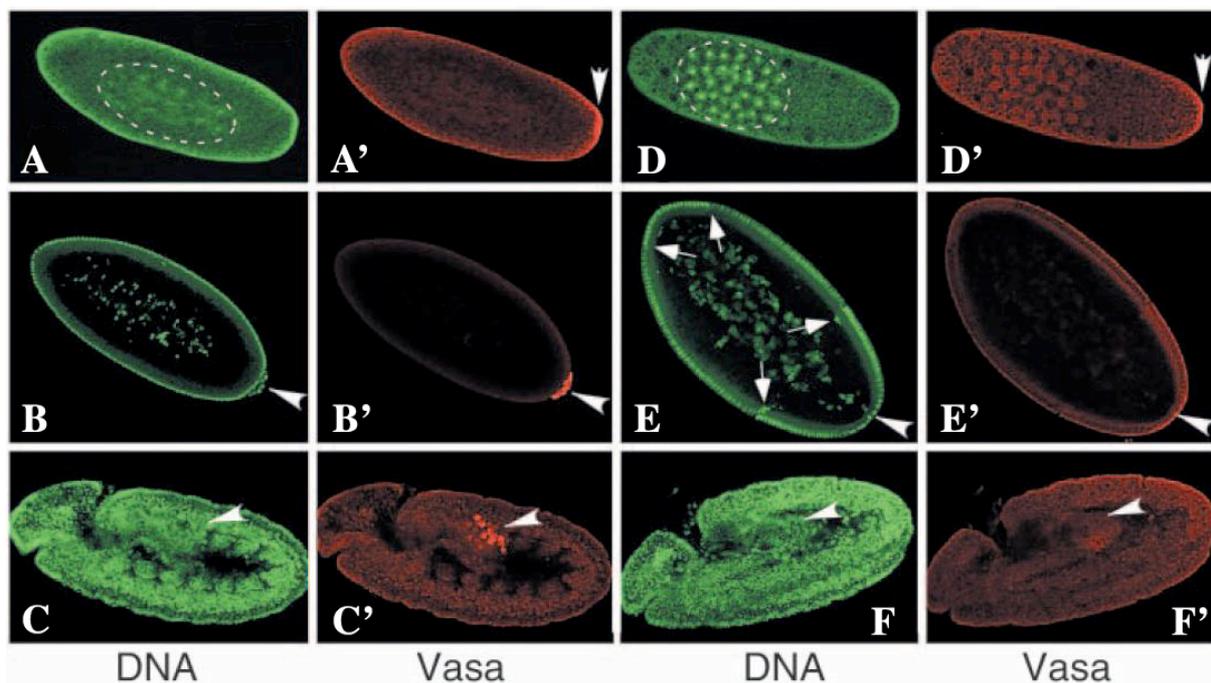


Abbildung 3-8: Defekte in der Wanderung der Kerne und in der Bildung der Keimzellen in *Pten* Keimbahnklonen. (A-C = Wildtyp, D-F = *Pten* Keimbahnklone). (A') Wildtyp Embryonen zeigen das Vasa Protein in frühen Stadien am posterioren Pol des Embryos. (B',C') Vasa befindet sich später ausschließlich in den Polzellen. (D') Im Kontrast dazu findet sich kein oder kaum Vasa Protein am posterioren Pol von *Pten* Keimbahnklonen. (E',F') Es werden normalerweise keine Polzellen geformt und Vasa ist in späteren Stadien nicht mehr nachzuweisen (Pfeilspitzen zeigen die normale Verteilung des Vasa Proteins). (A,D) Die Kernwanderung weist Defekte auf. In wild-typ Embryonen (A) formen die Kerne eine Sphäre, bevor sie mit der kortikalen Wanderung beginnen. In *Pten* Keimbahnklonen (D), verharren die Kerne im anterioren Bereich und formen dort eine Sphäre, bevor sie an die Peripherie wandern. (B,E) Kernteilungen verlieren ihre Synchronität. Pfeile weisen auf Grenzen zwischen Regionen in denen sich Kerne in unterschiedlichen Teilungsstadien befinden. A+D: Embryonen im 6. Teilungszyklus (64 Kerne), B+E: Embryonen im späten synzytialen Blastoderm Stadium, C+F: Embryonen im ausgestreckten Keimstreifen Stadium. DNA wurde mit YOYO-1 gefärbt, anterior ist links. Die Färbungen stammen von wild-typ Fliegen und von Keimbahnklonen, die mit PTEN^{DJ189} Fliegen generiert wurden.

Zuerst fällt auf, daß sich keine oder in manchen Fällen wenige Polzellen bilden. In wild-typ Embryonen finden sich ca. 35 Polzellen (Campos-Ortega und Hartenstein, 1997)

(Abb. 3-8). Das Fehlen der Polzellen deutet auf einen Defekt im Aufbau oder der Aufrechterhaltung des Keimplasmas hin (Rongo und Lehmann, 1996). Daraufhin wurde die Verteilung von Vasa untersucht. Vasa ist Voraussetzung für die korrekte Determination der Keimzellen. In wild-typ Embryonen lagert sich Vasa schon in der Oozyte am posterioren Pol an und findet sich dann in der Embryogenese ausschließlich in den Polzellen wieder (Hay et al., 1988; Lasko und Ashburner, 1990) (Abb. 3-8, A-C, Pfeilspitzen). In *Pten* Keimbahnklonen war in sehr frühen Stadien teilweise noch etwas Vasa zu sehen, später war es jedoch meist nicht mehr zu erkennen (Abb. 3-8, D-E, Pfeilspitzen). Die Polzellen der Embryonen, welche eine oder ein paar Polzellen bildeten, beinhalteten jedoch auch Vasa (Abb. 3-9, Pfeil).

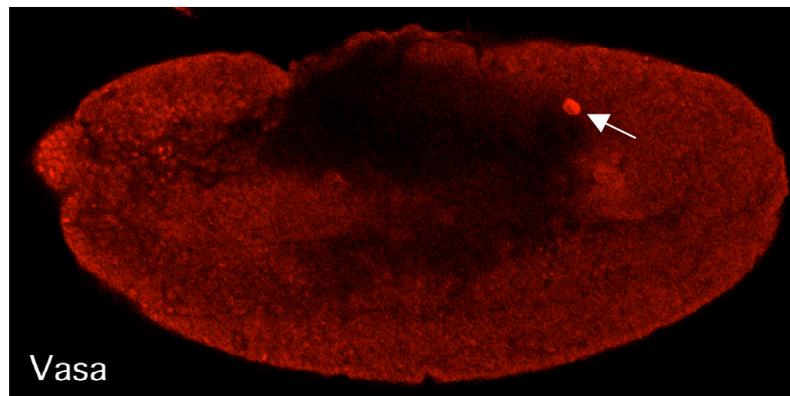


Abbildung 3-9: Eine Polzelle in einem *Pten*^{DJ189} Keimbahnklon Embryo. Rot = Vasa. Die *Pten* Keimbahnklone, die geringe Mengen an Vasa posterior anlagern, können auch einzelne Polzellen bilden (Pfeil). Anterior ist links. Der Embryo befindet sich im Stadium 10 (Campos-Ortega und Hartenstein, 1997).

Zusätzlich wurde auch die Verteilung der mRNA der Keimplasmadeterminante *oskar* untersucht. Hier zeigte sich, daß *oskar* mRNA entweder nur in sehr geringen Mengen und etwas verschwommen oder gar nicht am posterioren Pol zu finden war (Abb. 3-10).



Abbildung 3-10: Defekte in der Verteilung von *oskar* mRNA. (A) In frisch gelegten wild-typ Eiern findet sich *oskar* mRNA stark angereichert am posterioren Pol. (B,C) In *Pten*^{c494} Keimbahnklonen findet sich entweder nur sehr wenig *oskar* mRNA (B) oder gar keine (C). Anterior ist links.

Diese Defekte, in Kombination mit denen während der Oogenese, zeigen, daß PTEN anscheinend nicht für die Etablierung dieser Determinanten sondern eher für deren Aufrechterhaltung benötigt wird.

Ein weiterer Defekt, den man in der frühen Embryogenese beobachten kann, betrifft die Verteilung der Kerne. Die aktin-abhängige axiale Expansion findet in diesen Embryonen nicht statt. Die Kerne bleiben in einem Oval im anterioren Bereich, bevor die kortikale Wanderung der Kerne beginnt (Abb. 3-8, A und D). Dies resultiert in einer ungewöhnlich geringen Dichte an Kernen im posterioren Bereich des Embryos. Nachdem die Kerne den Kortex erreichen, zeigt sich, daß die Kernteilungen nicht mehr synchron verlaufen, sondern in einer sich langsam durch den Embryo bewegenden Welle stattfinden. Zu Beginn der Zellularisierung (Zyklus 14) finden sich daher Kerne in verschiedenen Teilungsstadien, welche unterschiedliche Morphologie und Chromatinkondensationsstadien aufweisen. Die Zellularisierungsfront verläuft nicht mehr gleichmäßig entlang des Embryos, sondern bewegt sich wesentlich schneller im anterioren Bereich des Embryos als im posterioren (Abb. 3-11,12,13). Die Verzögerung der Zellularisierung am posterioren Pol geht oft einher mit Defekten der morphogenetischen Bewegungen der folgenden Gastrulation. Dies scheint ein kritischer Punkt in der Embryogenese zu sein, denn hier entscheidet sich, ob sich der Embryo weiterentwickelt oder nicht. Entweder degenerieren die Embryonen zu diesem Zeitpunkt, oder sie durchlaufen die Embryogenese weiter, ohne daß Defekte zu beobachten sind. Dies hängt nicht von der paternalen Komponente ab, sondern ist unabhängig von einem eventuell erhaltenen wild-typ Allel des Vaters. Dies bedeutet, daß die frühen embryonalen Defekte ausschließlich auf das Fehlen der maternalen Komponente zurückzuführen sind.

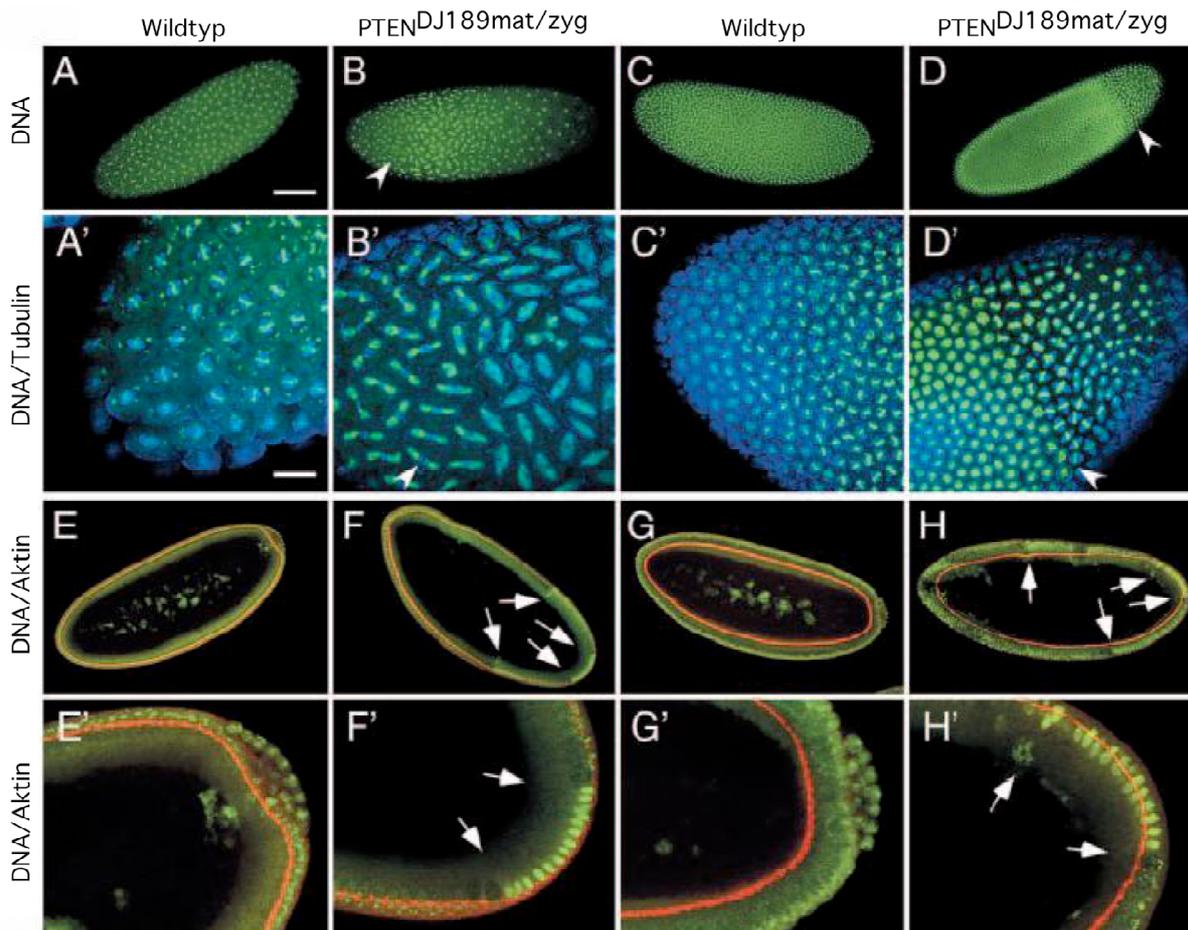


Abbildung 3-11: *Pten* mutante Embryonen zeigen Defekte in der Kernwanderung, in der Zellzykluskontrolle und in der Struktur des Aktin-Zytoskeletts während der Zellularisierung. (A,A',C,C') Kortikale Kerne in wild-typ Embryonen verteilen sich regelmäßig und teilen sich in einem nahezu synchronen Rhythmus. (B,B') In *Pten* Keimbahnklonen erkennt man, daß die Dichte der Kerne am posterioren Pol wesentlich geringer ist, als am anterioren Pol, was auf Kernwanderungsdefekten in den vorhergehenden Stadien beruht. (D,D') Im synzytialen Blastoderm sind die Kerne nach wie vor uneinheitlich verteilt und sie teilen sich asynchron. (A-D) DNA Färbung YoYo; (A'-D') Vergrößerung der Embryonen, die in A-D gezeigt sind. DNA ist grün, α -Tubulin ist blau. Die Pfeilspitzen markieren jeweils den gleichen Punkt und dienen zur Erleichterung der Orientierung. (E,E',G,G') Während der Zellularisierung von wild-typ Embryonen entsteht ein sehr regelmäßiges Netzwerk aus Aktin-Filamenten (rot) an der Spitze der invaginierenden Membran. (F,F',H,H') Die Zellularisierungsfront ist in *Pten* Keimbahnklonen sehr unregelmäßig. Zellularisierung ist besonders langsam im posterioren Bereich des Embryos, in dem keine Polzellen gebildet wurden (F', H'). Die Pfeile zeigen die Grenzen zwischen verschiedenen Zellzyklusstadien. Die Färbungen stammen von Keimbahnklonen, die mit $PTEN^{DJ189}$ Fliegen generiert wurden. Anterior ist links.

Antikörperfärbungen von gastrulierenden Embryonen zeigten keinerlei Defekte in der Verteilung von Polaritätsmarkern in Epithelzellen oder Neuroblasten (Abb. 3-12). Zusätzlich zu Miranda und Bazooka wurden auch Inscuteable und Neurotakin Antikörperfärbungen durchgeführt und auch diese zeigten keine anormale Verteilung.

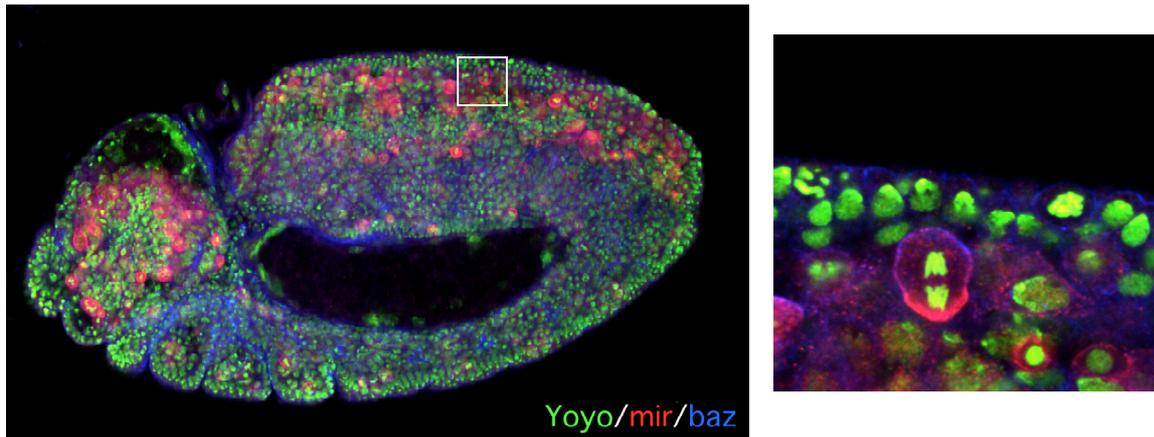


Abbildung 3-12: Ein *Pten*^{D1189} Keimbahnklon Embryo mit ausgestrecktem Keimstreif und eine durch das Viereck markierte Vergrößerung. In der Vergrößerung erkennt man deutlich einen sich teilenden Neuroblasten. Die Spindelrotation hat stattgefunden, und Bazooka (blau) und Miranda (rot) sind korrekt lokalisiert. DNA (YoYo) in grün, Mir in rot und Baz in blau. Anterior ist links.

3.1.4 Live-Aufnahmen von *Pten* Keimbahnklon Embryonen

Um die Zellzyklusdefekte besser zu analysieren wurden Live-Aufnahmen von Embryonen angefertigt (von Stein et al., 2005). Die Aufnahmen zeigten mehrere Defekte in der frühen Embryonalentwicklung. In wild-typ Embryonen bildet sich zu Beginn der Embryonalentwicklung am posterioren Pol ein kleiner Hohlraum. Dort entstehen später die Polzellen. Dieser Hohlraum wird in *Pten* Keimbahnklonen nicht gebildet (Abb. 3-13 A+D). In den Aufnahmen konnte auch bestätigt werden, daß keine Polzellen gebildet werden (Abb. 3-13 B+E). Die Wellen der 12. und 13. mitotischen Teilung konnten hier besonders gut beobachtet werden. In wild-typ Embryonen werden diese Teilungswellen an den gegenüberliegenden Polen initiiert und treffen sich in der Mitte. Es ist ein sehr schneller Prozeß, der in ca. einer Minute abgeschlossen ist. In *Pten* Keimbahnklonen werden diese Wellen hauptsächlich posterior initiiert. Die Welle der 12. Kernteilung arretiert meist in der Mitte des Embryos, und im anterioren Bereich findet keine weitere Teilung statt. Die 13. Kernteilungswelle arretiert noch vor der Zwölften (Abb. 3-13 C+F, Abb. 3-14). In den Filmen konnte auch sehr gut erkannt werden, wie die Zellularisierungsfront verläuft. In wild-typ Fliegen verläuft sie sehr gleichmäßig entlang des Embryos. In *Pten* Keimbahnklonen geht diese Gleichmäßigkeit verloren (Abb. 3-13 C+F).

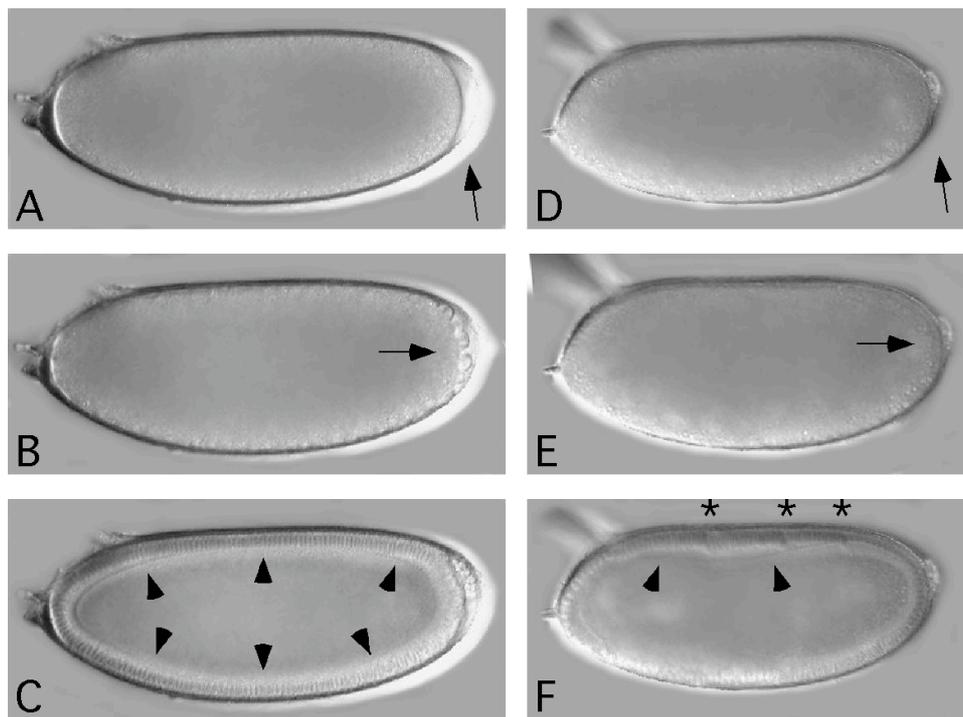


Abbildung 3-13: Defekte in der frühen Embryonalentwicklung in *Pten*^{DJ189} Keimbahnklonen. A, D: In frisch gelegten wild-typ Embryonen bildet sich ein Hohlraum am posterioren Pol, der in *Pten*^{DJ189} Keimbahnklonen nicht gebildet wird (Pfeile). B, E: In wild-typ Embryonen bilden sich im Gegensatz zu *Pten*^{DJ189} Keimbahnklonen keine Polzellen (Pfeile). C, F: Die Zellularisierungsfront verläuft in wild-typ Embryonen sehr gleichmäßig entlang des Kortex. In *Pten*^{DJ189} Keimbahnklonen verläuft die Zellularisierungsfront ungleichmäßig (Pfeilspitzen). Ebenso sieht man die Stellen, an der die mitotischen Wellen arretieren (Sternchen, siehe auch Abb. 2.1-14). Anterior ist links, A-C = wild-typ, D-E = *Pten*^{DJ189} Keimbahnklone.

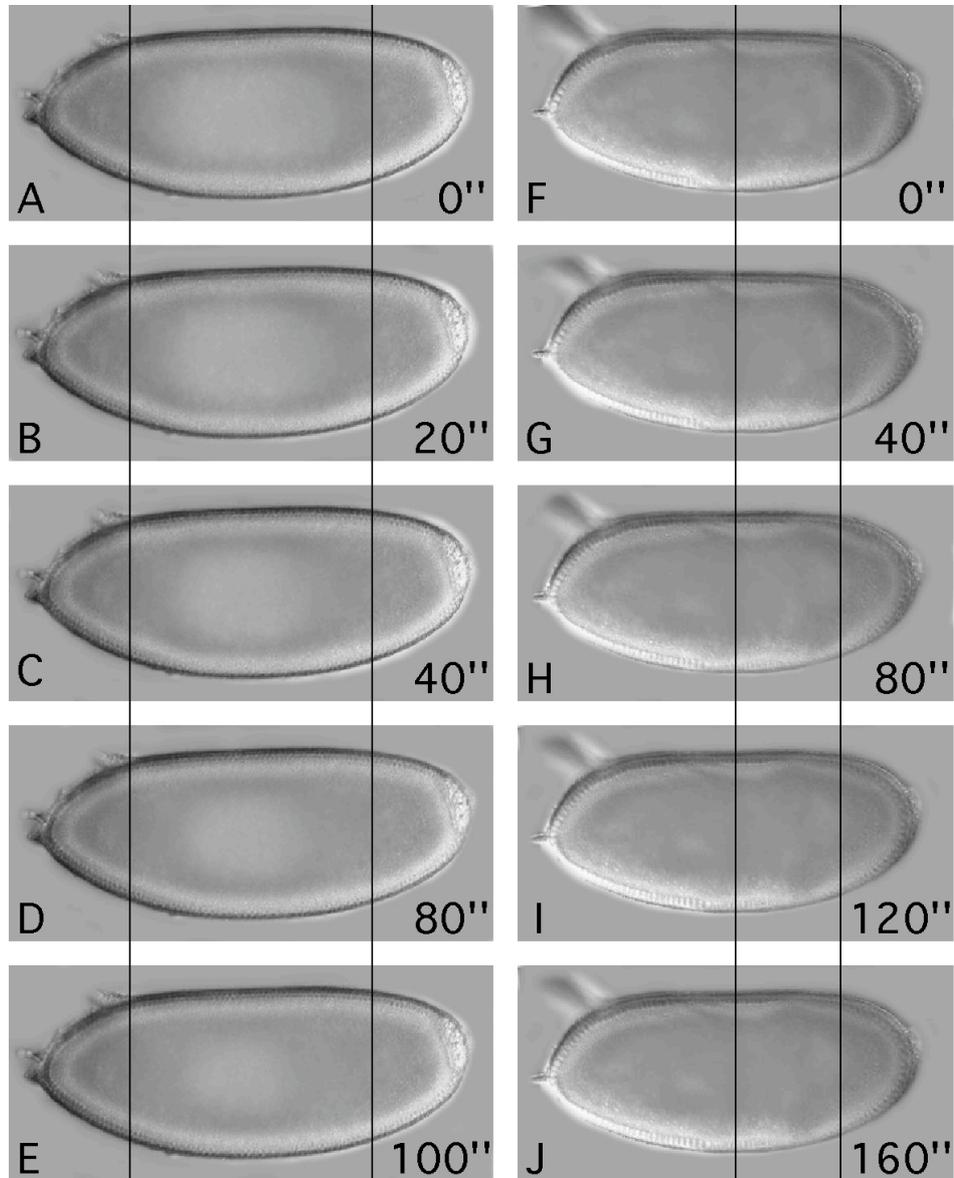


Abbildung 3-14: Mitotische Wellen in *Pten*^{DJ189} Keimbahnklonen weisen Defekte auf. In wild-typ Embryonen (A-E) wird die mitotische Welle an beiden Polen initiiert und trifft in der Mitte des Embryos aufeinander. Eine Kernteilungsphase ist nach ca. 100 sec. beendet. In *Pten*^{DJ189} Keimbahnklonen wird die mitotische Welle nur am posterioren Pol initiiert und sie arretiert in der Mitte des Embryos. Man sieht an dem linken Balken, die bereits arretierte 12. Teilungswelle. Zwischen den Balken wandert die 13. Teilungswelle, die in der Position die in J gezeigt ist arretiert. Die Wanderung der mitotischen Wellen ist langsamer als in wild-typ Embryonen und durchläuft nicht den gesamten Embryo, so daß die Kerne im anterioren Bereich weniger Kernteilungen durchlaufen. Anterior ist links, Zeitangaben in Sekunden. Gezeigt ist jeweils die Welle der 13. Kernteilung.

3.2 Die Interaktion von Bazooka und FKBP59

3.2.1 Bazooka bindet an FKBP im Hefe-Zwei-Hybrid System

Im Hefe-Zwei-Hybrid Screen wurden drei identische Klone identifiziert, die der C-terminalen Region des Gens *FKBP59* (FK506 Binding Protein 59) entsprachen. Auch hier wurden die Bazooka PDZ Domänen einzeln und paarweise auf eine Interaktion mit dem gefundenen Klon überprüft. Die Interaktion ließ sich jedoch nicht auf eine einzelne PDZ-Domäne einengen. Nur das Köderkonstrukt mit allen 3 PDZ Domänen zeigte eine Interaktion (Tab. 3-1, Abb. 3-15).

Bazooka Domäne	Interaktion
C-terminus	---
N-terminus	---
PDZ 1	---
PDZ 2	---
PDZ 3	---
PDZ 1+2	---
PDZ 2+3	---
PDZ 1+2+3	+++

Tabelle 3-1: Interaktion zwischen FKBP59 und verschiedenen Bazooka Domänen. Eine Interaktion mit FKBP59 konnte nur nachgewiesen werden, wenn alle 3 PDZ-Domänen vorhanden waren.

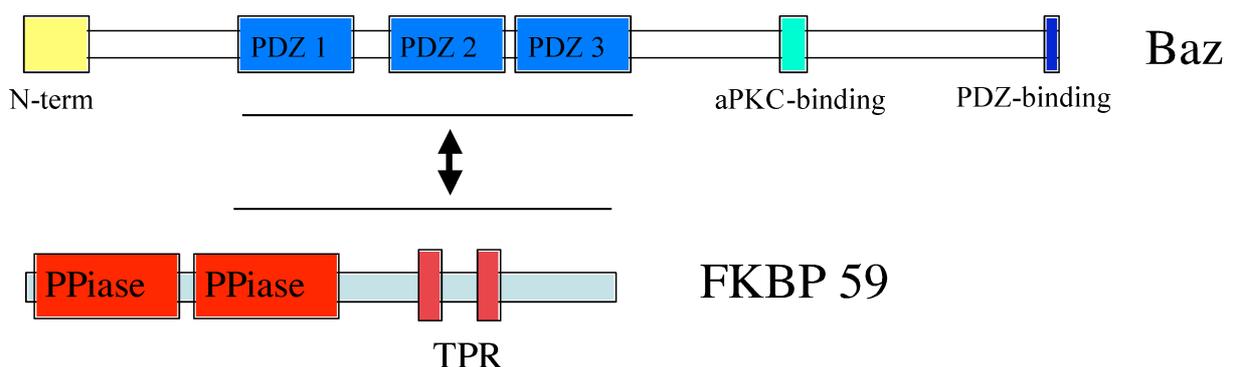


Abbildung 3-15: Die C-terminale Hälfte des Proteins FKBP59 bindet an die 3 PDZ-Domänen des Proteins Bazooka. Die Region Bazookas, die alle 3 PDZ-Domänen umschließt interagiert im Hefe-Zwei-Hybrid System mit der C-terminalen Region von FKBP59. Die Linien entsprechen dem Bereich des Köderkonstrukts, bzw. der Region des identifizierten Klons. Weiterhin dargestellt sind die Domänen der Proteine.

Bei FKBP59 handelt es sich um ein Protein, welches zwei Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase Domänen (Ppiase Domänen) und zwei Tetratricopeptide Repeat Domänen (TPR

Domäne) beinhaltet. FKBP59 sind Proteine, die FK506 binden. FK506 ist ein Medikament welches hauptsächlich bei Organtransplantationen eingesetzt wird und die Abstoßung des Gewebes verhindern soll (Albers et al., 1993; Galat, 1993; Liu et al., 1991; Schreiber, 1991). Es konnte gezeigt werden, daß FKBP59 während des gesamten Lebenszyklus von *Drosophila* exprimiert wird, und daß es eine starke maternale Komponente hat. FKBP59 ist in der späteren Embryogenese (ab Stadium 13) in spezifischen Geweben angereichert. Dazu zählen die Oenozyten, die Garland-Zellen und die Lymphdrüsen. All dies sind Gewebe in denen verstärkt Endo- und Exozytose stattfindet (Zaffran, 2000). Es gibt auch Hinweise nach denen FKBP59 an der Bildung des peripheren Nervensystems beteiligt ist. FKBP59 wurde in einem Screen für Gene die an der Entwicklung des peripheren Nervensystems beteiligt sind identifiziert (Prokopenko et al., 2000).

3.2.2 Transfektion von *Drosophila* Schneiderzellen mit *FKBP59*

Nachdem ein Antikörper gegen FKBP59 generiert wurde (von Stein, 2001), wurden *Drosophila* Schneiderzellen mit *FKBP59* und mit *Baz* kotransfiziert. Der anschließende Westernblot zeigte nur im Falle von Schneiderzellextrakten, die mit *FKBP59* transfiziert waren, eine extra Bande. Bei den anderen Banden handelt es sich wahrscheinlich um eine Kreuzreaktion (Abb. 3-16).

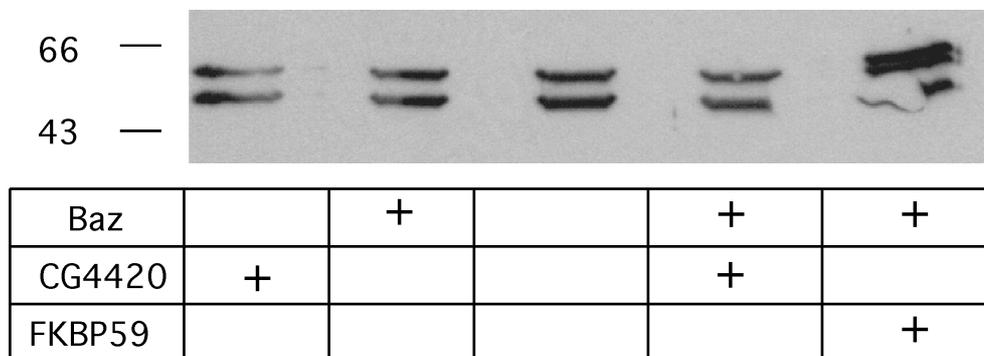


Abbildung 3-16: Schneiderzellextrakte von Zelllinien, die mit verschiedenen DNAs kotransfiziert wurden. Der Blot wurde mit dem Ratte anti-FKBP59 getestet. In der Zelllinie, die mit *Bazooka* und *FKBP* kotransfiziert wurden ist eine extra Bande zu sehen. Als zusätzliche Kontrolle diente CG4420, ein weiteres Protein, das in dem Screen identifiziert wurde. Die Größe ist anhand des unsauber gelaufenen Gels nicht exakt zu ermitteln.

Diese Zelllinien wurden auch auf eine Expression von *Bazooka* untersucht. Es wurde ein Westernblot angefertigt und mit dem *Bazooka* Antikörper getestet. Auch hier kann man eindeutig erkennen, daß *Bazooka* verstärkt in den Zellen nachgewiesen werden kann, die mit *Bazooka* transfiziert wurden (Abb. 3-17). Auf diese Weise konnte gezeigt werden, daß *Bazooka* und *FKBP59* erfolgreich in die Schneiderzellen transfiziert wurden. Nun sollten

Antikörperfärbungen in Schneiderzellen gegen Bazooka und FKBP59 durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob die Proteine in den Schneiderzellen kolokalisieren.

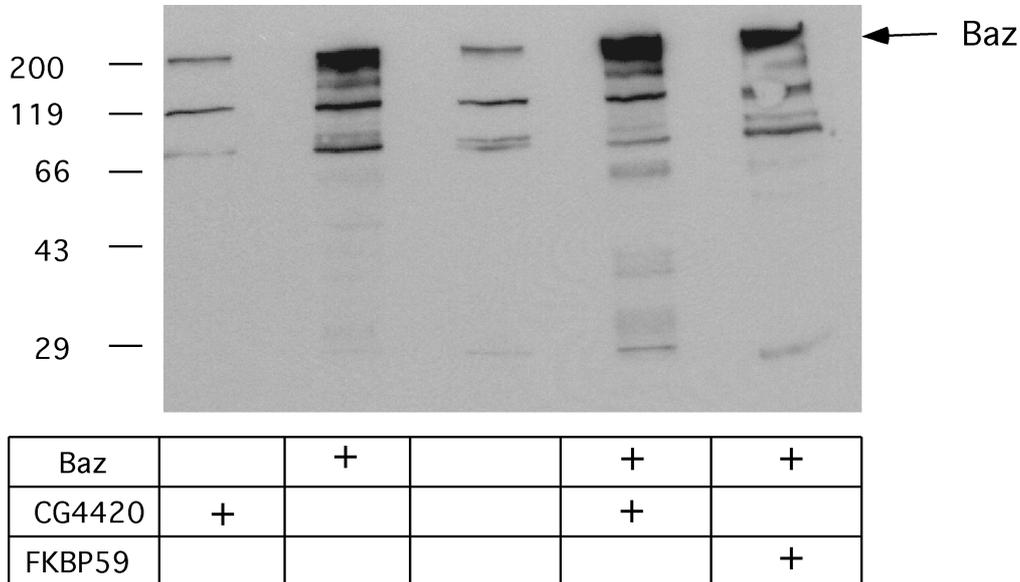


Abbildung 3-17: Schneiderzellextrakte von Zelllinien, die mit verschiedenen DNAs kotransfiziert wurden. Der Blot wurde mit dem Kaninchen α -Bazooka Antikörper getestet. Die Zelllinien, die mit Bazooka transfiziert wurden, weisen eine wesentlich stärkere Bazookaexpression auf. Als zusätzliche Kontrolle diente CG4420, ein weiteres Protein, das in dem Screen identifiziert wurde.

3.2.3 Bazooka und FKBP59 kolokalisieren in Schneiderzellen

Nachdem gezeigt werden konnte, daß die Transfektion der Schneiderzellen mit Baz und FKBP59 erfolgreich war, sollte überprüft werden, ob die beiden Proteine in diesem Zellsystem interagieren. Eine Antikörperfärbung gegen Bazooka und FKBP59 zeigte eine klare Kolokalisation der beiden Proteine, besonders im Bereich des Zellkortex und der Zellfortsätze (Abb. 3-18).

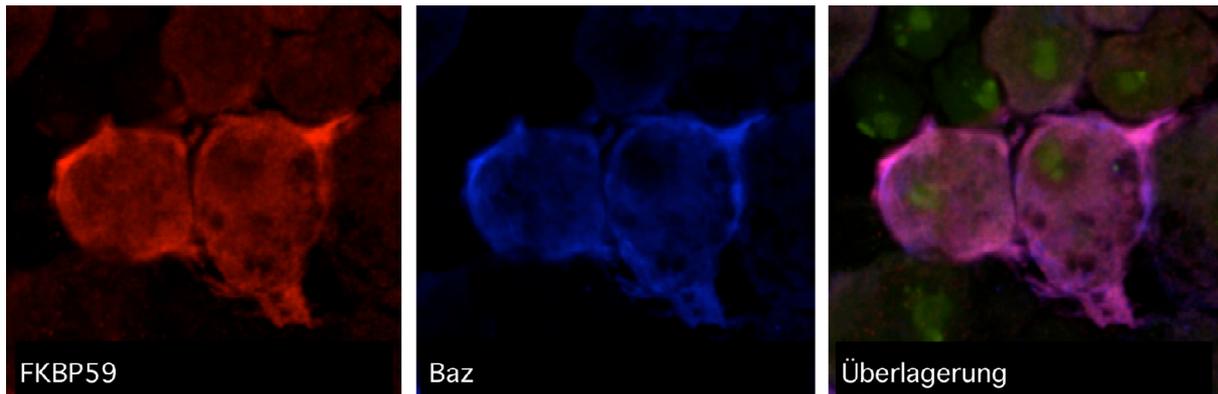


Abbildung 3-18: Bazooka und FKBP59 kolokalisieren in Schneiderzellen. FKBP (rot) und Bazooka (blau) kolokalisieren besonders im Zellkortex und in den Zellfortsätzen von Schneiderzellen. In der Überlagerung sind dies die lila Regionen.

3.2.4 Embryonales Expressionsmuster von FKBP 59 im Embryo

Eine RNA in-situ Hybridisierung zeigte im Stadium der Zellularisierung eine ubiquitäre Verteilung der RNA, eine stärkere Konzentration entlang der Zellularisierungsfront war jedoch zu erkennen (Abb. 3-19 A). Im Stadium der Keimstreifstreckung zeigte sich eine ubiquitäre Verteilung der RNA (Abb. 3-19 B). In späteren Stadien konnte die RNA in den Oenozyten nachgewiesen werden (Abb. 3-19 C).

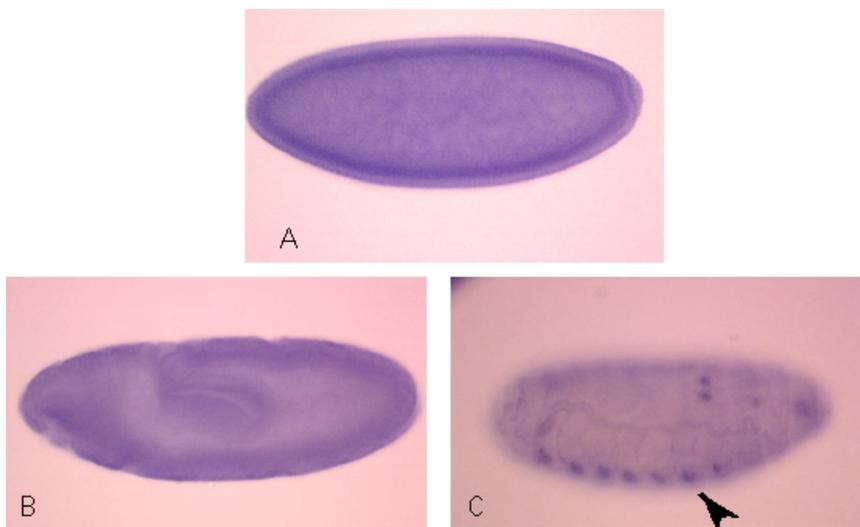


Abbildung 3-19: RNA In-Situ Hybridisierung. A) Embryo im Stadium der Zellularisierung. Die RNA ist ubiquitär verteilt, eine stärkere Konzentration entlang der Zellularisierungsfront ist zu erkennen. B) Im Stadium des ausgestreckten Keimstreifes ist die RNA ubiquitär verteilt. C) In späteren Stadien ist die RNA gut in den Oenozyten zu erkennen. Anterior ist links.

Auch mit Antikörperfärbungen an Embryonen konnte FKBP59 in den Oenozyten nachgewiesen werden. Der Antikörper erkennt klar die Oenozyten in der späteren Embryogenese (Abb. 3-20). In früheren Stadien konnte kein spezifisches Expressionsmuster

erkannt werden und auch eine Kolokalisation mit Bazooka in Epithelzellen oder Neuroblasten konnte nicht nachgewiesen werden, da das Signal zu schwach war.

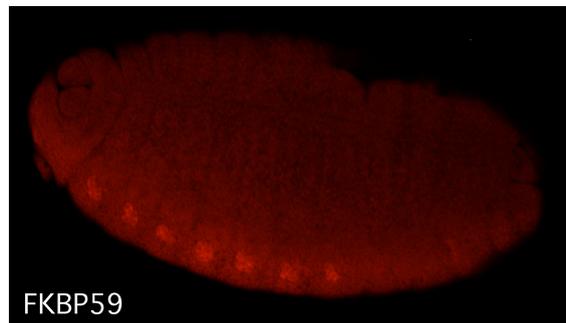


Abbildung 3-20: Der FKBP59 Antikörper (rot) erkennt die 7 Oenozyten Komplexe. Embryo im Stadium 18 (Campos-Ortega und Hartenstein, 1997). Anterior ist links.

3.2.5 Erzeugung von FKBP59 Mutanten

Anhand einer P-Element Insertion, die nur 39 bp 5' des Startkodons liegt, sollten mutante Fliegen generiert werden. Um dies zu erreichen, mobilisiert man das P-Element und generiert Revertanten. Nach der Mobilisierung des P-Elements kommt es in ca. 2-5 % der Fälle zur ungenauen Exzision des P-Elements. Das heißt, daß mit dem P-Element, welches durch Einkreuzen der Transposase mobilisiert wird, flankierende DNA herausgenommen wird. Es kann sich hier um DNA, die 3', 5' oder 3' und 5' des P-Elements liegt, handeln. Von den 100 generierten Revertanten konnte gezeigt werden, daß in 4 Revertanten DNA Sequenzen 5' des P-Elements deletiert waren und in 5 Revertanten DNA Sequenzen 3' des P-Elements deletiert waren. Die so erzeugten Deletionen reichen normalerweise über ein paar Basenpaaren bis zu einigen Kilobasen. Die Hoffnung besteht, auf diese Weise eine Nullmutante zu erzeugen, der das Startkodon oder das gesamte Gen fehlt. Dies scheint besonders in diesem Fall sehr wahrscheinlich, da das Startkodon nur 39 bp downstream des P-Elements liegt. Alle so erzeugten Revertanten, die 3' flankierende DNA deletiert hatten, wiesen dieselben Phänotypen auf, die auch schon in dem Stamm mit der original P-Element Insertion zu beobachten waren.

3.2.6 Potentielle FKBP59 Mutanten zeigen frühe embryonale Entwicklungsdefekte

Alle Revertanten, die original P-Element Insertion, sowie eine Deletion dieser Region zeigten in Antikörperfärbungen den gleichen frühen Defekt in der Embryonalentwicklung. 36% der Embryonen zeigten, ähnlich wie bei den *Pten* Keimbahnklonen, Defekte im Zyklus der Kernteilungen. Die Wanderung der Kerne und die Bildung der Polzellen waren jedoch

nicht betroffen. Zusätzlich zu den Zyklusdefekten konnten jedoch Defekte in der Epithelstruktur beobachtet werden. So sieht man in manchen Regionen, daß die gleichmäßige Epithelstruktur verloren geht und kein reguläres Epithel mit säulenförmigen Zellen gebildet wird. Die Zellen sind rundlich und ungleichmäßig verteilt. Der FKBP Antikörper zeigt eine starke Hintergrundfärbung in Embryonen. Diese Hintergrundfärbung ermöglicht es, die Zellumrisse zu erkennen (Abb. 3-21).

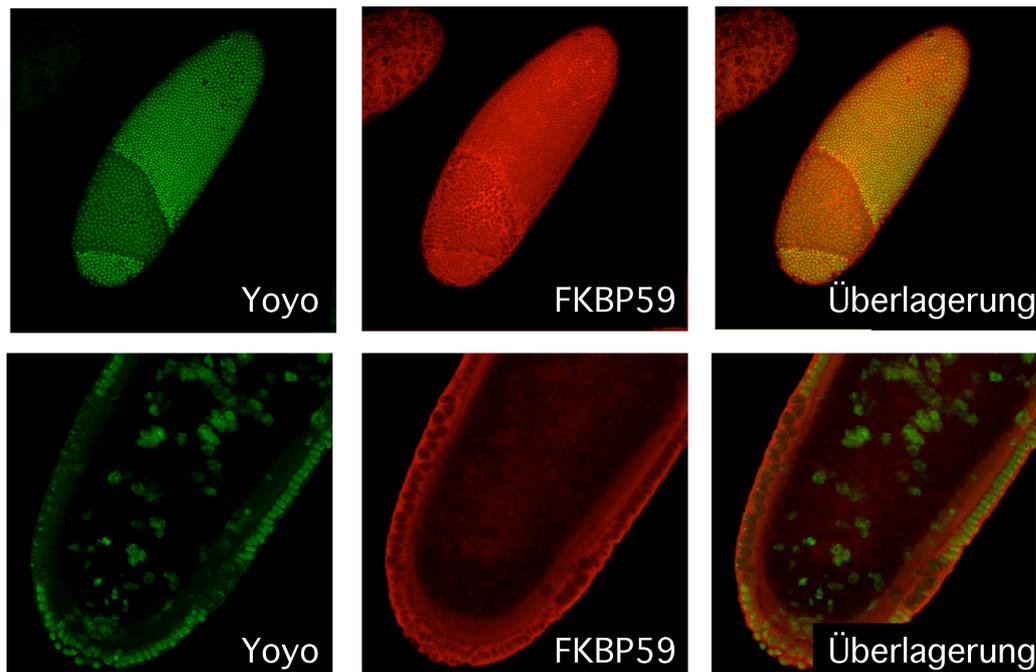


Abbildung 3-21: Potentielle FKBP Mutanten weisen Zyklusdefekte und Defekte in der Bildung des Epithels auf. Die Wanderung der Kerne und die Ausbildung der Polzellen ist jedoch normal. Färbungen mit dem FKBP Antikörper geben einen starken Hintergrund, der die Zellumrisse erkennen läßt. Die FKBP Antikörperfärbung soll hier nur die Struktur des Epithels verdeutlichen.

3.2.7 Analyse der Revertanten

Nachdem Revertanten des Stammes $y[1] w[67c23]; P\{w^{+mC}=lacW\}FKBP59^{k09010}/CyO$ (Bloomington #10848) generiert wurden (Wodarz, A, unpublished), sollten diese genauer charakterisiert werden. Hierzu wurden zunächst Primer gesucht, die entweder 5' (Primer A) oder 3' (Primer B) des P-Elements binden. Das P-Element besitzt an seinen beiden Enden inverted Repeats, von denen ein Teil als Primer benutzt werden kann, um flankierende DNA Sequenzen zu amplifizieren (Primer UP). Bei einer exakten Exzision des P-Elements würde man ein PCR Produkt der Primer A und B erwarten. Bei einer ungenauen Exzision würde man auch ein PCR Produkt des Primers UP mit A oder B erwarten (Abb. 3-22).

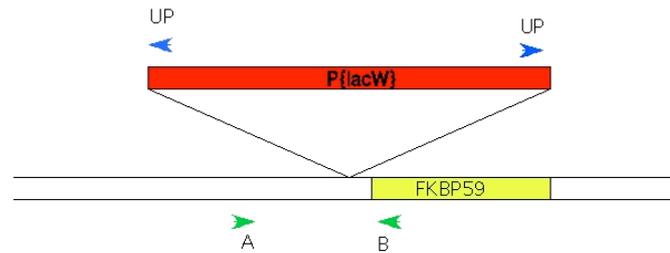


Abbildung 3-22: PCR Analyse der Revertanten. Bei einer exakten Exzision des P-Elements erwartet man ein Amplifikationsprodukt der Primer A+B. Hat keine Exzision stattgefunden erwartet man 3 Amplifikationsprodukte: A+UP, B+UP und A+B. Eine unpräzise Exzision würde 2 Amplifikationsprodukte zeigen: A+B und A+UP oder B+UP.

Wir suchten nach Revertanten, in denen das 5' Ende des P-Elements vorhanden war und das 3'-Ende fehlte, da hier flankierende DNA in Richtung des Startkodons von FKBP59 verloren gegangen sein könnte. Die Analyse ergab, folgendes:

5'-Ende	3'-Ende	Letal	Anzahl
+	+	Ja	15
+	-	Ja	5
-	+	Ja	4
-	-	Ja	46
-	-	Nein	24

Tabelle 3-2: Verschiedene Klassen an Revertanten. + bedeutet, daß diese Ende des P-Elements nicht mobilisiert wurde, - das Gegenteil. Weiterhin ist angegeben ob die entsprechenden Revertanten letal sind oder nicht und die Anzahl der Revertanten in den verschiedenen Klassen.

In der für uns interessanten Klasse befinden sich 5 Revertanten, die weitergehend untersucht wurden. Hierzu sollten DNA Segmente mittels PCR amplifiziert werden, um die Exzisionspunkte genauer zu bestimmen. Eine Schwierigkeit besteht darin, daß die Fliegen, aus denen die DNA stammte, heterozygot für die P-Element Insertion waren und dadurch immer eine wild-typ Kopie der DNA vorhanden ist und man ein PCR-Amplifikat erhält. Es wurden Primerpaare gefunden, die Segmente innerhalb des P-Elements amplifizieren, um zu sehen, wieviel des P-Elements herausgesprungen war. Das Ergebnis dieser Untersuchung brachte keine näheren Erkenntnisse, da in allen Fällen Banden vorhanden waren. Die Banden 2-4 spiegeln Amplifikationsprodukte innerhalb des P-Elements wieder (Abb. 3-22, Primerpaare A-C, Abbildung 3-23). Die Größen entsprechen den erwarteten. Da das Primerpaar C allerdings hinter dem w^+ Gen des P-Elements liegt, dürfte diese Bande eigentlich nicht vorhanden sein, da das w^+ Gen als Selektionsmarker für die Revertanten benutzt wurde. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, wie sich dieses Ergebnis erklären läßt. Ein weiterer Ansatz war die Überprüfung von Primerpaaren, in denen

der eine Primer 5' des P-Elements und der andere 3' des P-Elements lag. Hier war die Hoffnung, daß zusätzlich zu der Wildtypbande eine weitere Bande amplifiziert wird, die länger ist als die wild-typ Bande, da noch Reste des P-Elements vorhanden sind (Abb. 3-23, Banden 5-9, Abb. 3-24 Primer 1+3, 4, 5, 6 und 7).

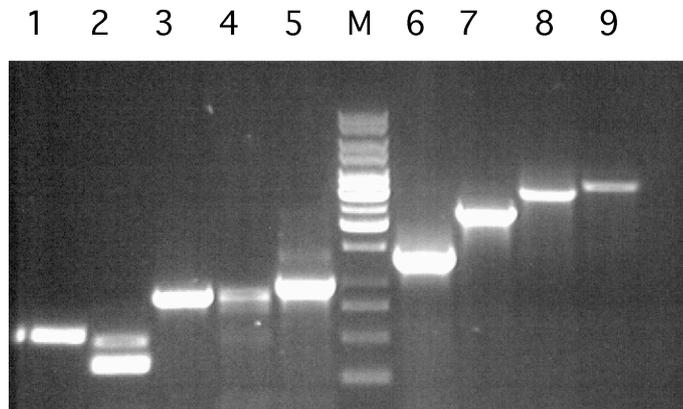


Abbildung 3-23: Analyse der Revertante 1: Bahn 1 zeigt die Primerkombination 1 bis 2 und dient als Kontrolle. Bahnen 2 bis 4 zeigen die Paare A-C. Bahnen 5-9 zeigen die Primerpaare 1 bis 3,4,5,6 und 7 (siehe Abb. 3-24). Die Größen der Banden entsprechen in allen Fällen den erwarteten. DNA aus Fliegen der Revertante 1.

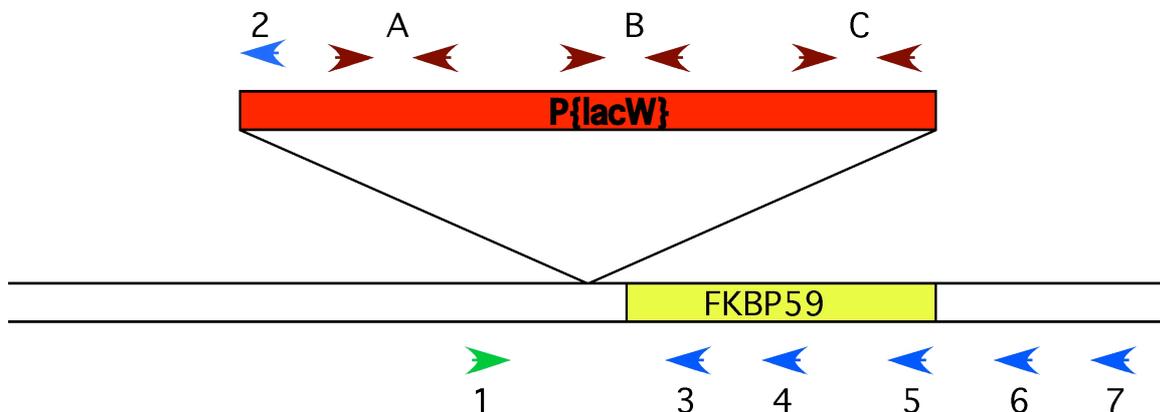


Abbildung 3-24: Primerauswahl zur näheren Identifizierung der Revertanten. Die Primerpaare A-C wurden benutzt um zu überprüfen, ob bestimmte Teile des P-Elements noch vorhanden sind, um zu sehen wieviel des P-Elements mobilisiert wurde. Die Primerkombinationen zwischen 1 und 3-7 sollten zeigen wieviel der flankierenden DNA zusammen mit dem P-Element exzisiert wurde.

Als dritter Versuch wurden Southernblots angefertigt. Das wild-typ Chromosom sollte hier Banden von 1200 bp und 2800 bp aufweisen, was auch bestätigt wurde. Die P-Elementinsertion sollte zusätzlich eine Bande von 4500 bp und 2500 bp aufweisen, was sie auch tat. Das 2500 bp Fragment wird nur erkannt, wenn die 300 bp nach der P-Elementinsertion vorhanden sind, die durch die Sonde abgedeckt werden. Da diese Bande in keiner der Revertanten zu beobachten ist, muß davon ausgegangen werden, daß mindesten

300 bp mit dem P-Element aus dem Chromosom gesprungen sind. Dies beinhaltet auch das Startkodon von FKBP (Abb. 3-25 und 3-26).

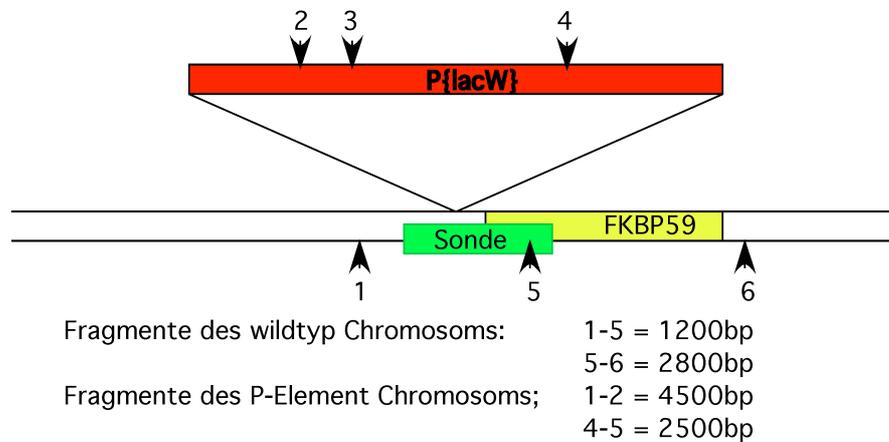


Abbildung 3-25: Fragmente die von der Sonde in heterozygoten Fliegen erkannt werden. Die DNA wurde in diesem Falle mit EcoRI geschnitten. Die Pfeilspitzen markieren die Schnittstellen.

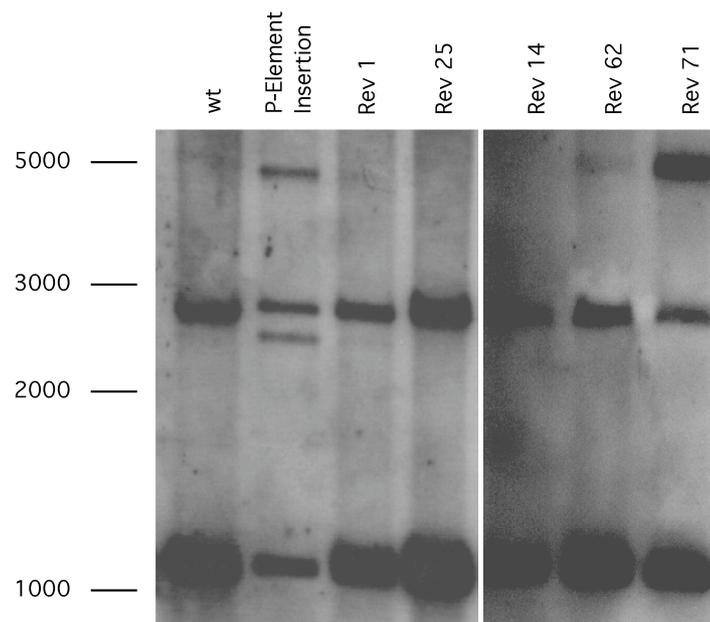


Abbildung 3-26: Southernblot von verschiedenen Fliegenstämmen, deren DNA mit EcoRI verdaut wurde. Es ist zu erkennen, daß nur der Stamm mit der original P-Elementinsertion die 2500 bp Bande aufweist.

Das gleiche Experiment wurde noch mit Bgl II, einem zweiten Restriktionsenzym durchgeführt. Auch hier konnte bestätigt werden, daß eine für das P-Element typische Bande von 5000 bp in allen Revertanten verschwunden ist. Dies würde bedeuten, daß in allen Revertanten mindestens 425 bp 3' der P-Elementinsertion deletiert sind, was dem Teil der Sonde entspricht, welches 3' der Insertion liegt (Abb. 3-27, 3-28).

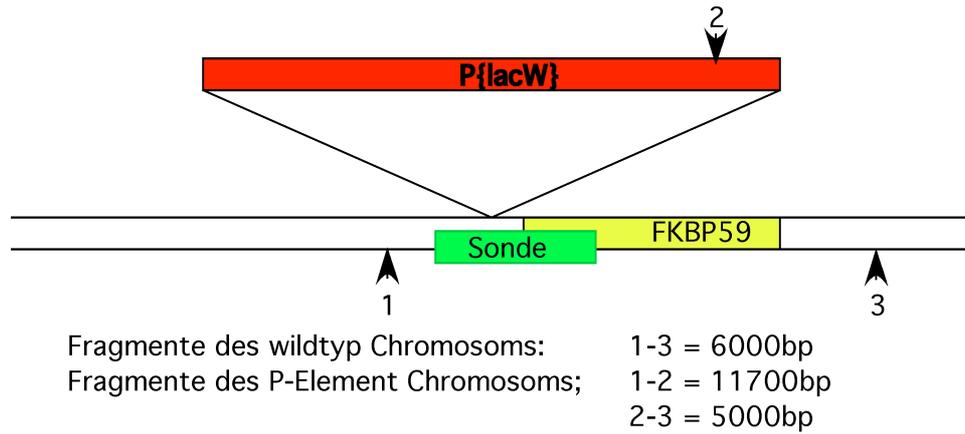


Abbildung 3-27: Fragmente die von der Sonde in heterozygoten Fliegen erkannt werden. Die DNA wurde in diesem Falle mit BglII geschnitten. Die Pfeilspitzen markieren die Schnittstellen.

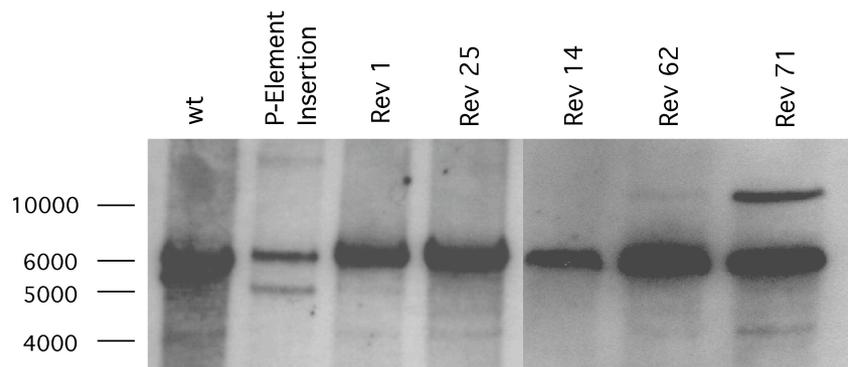


Abbildung 3-28: Southernblot von verschiedenen Fliegenstämmen, deren DNA mit BglII verdaut wurde. Es ist zu erkennen, daß nur der Stamm mit der original P-Elementinsertion die 5000 bp Bande aufweist.

Die Bande von ca. 10000 bp Größe der Revertante 71 könnte auf einer partiellen Deletion des P-Elements und einer späteren BglII Schnittstelle beruhen. Hierzu läßt sich durch den Southernblot alleine allerdings keine nähere Aussage treffen. Durch diese Versuchsreihe konnte gezeigt werden, daß das erste Startkodon von FKBP59 in allen Revertanten deletiert wurde. Eine genaue Aussage über die Bruchpunkte in der DNA kann so jedoch nicht getroffen werden.

Um eine Aussage der genauen Bruchpunkte machen zu können, wäre es von Vorteil, homozygotes DNA Material zu haben. Hierzu wurde ein Balancerchromosom eingekreuzt der einen lacZ-Marker trägt. Über eine Färbereaktion gegen β -Galactosidase können so homozygote P-Element Insertionen im Embryo identifiziert werden. Anschließend kann aus diesen Embryonen DNA gewonnen werden. Hier wurde die Chelex-Methode zur DNA Isolierung benutzt.

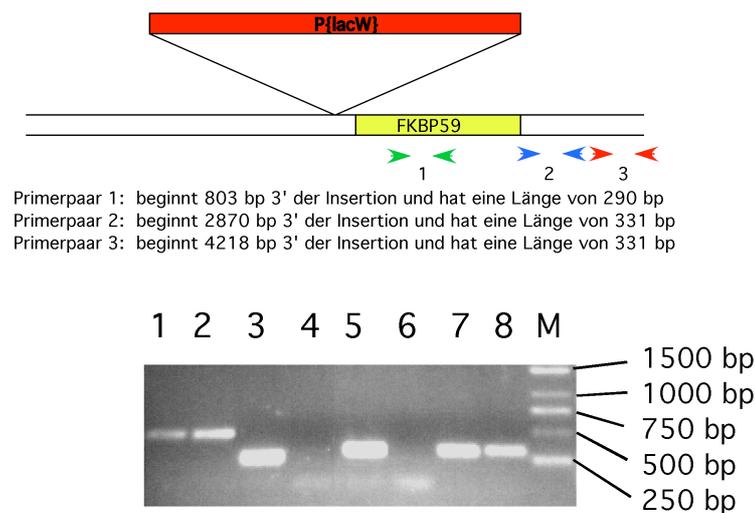


Abbildung 3-29: PCR-Amplifikationen der DNA von Revertante 71 mit verschiedenen Primerpaaren. In den ungeraden Spuren befindet sich die DNA heterozygoter Embryonen, in den geraden die DNA homozygoter Embryonen. In Spur 8 läßt sich ein DNA Fragment in homozygoten Embryonen nachweisen, denen das wild-typ Allel fehlt. Spuren 1+2 = P-Element Insertion; Spuren 3+4 = Primerpaar 1; Spuren 5+6 = Primerpaar 2; Spuren 7+8 = Primerpaar 3.

Diese kann man dann einiger PCR-Analysen unterziehen, um die Bruchpunkte näher einzugrenzen. Dies konnte für die Revertante 71 erfolgreich durchgeführt werden. Wie bereits im Southernblot gesehen, ist mindestens der Bereich der Sonde der 3' der P-Element Insertion liegt deletiert (dies entspricht 425 bp). Es wurden nun PCR-Analysen, an für die Insertion homozygoten Embryonen, durchgeführt. Hier zeigte sich, daß im Falle von Revertante 71, DNA, die ca. 4200 bp 3' der Insertion liegt, vorhanden ist. DNA die nur ca. 2800 bp 3' liegt jedoch abwesend ist. Das heißt, der Bruchpunkt liegt zwischen 2800 bp und 4200 bp 3' der Insertion (Abb. 3-29). Zusammen mit der ca.10 Kb großen Bande im Southernblot würde dies bedeuten das mindestens 6 Kb des P-Elements aus dem Chromosom zusammen mit bis zu 4.2 Kb der flankierenden DNA gesprungen sind. Es sollte jetzt möglich

sein, ein gezieltes PCR Fragment dieser Region zu erhalten und dies sequenzieren zu lassen. Die anderen Revertanten konnten nicht weiter eingegrenzt werden, da keine DNA amplifiziert werden konnte. Dies könnte darauf hindeuten, daß mehr als 4200 Basenpaare 3' der Insertion deletiert wurden. Um dies zu Überprüfen müssen weitere Primerpaare generiert werden, die weiter downstream liegen. Bei der Revertante 71 ist FKBP59 handelt es sich also um eine Mutante, der die komplette Sequenz von FKBP59 fehlt. Es gilt nun diese Mutante zu analysieren.

3.2.8 Erzeugung von FKBP59 überexprimierenden Fliegen

Der Antikörper erkennt zwar FKBP59 in den Oenozyten, aber es lassen sich keine konkreten Aussagen über die subzelluläre Verteilung von FKBP machen. Auch in den frühen Stadien ist nur eine unspezifische Färbung zu sehen. Es sollte getestet werden ob FKBP nachgewiesen werden kann, wenn es überexprimiert wird. Aus diesem Grund wurden Fliegen generiert, die FKBP unter einem UAS Promotor überexprimieren.

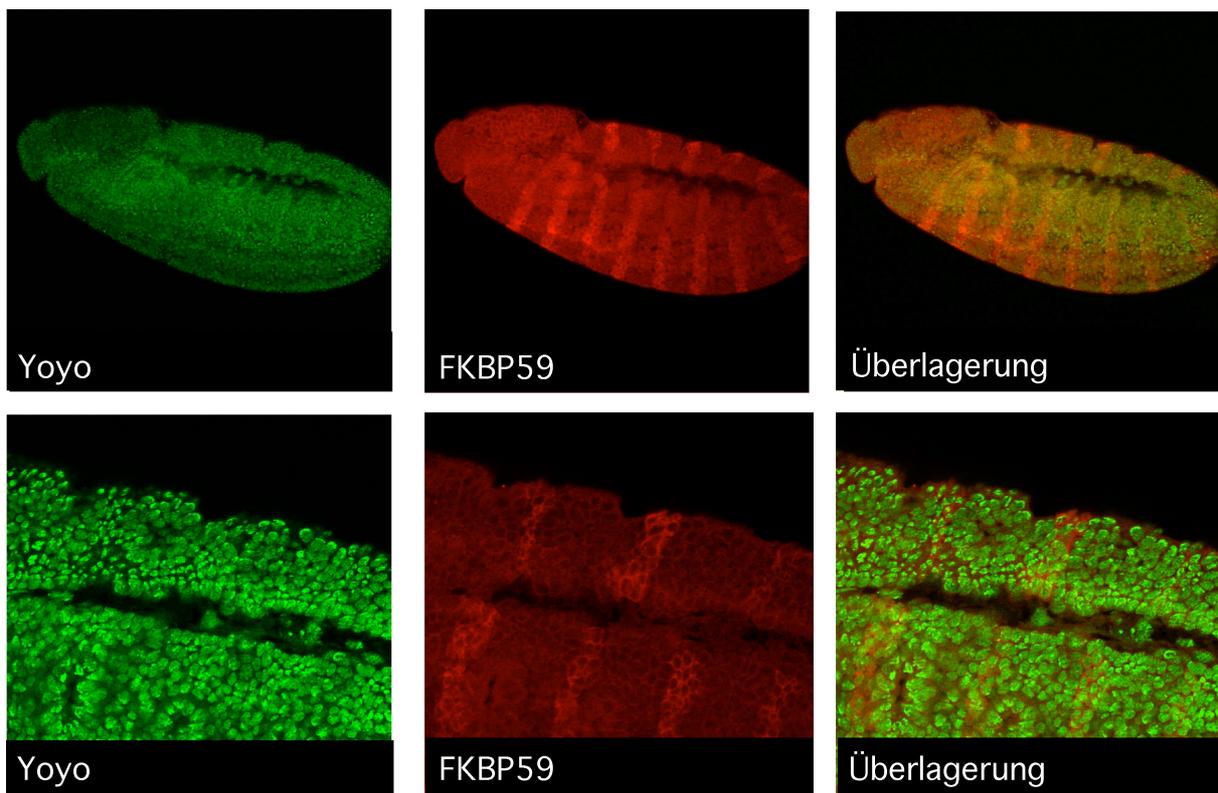


Abbildung 3-30: Überexpression von FKBP mittels einem engrailed Treiber. Eine Antikörperfärbung mit dem anti-FKBP Antikörper (rot) zeigt das typische engrailed Muster. Embryonen befinden sich im Stadium 12, Anterior ist links. Embryonen stammen aus folgender Kreuzung: UAS FKBP X eng G4.

Diese Fliegen wurden dann mit engrailed GAL4 Fliegen gekreuzt, um FKBP in einem gestreiften engrailed Muster zu exprimieren. Diese Embryonen exprimierten FKBP in den typischen engrailed Streifen (Abb. 3-30). Hier konnte weiterhin gezeigt werden, daß FKBP mit Bazooka am Kortex der Zelle kolokalisiert, aber FKBP nicht auf Bereiche mit Bazooka Expression limitiert ist. Mit verschiedenen Treibern kann nun FKBP in verschiedensten Bereichen des Embryos überexprimiert werden und es kann untersucht werden, ob eine Überexpression von FKBP59 einen Einfluß auf andere Proteine oder auf die Zellpolarität hat.

3.3 Die Interaktion von Bazooka und CG4420

3.3.1 CG4420 bindet an Bazooka im Hefe-Zwei-Hybrid System

Im Hefe-Zwei-Hybrid Screen wurden 2 Klone gefunden, die der C-terminalen Region eines vorhergesagten Proteins entsprechen. Es handelt sich um das Gen mit der Flybasekennung CG4420.

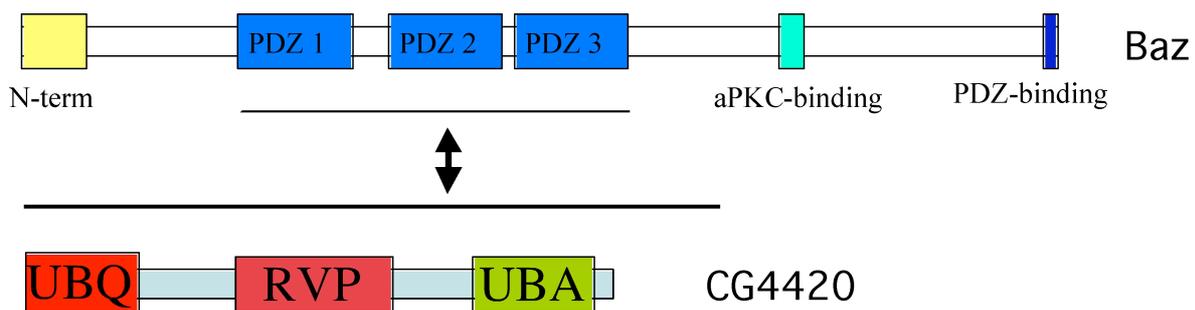


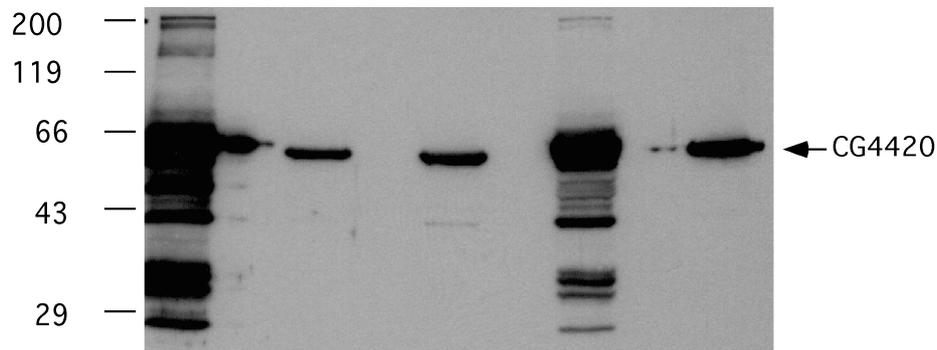
Abbildung 3-31: Die Interaktion von CG4420 und Bazooka. Die 3 PDZ Domänen von Bazooka zeigten eine Interaktion mit CG4420. Der Klon umfasste die gesamte kodierende Sequenz von CG4420 bis auf das Startkodon und ragte bis in die vorhergesagte 3'UTR von CG4420 hinein. Gezeigt sind auch die Domänen der Proteine: UBQ = Ubiquitin Domäne, UBA = Ubiquitin Associated Domäne, RVP = Retroviral Aspartyl Protease Domäne.

Der gefundene Klon ragte bis in die vorhergesagte 3'UTR von CG4420. Auch hier wurde versucht die Interaktion mit Bazooka auf einzelne PDZ Domänen von Bazooka einzuschränken, doch dies war nicht möglich. Die Interaktion konnte nur gezeigt werden, wenn alle 3 PDZ Domänen von Baz vorhanden waren (Abb. 3-31).

3.3.2 Transfektion von Drosophila S2-Zellen mit CG4420

Nachdem ein Antikörper gegen CG4420 generiert wurde (von Stein, 2001), wurden Schneiderzellen mit *CG4420* und *Baz* kotransfiziert. Der anschließende Western-blot zeigte, daß in den Schneiderzellextrakten, die mit *CG4420* transfiziert waren, eine erhöhte Menge

des Proteins vorhanden war (Abb. 3-32). Dies bedeutet, daß die Transfektion der Schneiderzellen erfolgreich war und der Antikörper spezifisch für CG4420 ist.



Baz		+		+	+
CG4420	+			+	
FKBP59					+

Abbildung 3-32: Transfektion von *Drosophila* Schneiderzellen. In Zellen die mit *CG4420* transfiziert wurden, läßt sich eine deutlich erhöhte Menge *CG4420* nachweisen. Die einzelnen Banden zeigen Extrakte von Schneiderzellen, die mit unterschiedlichen DNA-Kombinationen transfiziert wurden. Als Antikörper wurde der rabbit α -*CG4420* benutzt.

3.3.3 CG4420 und Bazooka kolokalisieren in Schneiderzellen

Als nächstes sollte überprüft werden, ob Bazooka und *CG4420* in diesen Zellen kolokalisieren. Hierzu wurden *Drosophila* Schneiderzellen mit den beiden Proteinen kotransfiziert und anschließend wurde eine Antikörperfärbung durchgeführt. Hier zeigte sich eine sehr schöne Kolokalisation der beiden Proteine, besonders am Kortex der Zelle und in den Zellfortsätzen (Abb. 3-33). Die anschließende Antikörperfärbung an Embryonen lieferte keine klaren Ergebnisse. Es zeigte sich eine eher diffuse und schwache Färbung.

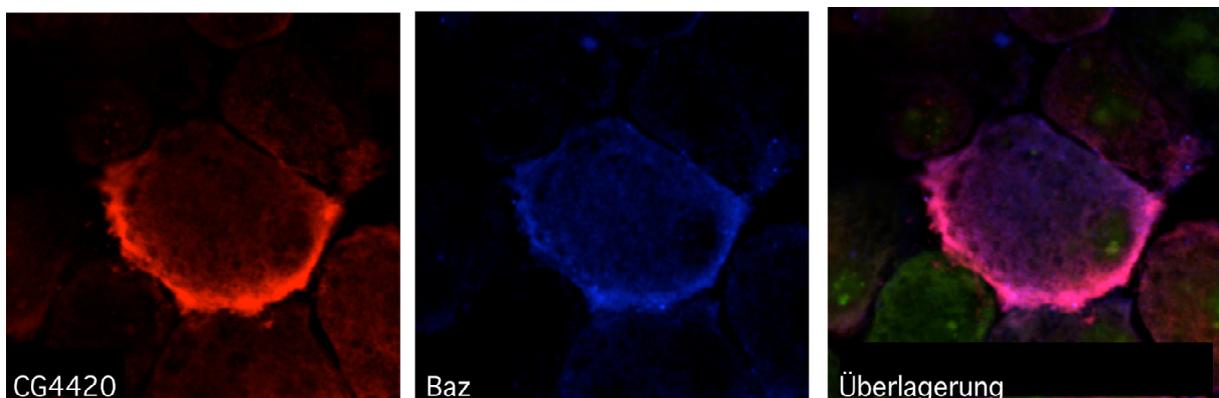


Abbildung 3-33: Bazooka und *CG4420* kolokalisieren in *Drosophila* Schneiderzellen. Eine Kolokalisation ist besonders am Zellkortex und in den Zellfortsätzen zu beobachten. Bazooka ist blau, *CG4420* rot.

3.3.4 Erzeugung von CG4420 überexprimierenden Fliegen

Auch hier wurden, wie schon für FKBP59, Fliegen generiert, die CG4420 überexprimieren sollten, um die Verteilung von CG4420 besser sichtbar zu machen und eventuelle Effekte einer Überexpression zu analysieren. Um zu überprüfen, ob CG4420 in den generierten Stämmen überexprimiert wird, wurden sie mit einem engrailed-Gal4 Treiberstamm gekreuzt. Die Embryonen, die aus dieser Kreuzung hervorgehen, zeigen die engrailed-spezifische streifenartige Expression von CG4420 (Abb. 3-34). CG4420 wird ubiquitär in der Zelle exprimiert. CG4420 lokalisiert auch an Stellen an denen Bazooka lokalisiert, ist aber nicht auf diese beschränkt.

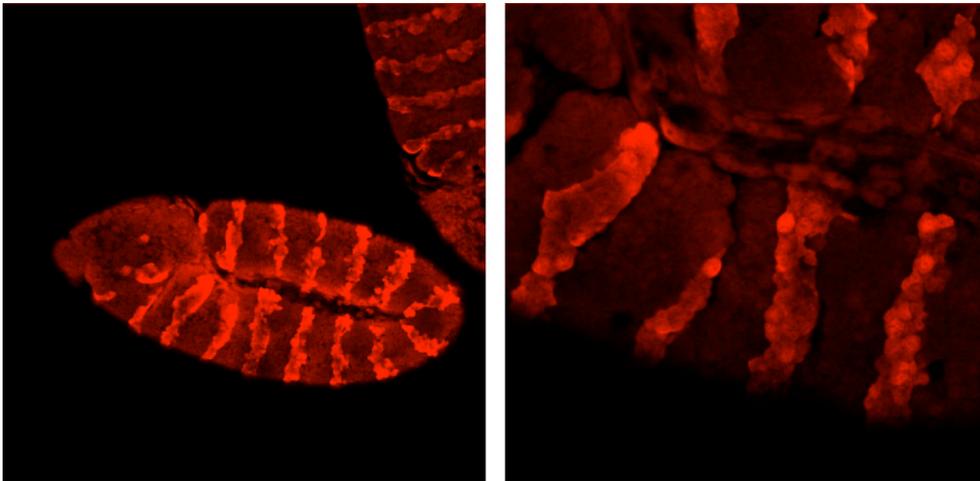


Abbildung 3-34: Überexpressionsmuster von CG4420 mittels einem en::Gal4 Treiberstamm. Die Embryonen stammen aus einer Kreuzung von en::Gal4 Fliegen mit UAS-CG4420 Fliegen. Für die Färbung wurde der α -CG4420 Antikörper benutzt. Das typische engrailed Muster ist deutlich zu erkennen. Anterior ist links.

Der nächste Schritt ist nun die UAS Stämme mit unterschiedlichen Treiberstämmen zu kreuzen, um zu sehen ob sich Aussagen über die subzelluläre Verteilung des Proteins machen lassen oder ob Auswirkungen einer Überexpression zu erkennen sind.

3.3.5 Erste Hinweise einer Bindung von Ubiquitin an CG4420

Es konnte gezeigt werden, daß das Hefehomolog von CG4420 (vsm1 oder DDI1) über seine UBA Domäne Ubiquitin direkt bindet (Bertolaet et al., 2001a; Bertolaet et al., 2001b). Es sollte überprüft werden, ob dies auch für CG4420 in *Drosophila* der Fall ist. Es wurden verschiedene GST gekoppelten Proteine induziert und auf eine Bindung mit Ubiquitin getestet (Abb. 3-35).

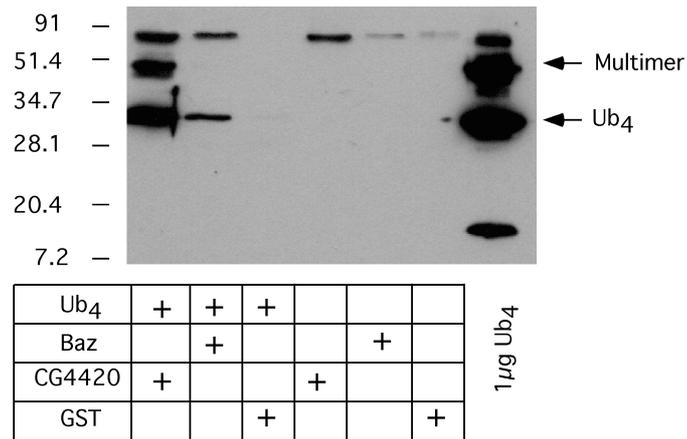


Abbildung 3-35: Überprüfung der Bindung von Ubiquitin an CG4420.

So konnte gezeigt werden, daß Ubiquitin an CG4420 in einem GST-Binde Assay besonders stark bindet. Es ist bekannt, daß Tetraubiquitin (Ub₄), welches hier benutzt wurde, Multimere bildet, wenn es erhitzt wird. Dies erklärt die größeren Proteinkomplexe um 50 kD, die auf dem Blot zu sehen sind. Auch bei Bazooka ist eine kleine Bande zu sehen, es könnte jedoch sein, daß hier Material aus der ersten Bande diffundiert ist.

4 Diskussion

Der PAR/aPKC Komplex spielt eine entscheidende Rolle bei der Etablierung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität. Mit seinen 3 PDZ Domänen könnte Bazooka eine zentrale Bedeutung als Gerüstprotein innehaben. Aus diesem Grund wurden die 3 PDZ Domänen von Bazooka als Köder in einem Hefe-Zwei-Hybrid Screen verwendet, um neue Interaktionspartner von Bazooka zu finden. 3 potentielle Interaktionspartner von Bazooka konnten auf diese Weise identifiziert werden: PTEN (Ramrath, ; von Stein et al., 2005), CG4420 und FKBP59. Von besonderer Bedeutung ist PTEN. PTEN ist eines der am häufigsten mutierten Gene in einer Vielzahl von Tumoren. Es ist ein Antagonist zur PI3 Kinase und dephosphoryliert Phosphatidylinositol (3,4,5) Trisphosphat (PIP-3). Diese Interaktion könnte eine Verbindung des PAR/aPKC Komplexes mit dem PI3 Kinase Signalweg darstellen, der in vielen Aspekten der Zellpolarität eine Rolle spielt. CG4420, das *Drosophila* Homolog zu vsm1/DDI1 der Hefe, spielt eine potentielle Rolle im Vesikeltransport, in der Zellzykluskontrolle und im Abbau von Proteinen. Dies könnte Aufschluß darüber geben, wie Bazooka polar angereichert und später in Teilen wieder abgebaut wird. FKBP59 könnte eine Verbindung des PAR/aPKC Komplexes zum Zellzyklus und zum PI3 Kinase Signalweg über die TOR Kinase darstellen. Auch der gerichtete Transport von Bazooka könnte über FKBP59 vermittelt werden, da es über Dynein mit den Mikrotubuli assoziiert.

Die drei in dem Hefe-Zwei-Hybrid System identifizierten potentiellen Interaktionspartner könnten einige der unbeantworteten Fragen bezüglich der Organisation, Lokalisation und Funktionsweise des PAR/aPKC Komplexes beantworten.

4.1 PTEN und der PI3 Kinase Signalweg

PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10), auch bekannt als MMAC1 (mutated in multiple advanced cancers) oder TEP1 (TGF β -regulated and epithelial cell-enriched phosphatase) ist nach p53 das am häufigsten mutierte Tumorsuppressor Gen (Li und Sun, 1997; Li et al., 1997; Steck et al., 1997). PTEN liegt im Humangenom auf dem Chromosom 10q23, einer Region, von der bekannt ist, daß sie in vielen Karzinomen ihre Heterozygotie verliert (Cantley und Neel, 1999). Somatische Mutationen in PTEN wurden in vielen Krebsarten identifiziert. Fast alle Krebsarten weisen Mutationen in mehreren Onkogenen auf, was darauf schließen läßt, daß Zellen diverse

parallele Mechanismen zur Verfügung stehen, um Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Zellproliferation, Zelltod und DNA Reparaturmechanismen zu kontrollieren. Es gibt verschiedene Hinweise, daß PTEN in einigen dieser Prozesse eine Rolle spielt.

PTEN ist in verschiedenen Tumorarten mutiert. Diese umfassen zum Beispiel Gliatumore, Endometrialtumore, Brustkrebs und auch einige Formen des Lungenkrebses. Es konnte gezeigt werden, daß PTEN in Glioblastomazellen einen G1 Zellzyklusarrest bewirkt, in anderen Karzinomen jedoch Apoptose auslöst (Furnari et al., 1998; Li und Sun, 1998; Myers et al., 1998). Zusätzlich zu Defekten, die auf somatische *Pten* Mutationen zurückzuführen sind, kann *Pten* auch schon in der Keimbahn mutiert sein. Dies kann in drei autosomal dominanten Erkrankungen resultieren: die Cowden Krankheit, die Duclos Krankheit und das Bannayan-Zonana Syndrom. All diese Krankheiten haben gemein, daß sie eine erhöhte Tumorfrequenz zur Folge haben. Ob sich die unterschiedlichen Symptome auf unterschiedliche Mutationen in *Pten* oder auf zusätzliche Mutationen zurückführen lassen, konnte noch nicht abschließend geklärt werden (Liaw et al., 1997; Marsh et al., 1998; Marsh et al., 1997; Nelen et al., 1997). Auch im Mausmodell konnten 3 Mutationen erzeugt werden, die alle homozygot letal waren und im heterozygoten Zustand unterschiedliche Tumoreffekte hatten (Di Cristofano et al., 1998; Podsypanina et al., 1999).

PTEN ist eine doppelspezifische Phosphatase, die Tyrosin und Serin/Threonin Reste dephosphorylieren kann. PTEN ist keine sehr effiziente Proteinphosphatase, das Hauptsubstrat von PTEN sind Lipide. Das Hauptsubstrat ist Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat (PIP-3), welches durch PTEN an der D3 Position des Inositolrings dephosphoryliert wird und so Phosphatidylinositol (4,5) Bisphosphat (PIP-2) gebildet wird. Der umgekehrte Prozeß wird über die PI3 Kinase gesteuert. PTEN ist also ein Antagonist der PI3 Kinase (Abb. 4-1) (Cantley und Neel, 1999; Leslie und Downes, 2002; Maehama und Dixon, 1999).

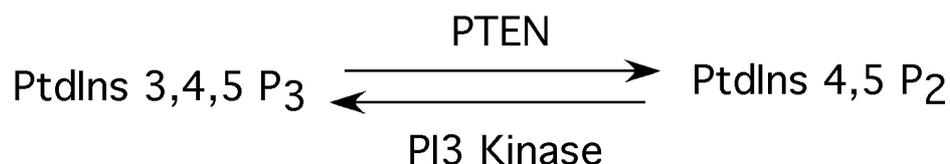


Abbildung 4-1: PTEN dephosphoryliert PIP-3 und generiert PIP-2.

Die PI3 Kinase ist eine Komponente des Insulinsignalweges. Über Insulin werden zwei Signalwege aktiviert: der Ras/MAPK Signalweg, welcher mit Zellproliferation in Verbindung gebracht wird, und der PI3 Kinase Signalweg, der Zellwachstum, Zellüberleben, Zelldifferenzierung und Stoffwechselprozesse steuert (Rameh und Cantley, 1999; White, 1998). Das von der PI3 Kinase produzierte PIP-3 rekrutiert verschiedene Proteine mit Pleckstrin-Homologie Domänen (PH Domänen) wie zum Beispiel Akt/PKB und PDK1 zur Plasmamembran. Akt/PKB wird dann über Phosphorylierung durch PDK1 aktiviert (Alessi, 2001; Chan et al., 1999; Meier und Hemmings, 1999; Toker und Newton, 2000). Über Akt/PKB und PDK1 wird dann eine weitere Kinase, die S6 Kinase (S6K) aktiviert, die Zellwachstum und Proteinsynthese reguliert (Lizcano et al., 2003).

Einen weiteren Hinweis auf den Einfluß des PI3 Kinase Signalweges und PTEN auf Zellpolarität konnte in motilen Zellen während der Migration gezeigt werden. Die Amöbe *Dictyostelium* polarisiert als Antwort auf einen chemischen Reiz und beginnt eine zielgerichtete Wanderung (Chemotaxis) in Richtung des Reizes. In dem Teil des Zellkortex, der dem Signal am nächsten liegt, kommt es zur lokalen Polymerisierung von F-Aktin und es werden Lamellipodien oder Pseudopodien gebildet. Die sogenannte Leading Edge entsteht. Das ist die Region der Zelle, in der die Lamellipodien vorstoßen und so die Richtung der Wanderung bestimmen. Das Entstehen der Leading Edge geht mit der Bildung von Myosin II einher. Am gegenüberliegenden Zellkortex werden die Uropoden zurückgebildet (Chung et al., 2001a; Katanaev, 2001; Parent und Devreotes, 1999; Sanchez-Madrid und del Pozo, 1999). Dieser Polarisierungsprozeß beruht auf einem Gradienten der Phosphoinositide. PI3 Kinase wird an der Leading Edge aktiviert und PIP-3 angereichert. Dies führt zur Aktivierung von Akt/PKB, welches *Dictyostelium* PAKa (p21-activated kinase) aktiviert, das für die Bildung von Myosin II benötigt wird (Chung et al., 2001b; Firtel und Chung, 2000; Haugh et al., 2000; Parent und Devreotes, 1999; Rickert et al., 2000). PTEN wird von der Leading Edge ausgeschlossen und lokalisiert an der lateralen und posterioren Seite der Zelle. Dort dephosphoryliert PTEN das schnell entlang der Membran diffundierende PIP-3. Auf diese Art und Weise wird erreicht, daß ein starker Gradient der Phosphoinositide gebildet wird und die Zelle zielgerichtet wandert (Funamoto et al., 2002; Iijima und Devreotes, 2002). Auch bei der Wanderung von Leukozyten wird über das Zusammenspiel von PI3 Kinase und PTEN ein solcher Gradient erzeugt (Servant et al., 2000; Wang et al., 2002). Ein erster Hinweis auf einen Zusammenhang des PI3 Kinase Signalweges und der Lokalisation des PAR/aPKC Komplexes konnte in Neuronen des Hippocampus in Zellkultur gezeigt werden.

Hier hängt die Lokalisierung von PAR-3 und PAR-6 in der Spitze des Neuriten von der aPKC und der PI3 Kinaseaktivität ab (Baker et al., 1993; Shi et al., 2003).

In *Drosophila* wurde der Einfluß von PTEN in larvalen und adulten Geweben in Bezug auf die Regulation von Wachstum und der Proliferation in Zusammenhang mit dem Insulinsignalweg untersucht. Eine Überexpression von *Dp110*, dem für die PI3 Kinase kodierenden Gen, in den Ommatidien der Fliege resultiert in vergrößerten Zellen und verstärkter Proliferation, während eine Überexpression einer dominant negativen Form das Gegenteil bewirkt (Leevers et al., 1996). Auch Mutationen im *Insulinrezeptor (Inr)* (Chen et al., 1996) oder in *chico*, dem ISR (Insulin Substrate Receptor) Homolog, resultieren in kleineren Zellen mit geringerer Proliferation (Bohni et al., 1999). Zellklone in Ommatidien, die für *Pten* mutant sind, weisen den gleichen Phänotyp auf, der zu erkennen ist, wenn die dominant negative Form von *Dp110* überexprimiert wird. Eine Überexpression von *PTEN* reduziert die Zellgröße und Zellanzahl. Dieser Phänotyp wird durch eine gleichzeitige Überexpression von *Dp110* unterdrückt (Huang et al., 1999). Der Phänotyp, der durch den Verlust von PTEN entsteht, wird durch eine Mutation in *Inr*, *chico* oder *Akt/PKB* unterdrückt. Eine Blockierung von PTEN resultiert in der Aktivierung von Akt/PKB (Clemens et al., 2000). PTEN kontrolliert Zellwachstum und Proliferation, indem es antagonistisch zur PI3 Kinase wirkt (Cantley und Neel, 1999). Die Steuerung des Wachstums von Zellen in *Drosophila* wird über Phosphoinositide reguliert, deren Konzentrationen von der Balance zwischen PTEN und PI3 Kinase abhängen (Gao et al., 2000; Goberdhan et al., 1999; Goberdhan und Wilson, 2002; Huang et al., 1999; Stocker und Hafen, 2000).

PTEN mutante Zellen weisen Defekte im Aktinzytoskelett auf. Die Zellen sind zwar noch in der Lage Aktinmikrofilamente zu bilden, die subzelluläre Regulation scheint jedoch abnormal zu sein (Goberdhan et al., 1999). Wie diese Defekte zustande kommen ist noch nicht geklärt. Eine erste Verbindung von PTEN zum Zytoskelett konnte in Säugerzellen nachgewiesen werden. PTEN interagiert mit den Proteinen MAGI-1b, MAGI2 und MAGI3 (Membrane-associated guanylate-kinase inverted) (Kotelevets et al., 2005; Wu et al., 2000a; Wu et al., 2000b). Dies sind Proteine der MAGUK Familie (Membrane-associated guanylate kinase homologs). Proteine der MAGUK Familie finden sich an den Adherens Junctions und dienen dort als Gerüstproteine, die eine wichtige Funktion in der Signaltransduktion innehaben, indem sie die Aktivität ihrer Liganden optimieren und sie stabilisieren (Dobrosotskaya und James, 2000; Firestein und Rongo, 2001; Tsunoda et al., 1997; Wu et al.,

2000a). Die Interaktion von PTEN mit MAGI 2 verhindert den Abbau von PTEN und stabilisiert es (Georgescu et al., 1999; Torres und Pulido, 2001). MAGI 2 interagiert mit β -Catenin (Kawajiri et al., 2000). β -Catenin ist über eine Interaktion mit α -Catenin und Cadherin an der Bildung der Adherens Junctions beteiligt. α -Catenin verbindet den β -Catenin/Cadherin Komplex mit dem Zytoskelett. Diese Interaktion ist für die Ausbildung und Funktion der Adherens Junction essentiell. Dies ist ein erster Hinweis auf eine direkte Verbindung von PTEN zum Zytoskelett.

4.1.1 PTEN Aktivität wird in Aktin-abhängigen Prozessen in *Drosophila* benötigt

Um zu überprüfen, ob PTEN bei der Ausbildung oder Aufrechterhaltung der Zellpolarität in *Drosophila* eine Rolle spielt, wurden Ovarien und Embryonen untersucht, denen zygotische oder maternale *Pten* Aktivität fehlt. Die Organisation des Aktinzytoskeletts in den Nährzellen und der Oozyte in *Pten* Keimbahnklonen ab Stadium 9 weist starke Defekte auf. Dies resultiert in kleineren, rundlicheren Eiern. Die Embryonen weisen Defekte in der axialen Expansion auf, verlieren ihre Synchronität der Kernteilungen spätestens ab Stadium 11 und bilden keine oder nur sehr wenige Polzellen. Das Fehlen der Polzellen geht einher mit stark reduzierter *oskar* mRNA und Vasa Proteinanlagerung am posterioren Pol des Embryos. Sehr ähnliche Defekte kennt man von Embryonen, welche mit Cytochalasin D, einem Wirkstoff der Aktin depolymerisiert, behandelt werden. Auch in Mutanten von Genen, die für die Organisation des Aktinzytoskeletts benötigt werden, findet man solche Phänotypen. Zytoplasmatisches Tropomyosin, ein Protein, welches mit Aktin assoziiert, es stabilisiert und für die Bindung anderer Aktin-bindenden Proteine modifiziert (Bray et al., 1992; Pittenger et al., 1994), ist für die *oskar* mRNA Lokalisation essentiell. Die axiale Expansion und die Kontraktion des Embryos hängen von einer intakten Ausbildung des kortikalen F-Aktins und von Myosin II ab (Erdelyi et al., 1995; Hatanaka und Okada, 1991; Lantz et al., 1999; Tetzlaff et al., 1996; Wheatley et al., 1995). Da die Keimplasmadeterminanten in der Oozyte noch normal verteilt und erst im Embryo kaum oder gar nicht nachweisbar waren, liegt die Funktion von PTEN weniger in der Etablierung oder Positionierung dieser Determinanten, sondern eher in deren Aufrechterhaltung. Genau dieses Phänomen wurde auch in Mutanten für das Aktin-bindende Protein Tropomyosin II gezeigt (Erdelyi et al., 1995; Tetzlaff et al., 1996). Aus diesen Daten geht hervor, daß PTEN an Prozessen der Aktinorganisation während der Oogenese und der frühen Embryogenese beteiligt ist.

Der Einfluß von PTEN auf das Aktinzytoskelett liegt in seiner Phosphataseaktivität. PTEN reguliert, zusammen mit der PI3 Kinase, die Balance von PIP-2 und PIP-3. Von beiden Lipiden ist bekannt, daß sie an der Organisation des Aktinzytoskeletts beteiligt sind. Von PIP-2 weiß man, daß es entweder direkt an Proteine bindet, die mit Aktin assoziieren und das Aktinzytoskelett mit der Plasmamembran verbinden, oder daß es an Proteine bindet, die an der Aktinpolymerisierung beteiligt sind, wie zum Beispiel Profilin und WASP (Yin und Janmey, 2003). Die Effekte von PIP-3 auf das Zytoskelett verlaufen über die Rekrutierung von GEFs (Guanine-nucleotide-exchange factors) für die GTPasen Rac1, Rho and Cdc42 (Zheng, 2001), welche dann WASP Proteine und Proteine des Arp2/3 Komplexes aktivieren (Abb. 4-2).

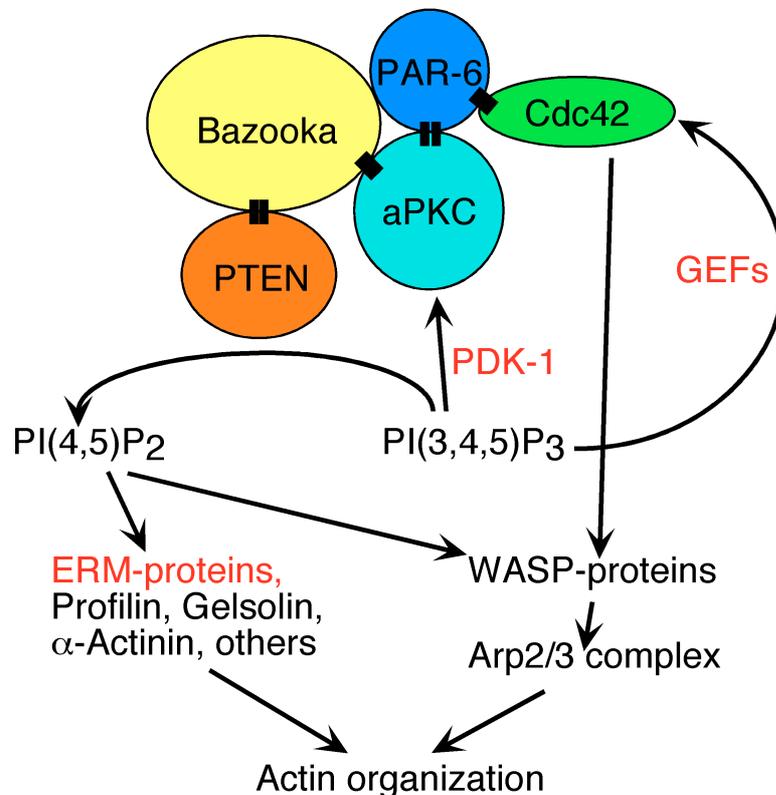


Abbildung 4-2: Die Effekte von PIP-2 und PIP-3 auf das Aktinzytoskelett. PTEN dephosphoryliert PIP-3 und PIP-2 wird gebildet. PIP-2 kann die Organisation des Zytoskeletts zum Einen über die Regulation von ERM-Proteinen, Profilin und anderen regulieren, oder über die WASP-Proteine und den Arp2/3 Komplex beeinflussen. Die WASP Proteine können auch durch die PIP-3 vermittelte Aktivierung von Cdc42 aktiviert werden.

Da die genaue subzelluläre Verteilung endogenen PTENs nicht analysiert werden konnte, kann keine genaue Aussage getroffen werden, wie PTEN die Aktinorganisation beeinflusst. Wir konnten jedoch zeigen, daß in Fliegen, in denen *Pten2* überexprimiert wurde, eine Kolokalisation von PTEN2 und PIP-2 an der Plasmamembran zu beobachten war (von Stein

et al., 2005). Auch in *Drosophila Pten* mutanten Zellklonen konnte eine erhöhte PIP-3 Konzentration an der Plasmamembran nachgewiesen werden (Oldham et al., 2002; Stambolic et al., 1998). All dies weist darauf hin, daß PTEN über die Regulation der Konzentration von PIP-2 und PIP-3 einen Einfluß auf die Organisation des Aktinzytoskeletts ausübt.

Welche Rolle spielt PTEN bei der Ausbildung oder Aufrechterhaltung von Polarität in Neuroblasten oder den Epithelzellen nach der Zellularisierung? Es scheint, als werde PTEN in diesen Prozessen nicht benötigt, auch wenn wir dort eine Kolokalisation mit Bazooka beobachten konnten. Dies beruht wahrscheinlich auf redundanten Mechanismen.

Die asymmetrische Verteilung der Zellschicksalsdeterminanten in den Neuroblasten ist von einem intakten Zytoskelett und einem funktionellen PAR/aPKC Komplex abhängig (Broadus und Doe, 1997; Knoblich et al., 1997). Der PAR/aPKC Komplex muß also irgendwie mit dem Aktinzytoskelett kommunizieren. Dies könnte über PTEN geschehen. Die Tatsache, daß wir keine Defekte in Neuroblasten oder Epithelzellen beobachten, könnte daran liegen, daß eine Redundanz mit anderen Proteinen besteht. Eine solche Redundanz findet sich auch bei der asymmetrischen Teilung von Neuroblasten. Hier reicht entweder ein funktionell aktiver PAR/aPKC Komplex oder ein funktionell aktiver Pins/Goi Komplex aus, um unterschiedlich große Tochterzellen zu generieren. Nur eine gleichzeitige Störung in beiden Komplexen hat einen Verlust der asymmetrischen Zellteilung zur Folge (Cai et al., 2003). Betrachtet man die Ergebnisse in dieser Arbeit, kommt man zu dem Schluß, daß PTEN eine Rolle in der Organisation des Aktinzytoskeletts in der späten Oogenese und der frühen Embryogenese spielt. In späteren Stadien könnten redundante Mechanismen das Fehlen von PTEN kompensieren, was das Fehlen von Defekten in Epithelien oder Neuroblasten von *Pten* mutanten Fliegen erklären würde.

4.1.2 PTEN Aktivität könnte durch seine subzelluläre Verteilung reguliert werden

Ich konnten in dieser Arbeit zeigen, daß überexprimiertes PTEN und Bazooka am apikalen Kortex in Epithelzellen und in Neuroblasten kolokalisieren. Eine funktionelle Verbindung zwischen dem PAR/aPKC Komplex findet sich auch in Neuronen des Hippocampus. In diesen Zellen lokalisiert der PAR/aPKC Komplex an der Spitze der sich streckenden Axone. Wird PTEN in diesen Zellen überexprimiert, so verschwindet diese Lokalisation des PAR/aPKC Komplexes. Der PAR/aPKC Komplex, zusammen mit der PI3 Kinase, wird also für die Polarisierung der Neuronen benötigt (Shi et al., 2003). Eine direkte

Interaktion zwischen PTEN und dem PAR/aPKC Komplex konnte jedoch nicht gezeigt werden.

Auch in Dictyosteliumzellen besteht ein Zusammenhang zwischen der Lokalisation von PTEN und Zellpolarität. Dictyosteliumzellen, die auf ein Signal zuwandern, reichern PTEN am posterioren Teil der Zelle an. Diese Anreicherung von PTEN geht einher mit einer erhöhten Konzentration von PIP-3 im anterioren Teil der wandernden Zelle. Dictyosteliumzellen, die für *Pten* mutant sind oder die *Pten* überexprimieren, verlieren ihre Zellpolarität und ihre Fähigkeit auf ein Signal zuzuwandern, da der zuvor erwähnte PIP-3 Gradient nicht gebildet werden kann (Funamoto et al., 2002; Iijima und Devreotes, 2002). Wie PTEN lokalisiert wird oder warum PTEN von der Leading Edge ausgeschlossen wird, ist bis jetzt nicht bekannt.

4.1.3 PTEN reguliert eventuell aPKC und Cdc42

PTEN könnte über seine Phosphataseaktivität den PAR/aPKC Komplex negativ regulieren. Es existieren zwei Säugerhomologe der aPKC, die von PDK1 phosphoryliert werden müssen, um aktiviert zu werden (Chou et al., 1998; Le Good et al., 1998; Standaert et al., 2001). PDK1 wird über seine Pleckstrin Homologie (PH) Domäne von PIP-3 zur Plasmamembran rekrutiert. Es konnten starke genetische Interaktionen zwischen PDK1, PTEN und anderen Effektoren des PI3 Kinase Signalweges gezeigt werden, die alle für die Kontrolle von Wachstum und Proliferation benötigt werden (siehe Abschnitt 4.1). Es ist sehr wahrscheinlich, daß die *Drosophila* aPKC mit PDK1 interagiert und von dieser, aufgrund erhöhter PIP-3 Konzentrationen, phosphoryliert wird.

PIP-3 kann auch GEFs rekrutieren, die dann die GTPasen Cdc42 und Rac1 aktivieren (Zheng, 2001). Cdc 42 ist auch ein Teil des PAR/aPKC Komplexes (Hutterer et al., 2004; Joberty et al., 2000; Lin et al., 2000). Aktiviertes Cdc42 bindet direkt an PAR-6, und diese Interaktion könnte die Kinaseaktivität der aPKC erhöhen, was in Säugerzellen der Fall ist (Yamanaka et al., 2001).

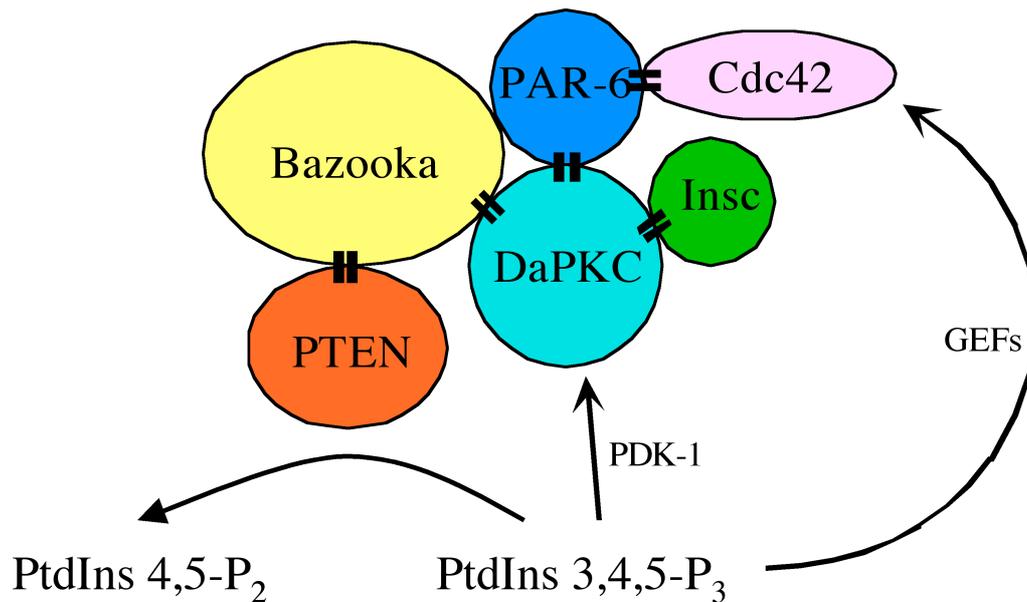


Abbildung 4-3: PTEN könnte den PAR/aPKC Komplex über PDK-1 und Cdc42 negativ regulieren, indem es PIP-3 dephosphoryliert und somit die Aktivierung der aPKC verhindert.

Hier sind zwei Möglichkeiten dargestellt, wie PTEN die Aktivität des PAR/aPKC Komplexes negativ reguliert, indem es PIP-3 Konzentrationen mindert und dadurch die aPKC Aktivität reduziert (Abb. 4-3).

4.2 Die mögliche Bedeutung eines Komplexes zwischen Bazooka und FKBP59

Bei der Gruppe der FKBP's (FK506-binding proteins) handelt es sich um weit verbreitete Proteine, die an FK506 binden, in fast allen Geweben zu finden sind und Homologe in Pro- und Eukaryonten haben (Sigal und Dumont, 1992). FK506 ist eine Substanz die ihre Anwendung hauptsächlich in der Organtransplantation findet, wo sie die Abstoßungsreaktion verhindern soll. Eine weitere Substanz, die an diese Proteine bindet, ist Rapamycin, eine natürlich vorkommende Substanz, die dem FK506 sehr ähnlich ist. Beide Substanzen sind Immunosuppressiva, die an intrazelluläre Rezeptoren binden, den FKBP's, eine Unterklasse der Immunophiline (Galat, 1993; Schreiber, 1991). Der FK506-FKBP Komplex blockiert eine wichtige Signalkaskade in T-Lymphozyten (Schreiber, 1991). Diese Blockade beruht auf der Inaktivierung von Calcineurin, einer Ca²⁺- und Calmodulin abhängigen Serin/Threonin Phosphatase (Liu et al., 1991). Calcineurin spielt eine Rolle in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren während Immunreaktionen (O'Keefe et al., 1992). In *Drosophila* konnten zwei Untereinheiten von Calcineurin identifiziert werden (Guerini et al., 1992), die die Endozytose synaptischer Vesikel inhibieren (Kuromi et al., 1997). Alle

FKBPs besitzen eine Ppiase (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase) Domäne, deren Aktivität bei der Faltung von Proteinen eine Rolle spielt (Hur und Bruice, 2002; Kay, 1996; Schiene-Fischer und Yu, 2001; Shaw, 2002). Der immunosuppressive Effekt von FK506 und Rapamycin wird über eine Bindung von FK506 oder Rapamycin an die Ppiase Domäne erreicht (Rosen et al., 1990; Standaert et al., 1990). Zusätzlich zur Ppiase Domäne besitzt FKBP59 3 TPR (tetratricopeptide) Domänen, die Protein-Protein Interaktionen vermitteln.

In *Drosophila* wird *FKBP59* maternal und zygotisch transkribiert. In 0-2 Stunden alten Embryonen findet sich viel mRNA, die dann in 2-4 Stunden alten Embryonen verschwindet. Die Transkription setzt dann wieder ein und die mRNA Konzentrationen steigen kontinuierlich während der Embryogenese und der larvalen Entwicklung an. In älteren Embryonen wird FKBP59 in spezifischen Geweben exprimiert: den Garlandzellen, den Oozyten, den Nephrozyten, und den Lymphdrüsen. All dies sind Gewebe, in denen verstärkt Vesikeltransport stattfindet. Die subzelluläre Verteilung von FKBP59 in Fibroblasten und Neuronen der Maus, sowie in Nierenzellen von Affen und Hunden (Madin-Darby Canine Kidney – MDCK cells) zeigen eine zytoplasmatische Lokalisation von FKBP59 während der Interphase. Hier kolokalisiert FKBP59 mit Komponenten des Zytoskeletts und besonders mit den Mikrotubuli. Während der Mitose lokalisiert FKBP59 hauptsächlich mit dem mitotischen Apparat (Spindel und Zentrosomen) und der Teilungsfurche in der Zytokinese (Perrot-Appianat et al., 1995). In menschlichen Zellen bindet FKBP59 über seine Ppiase Domäne an Dynamitin, welches ein Teil des Dynactin Komplexes ist, der über Dynein an Mikrotubuli bindet (Galigniana et al., 2002; Galigniana et al., 2004; Galigniana et al., 2001). Diese Interaktion könnte einen Transport von Molekülen entlang der Mikrotubuli über FKBP59 ermöglichen. Daß dies in der Tat der Fall ist, konnte für den Tumor-suppressor p53 gezeigt werden. p53 bildet einen Komplex mit Hsp90 (Heat-shock-protein 90) (Blagosklonny et al., 1996; King et al., 2001; Pratt et al., 1999; Sepehrnia et al., 1996). Hsp90 bindet an die TPR Domäne von FKBP59 (Radanyi et al., 1994). Über diese Interaktion wird erreicht, daß p53 über Mikrotubuli in den Nukleus transportiert wird (Galigniana et al., 2004). Da FKBP59 in *Drosophila* in Geweben mit verstärktem Vesikeltransport exprimiert wird, könnte es durchaus sein, daß FKBP59 auch hier an dem Transport entlang der Mikrotubuli beteiligt ist.

In Mauslymphozyten und Hefezellen konnte nachgewiesen werden, daß der Komplex aus Rapamycin (oder FK506) und FKBP12 Signale blockiert, die für den Übergang von der

G1 in die S-Phase des Zellzyklus notwendig sind und die Zellen so im G1 Zyklus verbleiben (Albers et al., 1993; Bierer et al., 1990; Heitman et al., 1991; Koltin et al., 1991). Dies wird über die Blockierung der TOR Kinase (Target of Rapamycin) erreicht. Die TOR Kinase zählt zu den Phosphatidylkinase-verwandten Kinasen (PIKK). Wie auch der PI3 Kinase Signalweg, reguliert der TOR Signalweg Zellwachstum und Differenzierung. Während der PI3 Kinase Signalweg auf Wachstumsfaktoren reagiert, ist der TOR Signalweg auf Nährstoffe und Energievorkommen sensibilisiert. Beide Signalwege werden benötigt um die S6 Kinase zu aktivieren. Auf diese Weise kann Proteinsynthese auf einem dem Nährstoff- und Wachstumsfaktorenniveau angepaßtem Level initiiert werden (Gingras et al., 2001; Martin und Blenis, 2002). Diese beiden Signalwege sind über den TSC Komplex (Tuberous Sclerosis Complex) miteinander verbunden. TSC1 und TSC2 bilden einen Tumor-suppressor Komplex (van Slegtenhorst et al., 1998) und Mutationen in einem der beiden Gene weisen erhöhte S6K Phosphorylierung auf, während die Überexpression von TSC1/2 die Phosphorylierung inhibiert (Gao et al., 2002; Goncharova et al., 2002; Inoki et al., 2002; Onda et al., 2002; Radimerski et al., 2002; Tee et al., 2002). TSC2 wird von Akt/PKB phosphoryliert (Potter et al., 2002), was die Tumor-suppressive Funktion des Komplexes inhibiert und den TOR Signalweg potentiert. Ein kritischer Schritt in der Phosphorylierung von S6K ist also die Inaktivierung des TSC1/2 Komplexes. Bis jetzt konnte von zwei FKBP's gezeigt werden, daß sie an diesen Prozessen beteiligt sind. FKBP12 ist ein mit TOR assoziiertes Protein, und FKBP38 steht im Zusammenhang mit TSC1 und es konnte gezeigt werden, daß die Regulation der Zellgröße durch den TSC von der PI3 Kinase und FKBP38 abhängt (Rosner et al., 2003).

In *Drosophila* konnten andere FKBP's identifiziert werden, deren Funktion vor Allem in der Oogenese untersucht wurde. Egghead wird während der Oogenese exprimiert und spielt eine Rolle in der Entwicklung des Epithels (Goode et al., 1996). Das *shut-down* (*shu*) Gen kodiert für ein weiteres FKBP, welches eine zentrale Rolle bei der Bildung von Keimbahnzysten während der Oogenese spielt. Besonders während der ersten asymmetrischen Zellteilung der Keimbahnstammzellen scheint Shu von Bedeutung zu sein, da bei einer fehlerhaften ersten Teilung abnormale Zystoblasten gebildet werden, die die 4 folgenden mitotischen Zellteilungen nur beschränkt durchlaufen und keine wildtypische 16-Zell-Zyste gebildet wird. Shu besitzt wie FKBP59 eine FK506 Bindedomäne und einen TPR Repeat (Munn und Steward, 2000).

In dieser Arbeit konnten nur frühe Phänotypen in der Embryogenese erkannt werden, die sich durch einen Zellzyklusdefekt und eine defekte Epithelstruktur des Embryos äußerten. Spätere Defekte konnten nicht nachgewiesen werden, was wie schon bei PTEN auf redundanten Mechanismen beruhen könnte, die mit dem komplexen PI3 Kinase/TOR Signalwegen in Verbindung stehen. Eine gründlichere Analyse der frühen Defekte und die Analyse von Doppelmutanten mit anderen Proteinen des PI3 Kinase/TOR Signalwegs könnte über eine Rolle FKBP59 während der Oogenese und Embryogenese Aufschluß geben und die Relation zum PAR/aPKC Komplex beleuchten. Weiterhin zeigt die Verbindung von FKBP5 zum PI3-Kinase/TOR Signalweg eine weitere interessante Möglichkeit, wie der PAR/aPKC Komplex dieses System reguliert oder von diesem System reguliert wird.

4.3 Die Interaktion zwischen CG4420 und Bazooka

CG4420 besitzt ein Homolog in der Hefe. Es wird in der Hefe entweder als *vsm1* (v-SNARE Master 1) oder als *DDI1* (DNA Damage Inducible 1) bezeichnet. (Gerst, 2003; Lustgarten und Gerst, 1999; Marash und Gerst, 2003). Diese Arbeitsgruppen fanden, daß *vsm1* eine Rolle im Vesikeltransport spielt. SNARE Proteine (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein [SNAP] receptor) sind membranassoziierte Rezeptoren, die bei dem Mechanismus des Andockens und der Fusionierung von Vesikeln eine Rolle spielen (Sollner et al., 1993). Die Rolle der SNAREs im Proteintransport ist hochkonserviert. SNAREs vermitteln den Transport von Transportvesikeln und könnten auch eine Rolle in der Organisation der Kompartimente spielen. SNAREs auf den Vesikeln (v-SNAREs) interagieren mit SNAREs auf den Zielkompartimenten (t-SNAREs) und bilden einen Fusionskomplex bevor es zur Verschmelzung der Vesikel mit der Membran kommt (Bennett und Scheller, 1993; Ferro-Novick und Jahn, 1994). Dieser Prozeß muß jedoch reguliert werden, um eine Spezifität für Vesikel und deren Zielort zu gewährleisten. Dies könnte über negative Regulatoren erreicht werden, die mit den SNAREs oder der Membran verbunden sind und erst dissoziieren oder inaktiviert werden müssen, bevor die Fusion stattfinden kann. Solche Regulatoren werden SNARE-master genannt (Gerst, 2003; Lustgarten und Gerst, 1999). *vsm1* wurde in einem Hefe-Zwei-Hybrid Screen mit den *Snc1* und *Snc2* v-SNAREs identifiziert (Lustgarten und Gerst, 1999). *Snc* Proteine lokalisieren an sekretorischen Vesikeln und interagieren mit t-SNAREs der Plasmamembran wie zum Beispiel *Sec9*, um einen SNARE Komplex zu bilden (Brennwald et al., 1994; Gerst et al., 1992; Protopopov et al., 1993; Rossi et al., 1997). Eine Deletion von *vsm1* in der Hefe resultiert in einer erhöhten Sekretion von Proteinen in das Medium. Eine Überexpression von *vsm1* inhibiert die

Sekretion und führt zu einer Anreicherung von Vesikeln in der Zelle. Die Überexpression von *vsm1* inhibiert auch die erhöhte Sekretion und das erhöhte Wachstum einer Zelle, die für Sec9 t-SNAREs mutiert ist. Dies sind Zeichen, daß *vsm1* die Exozytose in der Hefe negativ reguliert. Die Snc Proteine interagieren mit t-SNAREs der Plasmamembran und es konnte gezeigt werden, daß *vsm1* mit der Plasmamembran assoziiert (Lustgarten und Gerst, 1999). Da die Kontrolle des polaren Transports von Vesikeln zur Plasmamembran eine fundamentale Voraussetzung für die Etablierung der Zellpolarität ist, könnte eine Interaktion von Bazooka mit einem solchen SNARE-master Aufschluß darüber geben, wie die polare Verteilung von Bazooka reguliert wird.

Eine zweite Rolle, die dem CG4420 Homolog zugeschrieben wird, ist die Kontrolle des Zellzyklus als Antwort auf Schäden in der DNA. In diesem Zusammenhang wird das Gen auch als DDI1 (DNA Damage Inducible 1) bezeichnet (Clarke et al., 2001). Eukaryotische Zellen reagieren auf Schäden in der DNA, indem sie die Zellzyklusprogression aussetzen und Gene verstärkt exprimieren, die für DNA Reparatur zuständig sind (Friedberg et al., 1995; Friedberg, 1995; Hartwell und Weinert, 1989; Weinert und Hartwell, 1988). In der Hefe wird der Übergang von der Metaphase zur Anaphase über *Pds1* reguliert. *Pds1* kodiert für den Anaphase Inhibitor Sekurin, der erst synthetisiert und dann wieder abgebaut wird. Vor der Anaphase bindet Sekurin an Esp1 und inhibiert dessen Anaphase fördernde Aktivität (Ciosk et al., 1998; Cohen-Fix und Koshland, 1997; Cohen-Fix et al., 1996; Yamamoto et al., 1996a; Yamamoto et al., 1996b). Sekurin wird dann in der späten Metaphase polyubiquitiniert, über das Ubiquitin/Proteasom System degradiert und die Zelle kann ihren Zellzyklus mit der Metaphase fortsetzen (Cohen-Fix et al., 1996). Die Lebensspanne vieler Proteine wird über das Ubiquitin/Proteasom System reguliert und die Proteindegradation über dieses System steht in engem Zusammenhang mit der Zellzyklusprogression (Ciechanover, 1998; Hershko und Ciechanover, 1998; Pickart, 2000; Pickart und VanDemark, 2000). Um vom Ubiquitin/Proteasom System abgebaut zu werden, muß ein Protein polyubiquitiniert werden. Es müssen mindestens 4 Ubiquitinmoleküle vorhanden sein, bevor der Abbau über das Proteasom eingeleitet wird (Beal et al., 1996; Thrower et al., 2000; van Nocker et al., 1996). Proteine mit einem UBA Motiv können an Ubiquitin binden, die Polyubiquitinierung blockieren und so den Abbau des Proteins verhindern (Bertolaet et al., 2001b; Chen et al., 2001; Ortolan et al., 2000). DDI ist in der Lage, über seine UBA Domäne Ubiquitin zu binden, tut dies auch im Falle von *pds1* und kann so die Polyubiquitinierung und Degradation

von pds1 verhindern (Bertolaet et al., 2001b; Clarke et al., 2001). So wird erreicht, daß der Zellzyklus arretiert wird (Clarke et al., 2001).

In *Drosophila* Neuroblasten sinkt die apikale Konzentration von Bazooka nach der Metaphase rapide ab und Bazooka kann im gesamten Kortex nachgewiesen werden. Diese Reduktion könnte mit einer Polyubiquitinierung und dem Proteasom System zusammenhängen. Diese Arbeit zeigt einen ersten Hinweis darauf, da sowohl CG4420 als auch Bazooka mit Ubiquitin interagieren. So wäre es möglich ist, daß das Ubiquitin/Proteasom System bei der Regulation der Bazookakonzentrationen in verschiedenen Zellzyklusstadien involviert ist.

5 Zusammenfassung

Die Ausbildung einer Zellpolarität spielt bei vielen entwicklungsbiologischen Prozessen eine zentrale Rolle. Häufig bildet die Polarität einer Zelle die Grundlage für gerichtete Sekretion, Signalübertragung oder lokales Zellwachstum. Oft ist Zellpolarität die Voraussetzung für asymmetrische Zellteilungen und damit verbunden für das Festlegen unterschiedlicher Zellschicksale. Drei evolutionär hoch konservierte Komplexe, die in dem Aufbau und in der Aufrechterhaltung der Zellpolarität eine zentrale Rolle spielen, sind der PAR/aPKC, der Dlg/Lgl und der Pins/Göi Komplex. Viele Proteine, die am Aufbau und der Aufrechterhaltung der Zellpolarität beteiligt sind, konnten bereits identifiziert werden. Jedoch sind noch nicht alle Prozesse vollständig aufgeklärt und noch nicht alle Interaktionspartner schon bekannter beteiligter Proteine gefunden. Zum Verständnis des gesamten Ablaufs sind diese Informationen essentiell. Über einen Hefe-Zwei-Hybrid Screen mit den 3 PDZ Protein-Protein Interaktionsdomänen des PAR/aPKC Komplex Gens Bazooka (PAR-3) konnten neue potentielle Interaktionspartner von Bazooka identifiziert werden: PTEN, FKBP59 und CG4420. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Interaktionen in-vivo bestätigt. Anschließend wurden die 3 Interaktionspartner näher molekular und genetisch analysiert und phänotypisch durch immunohistochemischen Untersuchungen charakterisiert. PTEN ist eine Phosphatase, die Phosphatidylinositol (3,4,5) Trisphosphat dephosphoryliert und Phosphatidylinositol (4,5) Bisphosphat generiert und somit ein Antagonist zur PI3 Kinase ist. *Pten* Keimbahnklone zeigten Defekte während der Oogenese und der frühen Embryogenese, die für Defekte im Aufbau und der Organisation des Aktinzytoskeletts typisch sind. In späteren Stadien konnten keine Anomalitäten nachgewiesen werden. Über CG4420 konnte eine eventuelle Verbindung zum Vesikeltransport, zur Zellzykluskontrolle und zur eventuellen Kontrolle des Abbaus von Bazooka über Ubiquitinierung dargelegt werden. Die Interaktion von Baz und FKBP59 stellt eine weitere Verbindung zum PI3 Kinase Signalweg über mTOR dar. Auch ein gerichteter Transport entlang der Mikrotubuli, der die Lokalisation der Polaritätsproteine steuert, könnte über FKBP59 reguliert werden.

All die oben erwähnten Prozesse spielen bei der Etablierung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität eine zentrale Rolle und die genaue Analyse der gefundenen Interaktionspartner könnte weiteren Aufschluß über die Regulation der Zellpolarität geben.

6 Literatur

- Albers, M. W., Williams, R. T., Brown, E. J., Tanaka, A., Hall, F. L., und Schreiber, S. L. (1993). FKBP-rapamycin inhibits a cyclin-dependent kinase activity and a cyclin D1-Cdk association in early G1 of an osteosarcoma cell line. *J Biol Chem* **268**, 22825-9.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., und Watson, J. D. (1994). Molecular Biology of the Cell. *Garland Publishing, Inc. Third Edition*.
- Alessi, D. R. (2001). Discovery of PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction. Colworth Medal Lecture. *Biochem Soc Trans* **29**, 1-14.
- Amos, L., und Klug, A. (1974). Arrangement of subunits in flagellar microtubules. *J Cell Sci* **14**, 523-49.
- Bachmann, A., Schneider, M., Theilenberg, E., Grawe, F., und Knust, E. (2001). Drosophila Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity. *Nature* **414**, 638-43.
- Baker, J., Theurkauf, W. E., und Schubiger, G. (1993). Dynamic changes in microtubule configuration correlate with nuclear migration in the preblastoderm Drosophila embryo. *J Cell Biol* **122**, 113-21.
- Barros, C. S., Phelps, C. B., und Brand, A. H. (2003). Drosophila nonmuscle myosin II promotes the asymmetric segregation of cell fate determinants by cortical exclusion rather than active transport. *Dev Cell* **5**, 829-40.
- Beal, R., Deveraux, Q., Xia, G., Rechsteiner, M., und Pickart, C. (1996). Surface hydrophobic residues of multiubiquitin chains essential for proteolytic targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 861-6.
- Bennett, M. K., und Scheller, R. H. (1993). The molecular machinery for secretion is conserved from yeast to neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2559-63.
- Bertolaet, B. L., Clarke, D. J., Wolff, M., Watson, M. H., Henze, M., Divita, G., und Reed, S. I. (2001a). UBA domains mediate protein-protein interactions between two DNA damage-inducible proteins. *J Mol Biol* **313**, 955-63.
- Bertolaet, B. L., Clarke, D. J., Wolff, M., Watson, M. H., Henze, M., Divita, G., und Reed, S. I. (2001b). UBA domains of DNA damage-inducible proteins interact with ubiquitin. *Nat Struct Biol* **8**, 417-22.
- Betschinger, J., Eisenhaber, F., und Knoblich, J. A. (2005). Phosphorylation-Induced Autoinhibition Regulates the Cytoskeletal Protein Lethal (2) giant larvae. *Curr Biol* **15**, 276-82.
- Betschinger, J., und Knoblich, J. A. (2004). Dare to be different: asymmetric cell division in Drosophila, C. elegans and vertebrates. *Curr Biol* **14**, R674-85.
- Betschinger, J., Mechtler, K., und Knoblich, J. A. (2003). The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl. *Nature* **422**, 326-30.
- Bierer, B. E., Mattila, P. S., Standaert, R. F., Herzenberg, L. A., Burakoff, S. J., Crabtree, G., und Schreiber, S. L. (1990). Two distinct signal transmission pathways in T lymphocytes are inhibited by complexes formed between an immunophilin and either FK506 or rapamycin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 9231-5.
- Bilder, D., und Perrimon, N. (2000). Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature* **403**, 676-80.
- Bilder, D., Schober, M., und Perrimon, N. (2003). Integrated activity of PDZ protein complexes regulates epithelial polarity. *Nat Cell Biol* **5**, 53-8.

- Blagosklonny, M. V., Toretsky, J., Bohen, S., and Neckers, L. (1996). Mutant conformation of p53 translated in vitro or in vivo requires functional HSP90. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8379-83.
- Bloom, G. S. (1992). Motor proteins for cytoplasmic microtubules. *Curr Opin Cell Biol* **4**, 66-73.
- Bohni, R., Riesgo-Escovar, J., Oldham, S., Brogiolo, W., Stocker, H., Andruss, B. F., Beckingham, K., and Hafen, E. (1999). Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a Drosophila homolog of vertebrate IRS1-4. *Cell* **97**, 865-75.
- Bolivar, J., Huynh, J. R., Lopez-Schier, H., Gonzalez, C., St Johnston, D., and Gonzalez-Reyes, A. (2001). Centrosome migration into the Drosophila oocyte is independent of BicD and egl, and of the organisation of the microtubule cytoskeleton. *Development* **128**, 1889-97.
- Bornens, M. (2002). Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 25-34.
- Boyd, L., Guo, S., Levitan, D., Stinchcomb, D. T., and Kemphues, K. J. (1996). PAR-2 is asymmetrically distributed and promotes association of P granules and PAR-1 with the cortex in *C. elegans* embryos. *Development* **122**, 3075-84.
- Brand, A. H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-15.
- Bray, J. J., Fernyhough, P., Bamburg, J. R., and Bray, D. (1992). Actin depolymerizing factor is a component of slow axonal transport. *J Neurochem* **58**, 2081-7.
- Brennwald, P., Kearns, B., Champion, K., Keranen, S., Bankaitis, V., and Novick, P. (1994). Sec9 is a SNAP-25-like component of a yeast SNARE complex that may be the effector of Sec4 function in exocytosis. *Cell* **79**, 245-58.
- Broadus, J., and Doe, C. Q. (1997). Extrinsic cues, intrinsic cues and microfilaments regulate asymmetric protein localization in Drosophila neuroblasts. *Curr Biol* **7**, 827-35.
- Bryan, J., and Wilson, L. (1971). Are cytoplasmic microtubules heteropolymers? *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 1762-6.
- Cai, Y., Yu, F., Lin, S., Chia, W., and Yang, X. (2003). Apical complex genes control mitotic spindle geometry and relative size of daughter cells in Drosophila neuroblast and pl asymmetric divisions. *Cell* **112**, 51-62.
- Callaini, G., and Riparbelli, M. G. (1996). Fertilization in Drosophila melanogaster: centrosome inheritance and organization of the first mitotic spindle. *Dev Biol* **176**, 199-208.
- Campos-Ortega, J. A., and Hartenstein, V. (1997). The Embryonic Development of *Drosophila melanogaster*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Cantley, L. C., and Neel, B. G. (1999). New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4240-5.
- Chan, T. O., Rittenhouse, S. E., and Tsichlis, P. N. (1999). AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu Rev Biochem* **68**, 965-1014.
- Chen, L., Shinde, U., Ortolan, T. G., and Madura, K. (2001). Ubiquitin-associated (UBA) domains in Rad23 bind ubiquitin and promote inhibition of multi-ubiquitin chain assembly. *EMBO Rep* **2**, 933-8.
- Chen, W., Ede, N. J., Jackson, D. C., McCluskey, J., and Purcell, A. W. (1996). CTL recognition of an altered peptide associated with asparagine bond rearrangement. Implications for immunity and vaccine design. *J Immunol* **157**, 1000-5.

- Chou, M. M., Hou, W., Johnson, J., Graham, L. K., Lee, M. H., Chen, C. S., Newton, A. C., Schaffhausen, B. S., und Toker, A. (1998). Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr Biol* **8**, 1069-77.
- Chretien, D., und Wade, R. H. (1991). New data on the microtubule surface lattice. *Biol Cell* **71**, 161-74.
- Chung, C. Y., Funamoto, S., und Firtel, R. A. (2001a). Signaling pathways controlling cell polarity and chemotaxis. *Trends Biochem Sci* **26**, 557-66.
- Chung, C. Y., Potikyan, G., und Firtel, R. A. (2001b). Control of cell polarity and chemotaxis by Akt/PKB and PI3 kinase through the regulation of PAKa. *Mol Cell* **7**, 937-47.
- Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *Embo J* **17**, 7151-60.
- Ciosk, R., Zachariae, W., Michaelis, C., Shevchenko, A., Mann, M., und Nasmyth, K. (1998). An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. *Cell* **93**, 1067-76.
- Clarke, D. J., Mondesert, G., Segal, M., Bertolaet, B. L., Jensen, S., Wolff, M., Henze, M., und Reed, S. I. (2001). Dosage suppressors of pds1 implicate ubiquitin-associated domains in checkpoint control. *Mol Cell Biol* **21**, 1997-2007.
- Clemens, J. C., Worby, C. A., Simonson-Leff, N., Muda, M., Maehama, T., Hemmings, B. A., und Dixon, J. E. (2000). Use of double-stranded RNA interference in Drosophila cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6499-503.
- Cohen-Fix, O., und Koshland, D. (1997). The anaphase inhibitor of Saccharomyces cerevisiae Pds1p is a target of the DNA damage checkpoint pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14361-6.
- Cohen-Fix, O., Peters, J. M., Kirschner, M. W., und Koshland, D. (1996). Anaphase initiation in Saccharomyces cerevisiae is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes Dev* **10**, 3081-93.
- Condeelis, J. (1993a). Life at the leading edge: the formation of cell protrusions. *Annu Rev Cell Biol* **9**, 411-44.
- Condeelis, J. (1993b). Understanding the cortex of crawling cells: insights from Dictyostelium. *Trends Cell Biol* **3**, 371-6.
- de Cuevas, M., Lilly, M. A., und Spradling, A. C. (1997). Germline cyst formation in Drosophila. *Annu Rev Genet* **31**, 405-28.
- de Cuevas, M., und Spradling, A. C. (1998). Morphogenesis of the Drosophila fusome and its implications for oocyte specification. *Development* **125**, 2781-9.
- Di Cristofano, A., Pesce, B., Cordon-Cardo, C., und Pandolfi, P. P. (1998). Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat Genet* **19**, 348-55.
- Dobrosotskaya, I. Y., und James, G. L. (2000). MAGI-1 interacts with beta-catenin and is associated with cell-cell adhesion structures. *Biochem Biophys Res Commun* **270**, 903-9.
- Duffy, J. B. (2002). GAL4 system in Drosophila: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* **34**, 1-15.
- Edgar, B. A., und Schubiger, G. (1986). Parameters controlling transcriptional activation during early Drosophila development. *Cell* **44**, 871-7.
- Erdelyi, M., Michon, A. M., Guichet, A., Glotzer, J. B., und Ephrussi, A. (1995). Requirement for Drosophila cytoplasmic tropomyosin in oskar mRNA localization. *Nature* **377**, 524-7.
- Erickson, H. P. (1974). Assembly of microtubules from preformed, ring-shaped protofilaments and 6-S tubulin. *J Supramol Struct* **2**, 393-411.

- Etienne-Manneville, S., und Hall, A. (2001). Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell* **106**, 489-98.
- Ferro-Novick, S., und Jahn, R. (1994). Vesicle fusion from yeast to man. *Nature* **370**, 191-3.
- Firestein, B. L., und Rongo, C. (2001). DLG-1 is a MAGUK similar to SAP97 and is required for adherens junction formation. *Mol Biol Cell* **12**, 3465-75.
- Firtel, R. A., und Chung, C. Y. (2000). The molecular genetics of chemotaxis: sensing and responding to chemoattractant gradients. *Bioessays* **22**, 603-15.
- Foe, V. E., und Alberts, B. M. (1983). Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis. *J Cell Sci* **61**, 31-70.
- Friedberg, E., Walker, G., und Siede, W. (1995). DNA repair and mutagenesis. *ASM Press, Washington, DC*.
- Friedberg, E. C. (1995). Out of the shadows and into the light: the emergence of DNA repair. *Trends Biochem Sci* **20**, 381.
- Fukui, Y. (1993). Toward a new concept of cell motility: cytoskeletal dynamics in amoeboid movement and cell division. *Int Rev Cytol* **144**, 85-127.
- Funamoto, S., Meili, R., Lee, S., Parry, L., und Firtel, R. A. (2002). Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis. *Cell* **109**, 611-23.
- Furnari, F. B., Huang, H. J., und Cavenee, W. K. (1998). The phosphoinositol phosphatase activity of PTEN mediates a serum-sensitive G1 growth arrest in glioma cells. *Cancer Res* **58**, 5002-8.
- Fuse, N., Hisata, K., Katzen, A. L., und Matsuzaki, F. (2003). Heterotrimeric G proteins regulate daughter cell size asymmetry in *Drosophila* neuroblast divisions. *Curr Biol* **13**, 947-54.
- Fyrberg, E. A., und Goldstein, L. S. (1990). The *Drosophila* cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* **6**, 559-96.
- Galat, A. (1993). Peptidylproline cis-trans-isomerases: immunophilins. *Eur J Biochem* **216**, 689-707.
- Galigniana, M. D., Harrell, J. M., Murphy, P. J., Chinkers, M., Radanyi, C., Renoir, J. M., Zhang, M., und Pratt, W. B. (2002). Binding of hsp90-associated immunophilins to cytoplasmic dynein: direct binding and in vivo evidence that the peptidylprolyl isomerase domain is a dynein interaction domain. *Biochemistry* **41**, 13602-10.
- Galigniana, M. D., Harrell, J. M., O'Hagen, H. M., Ljungman, M., und Pratt, W. B. (2004). Hsp90-binding immunophilins link p53 to dynein during p53 transport to the nucleus. *J Biol Chem* **279**, 22483-9.
- Galigniana, M. D., Radanyi, C., Renoir, J. M., Housley, P. R., und Pratt, W. B. (2001). Evidence that the peptidylprolyl isomerase domain of the hsp90-binding immunophilin FKBP52 is involved in both dynein interaction and glucocorticoid receptor movement to the nucleus. *J Biol Chem* **276**, 14884-9.
- Gao, X., Neufeld, T. P., und Pan, D. (2000). *Drosophila* PTEN regulates cell growth and proliferation through PI3K-dependent and -independent pathways. *Dev Biol* **221**, 404-18.
- Gao, X., Zhang, Y., Arrazola, P., Hino, O., Kobayashi, T., Yeung, R. S., Ru, B., und Pan, D. (2002). Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signalling. *Nat Cell Biol* **4**, 699-704.
- Gelfand, V. I., und Bershadsky, A. D. (1991). Microtubule dynamics: mechanism, regulation, and function. *Annu Rev Cell Biol* **7**, 93-116.
- Gelfand, V. I., und Scholey, J. M. (1992). Cell biology. Every motion has its motor. *Nature* **359**, 480-2.

- Georgescu, M. M., Kirsch, K. H., Akagi, T., Shishido, T., und Hanafusa, H. (1999). The tumor-suppressor activity of PTEN is regulated by its carboxyl-terminal region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10182-7.
- Gerst, J. E. (2003). SNARE regulators: matchmakers and matchbreakers. *Biochim Biophys Acta* **1641**, 99-110.
- Gerst, J. E., Rodgers, L., Riggs, M., und Wigler, M. (1992). SNC1, a yeast homolog of the synaptic vesicle-associated membrane protein/synaptobrevin gene family: genetic interactions with the RAS and CAP genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4338-42.
- Gilbert, S. (2003). *Developmental Biology. Sinauer Associates, Inc. Publishers 7th Edition.*
- Gingras, A. C., Raught, B., und Sonenberg, N. (2001). Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev* **15**, 807-26.
- Goberdhan, D. C., Paricio, N., Goodman, E. C., Mlodzik, M., und Wilson, C. (1999). Drosophila tumor suppressor PTEN controls cell size and number by antagonizing the Chico/PI3-kinase signaling pathway. *Genes Dev* **13**, 3244-58.
- Goberdhan, D. C., und Wilson, C. (2002). Insulin receptor-mediated organ overgrowth in Drosophila is not restricted by body size. *Dev Genes Evol* **212**, 196-202.
- Goldstein, B., und Hird, S. N. (1996). Specification of the anteroposterior axis in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **122**, 1467-74.
- Goncharova, E. A., Goncharov, D. A., Eszterhas, A., Hunter, D. S., Glassberg, M. K., Yeung, R. S., Walker, C. L., Noonan, D., Kwiatkowski, D. J., Chou, M. M., Panettieri, R. A., Jr., und Krymskaya, V. P. (2002). Tuberin regulates p70 S6 kinase activation and ribosomal protein S6 phosphorylation. A role for the TSC2 tumor suppressor gene in pulmonary lymphangiomyomatosis (LAM). *J Biol Chem* **277**, 30958-67.
- Gonzalez-Reyes, A., und St Johnston, D. (1998). Patterning of the follicle cell epithelium along the anterior-posterior axis during Drosophila oogenesis. *Development* **125**, 2837-46.
- Goode, S., Melnick, M., Chou, T. B., und Perrimon, N. (1996). The neurogenic genes egghead and brainiac define a novel signaling pathway essential for epithelial morphogenesis during Drosophila oogenesis. *Development* **122**, 3863-79.
- Grieder, N. C., de Cuevas, M., und Spradling, A. C. (2000). The fusome organizes the microtubule network during oocyte differentiation in Drosophila. *Development* **127**, 4253-64.
- Guerini, D., Montell, C., und Klee, C. B. (1992). Molecular cloning and characterization of the genes encoding the two subunits of Drosophila melanogaster calcineurin. *J Biol Chem* **267**, 22542-9.
- Guo, S., und Kemphues, K. J. (1995). par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* **81**, 611-20.
- Harris, T. J., und Peifer, M. (2004). Adherens junction-dependent and -independent steps in the establishment of epithelial cell polarity in Drosophila. *J Cell Biol* **167**, 135-47.
- Harris, T. J., und Peifer, M. (2005). The positioning and segregation of apical cues during epithelial polarity establishment in Drosophila. *J Cell Biol* **170**, 813-23.
- Hartwell, L. H., und Weinert, T. A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **246**, 629-34.
- Hatanaka, K., und Okada, M. (1991). Retarded nuclear migration in Drosophila embryos with aberrant F-actin reorganization caused by maternal mutations and by cytochalasin treatment. *Development* **111**, 909-20.
- Haugh, J. M., Codazzi, F., Teruel, M., und Meyer, T. (2000). Spatial sensing in fibroblasts mediated by 3' phosphoinositides. *J Cell Biol* **151**, 1269-80.

- Hay, B., Ackerman, L., Barbel, S., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1988). Identification of a component of *Drosophila* polar granules. *Development* **103**, 625-40.
- Heitman, J., Movva, N. R., and Hall, M. N. (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* **253**, 905-9.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**, 425-79.
- Hirata, J., Nakagoshi, H., Nabeshima, Y., and Matsuzaki, F. (1995). Asymmetric segregation of the homeodomain protein Prospero during *Drosophila* development. *Nature* **377**, 627-30.
- Hong, Y., Stronach, B., Perrimon, N., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (2001). *Drosophila* Stardust interacts with Crumbs to control polarity of epithelia but not neuroblasts. *Nature* **414**, 634-8.
- Huang, H., Potter, C. J., Tao, W., Li, D. M., Brogiolo, W., Hafen, E., Sun, H., and Xu, T. (1999). PTEN affects cell size, cell proliferation and apoptosis during *Drosophila* eye development. *Development* **126**, 5365-72.
- Huettnner, A. F. (1924). Maturation and fertilization in *Drosophila melanogaster*. *J. Morphol. Physiol.* **39**, 249-265.
- Hung, T. J., and Kemphues, K. J. (1999). PAR-6 is a conserved PDZ domain-containing protein that colocalizes with PAR-3 in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development* **126**, 127-35.
- Hur, S., and Bruice, T. C. (2002). The mechanism of cis-trans isomerization of prolyl peptides by cyclophilin. *J Am Chem Soc* **124**, 7303-13.
- Hutterer, A., Betschinger, J., Petronczki, M., and Knoblich, J. A. (2004). Sequential roles of Cdc42, Par-6, aPKC, and Lgl in the establishment of epithelial polarity during *Drosophila* embryogenesis. *Dev Cell* **6**, 845-54.
- Iijima, M., and Devreotes, P. (2002). Tumor suppressor PTEN mediates sensing of chemoattractant gradients. *Cell* **109**, 599-610.
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., and Guan, K. L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* **4**, 648-57.
- Izumi, Y., Hirose, T., Tamai, Y., Hirai, S., Nagashima, Y., Fujimoto, T., Tabuse, Y., Kemphues, K. J., and Ohno, S. (1998). An atypical PKC directly associates and colocalizes at the epithelial tight junction with ASIP, a mammalian homologue of *Caenorhabditis elegans* polarity protein PAR-3. *J Cell Biol* **143**, 95-106.
- Izumi, Y., Ohta, N., Itoh-Furuya, A., Fuse, N., and Matsuzaki, F. (2004). Differential functions of G protein and Baz-aPKC signaling pathways in *Drosophila* neuroblast asymmetric division. *J Cell Biol* **164**, 729-38.
- Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (2001). Asymmetric cell division in the *Drosophila* nervous system. *Nat Rev Neurosci* **2**, 772-9.
- Joberty, G., Petersen, C., Gao, L., and Macara, I. G. (2000). The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat Cell Biol* **2**, 531-9.
- Kabsch, W., and Vandekerckhove, J. (1992). Structure and function of actin. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **21**, 49-76.
- Karr, T. L., and Alberts, B. M. (1986). Organization of the cytoskeleton in early *Drosophila* embryos. *J Cell Biol* **102**, 1494-509.
- Katanaev, V. L. (2001). Signal transduction in neutrophil chemotaxis. *Biochemistry (Mosc)* **66**, 351-68.
- Kawajiri, A., Itoh, N., Fukata, M., Nakagawa, M., Yamaga, M., Iwamatsu, A., and Kaibuchi, K. (2000). Identification of a novel beta-catenin-interacting protein. *Biochem Biophys Res Commun* **273**, 712-7.

- Kay, J. E. (1996). Structure-function relationships in the FK506-binding protein (FKBP) family of peptidylprolyl cis-trans isomerases. *Biochem J* **314** (Pt 2), 361-85.
- Kemphues, K. J., Priess, J. R., Morton, D. G., and Cheng, N. S. (1988). Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell* **52**, 311-20.
- King, F. W., Wawrzynow, A., Hohfeld, J., and Zylicz, M. (2001). Co-chaperones Bag-1, Hop and Hsp40 regulate Hsc70 and Hsp90 interactions with wild-type or mutant p53. *Embo J* **20**, 6297-305.
- Knoblich, J. A., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1995). Asymmetric segregation of Numb and Prospero during cell division. *Nature* **377**, 624-7.
- Knoblich, J. A., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1997). The N terminus of the *Drosophila* Numb protein directs membrane association and actin-dependent asymmetric localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13005-10.
- Koltin, Y., Faucette, L., Bergsma, D. J., Levy, M. A., Cafferkey, R., Koser, P. L., Johnson, R. K., and Livi, G. P. (1991). Rapamycin sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase related to human FK506-binding protein. *Mol Cell Biol* **11**, 1718-23.
- Korn, E. D., and Hammer, J. A., 3rd. (1990). Myosin I. *Curr Opin Cell Biol* **2**, 57-61.
- Kotelevets, L., van Hengel, J., Bruyneel, E., Mareel, M., van Roy, F., and Chastre, E. (2005). Implication of the MAGI-1b/PTEN signalosome in stabilization of adherens junctions and suppression of invasiveness. *Faseb J* **19**, 115-7.
- Kraut, R., and Campos-Ortega, J. A. (1996). *inscuteable*, a neural precursor gene of *Drosophila*, encodes a candidate for a cytoskeleton adaptor protein. *Dev Biol* **174**, 65-81.
- Kuchinke, U., Grawe, F., and Knust, E. (1998). Control of spindle orientation in *Drosophila* by the Par-3-related PDZ-domain protein Bazooka. *Curr Biol* **8**, 1357-65.
- Kuromi, H., Yoshihara, M., and Kidokoro, Y. (1997). An inhibitory role of calcineurin in endocytosis of synaptic vesicles at nerve terminals of *Drosophila* larvae. *Neurosci Res* **27**, 101-13.
- Lantz, V. A., Clemens, S. E., and Miller, K. G. (1999). The actin cytoskeleton is required for maintenance of posterior pole plasm components in the *Drosophila* embryo. *Mech Dev* **85**, 111-22.
- Lasko, P. F., and Ashburner, M. (1990). Posterior localization of vasa protein correlates with, but is not sufficient for, pole cell development. *Genes Dev* **4**, 905-21.
- Le Good, J. A., Ziegler, W. H., Parekh, D. B., Alessi, D. R., Cohen, P., and Parker, P. J. (1998). Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* **281**, 2042-5.
- Leevers, S. J., Weinkove, D., MacDougall, L. K., Hafen, E., and Waterfield, M. D. (1996). The *Drosophila* phosphoinositide 3-kinase Dp110 promotes cell growth. *Embo J* **15**, 6584-94.
- Lehman, K., Rossi, G., Adamo, J. E., and Brennwald, P. (1999). Yeast homologues of tomosyn and lethal giant larvae function in exocytosis and are associated with the plasma membrane SNARE, Sec9. *J Cell Biol* **146**, 125-40.
- Leslie, N. R., and Downes, C. P. (2002). PTEN: The down side of PI 3-kinase signalling. *Cell Signal* **14**, 285-95.
- Li, D. M., and Sun, H. (1997). TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res* **57**, 2124-9.

- Li, D. M., und Sun, H. (1998). PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15406-11.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S. I., Puc, J., Miliareisis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S. H., Giovanella, B. C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M. H., und Parsons, R. (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* **275**, 1943-7.
- Liaw, D., Marsh, D. J., Li, J., Dahia, P. L., Wang, S. I., Zheng, Z., Bose, S., Call, K. M., Tsou, H. C., Peacocke, M., Eng, C., und Parsons, R. (1997). Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet* **16**, 64-7.
- Lin, D., Edwards, A. S., Fawcett, J. P., Mbamalu, G., Scott, J. D., und Pawson, T. (2000). A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat Cell Biol* **2**, 540-7.
- Lin, H., und Spradling, A. C. (1995). Fusome asymmetry and oocyte determination in *Drosophila*. *Dev Genet* **16**, 6-12.
- Liu, J., Farmer, J. D., Jr., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I., und Schreiber, S. L. (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66**, 807-15.
- Lizcano, J. M., Alrubaie, S., Kieloch, A., Deak, M., Leever, S. J., und Alessi, D. R. (2003). Insulin-induced *Drosophila* S6 kinase activation requires phosphoinositide 3-kinase and protein kinase B. *Biochem J* **374**, 297-306.
- Lustgarten, V., und Gerst, J. E. (1999). Yeast VSM1 encodes a v-SNARE binding protein that may act as a negative regulator of constitutive exocytosis. *Mol Cell Biol* **19**, 4480-94.
- Maehama, T., und Dixon, J. E. (1999). PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *Trends Cell Biol* **9**, 125-8.
- Mandelkow, E. M., Mandelkow, E., und Milligan, R. A. (1991). Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study. *J Cell Biol* **114**, 977-91.
- Marash, M., und Gerst, J. E. (2003). Phosphorylation of the autoinhibitory domain of the Sso t-SNAREs promotes binding of the Vsm1 SNARE regulator in yeast. *Mol Biol Cell* **14**, 3114-25.
- Marsh, D. J., Coulon, V., Lunetta, K. L., Rocca-Serra, P., Dahia, P. L., Zheng, Z., Liaw, D., Caron, S., Duboue, B., Lin, A. Y., Richardson, A. L., Bonnetblanc, J. M., Bressieux, J. M., Cabarrot-Moreau, A., Chompret, A., Demange, L., Eeles, R. A., Yahanda, A. M., Fearon, E. R., Fricker, J. P., Gorlin, R. J., Hodgson, S. V., Huson, S., Lacombe, D., Eng, C., und et al. (1998). Mutation spectrum and genotype-phenotype analyses in Cowden disease and Bannayan-Zonana syndrome, two hamartoma syndromes with germline PTEN mutation. *Hum Mol Genet* **7**, 507-15.
- Marsh, D. J., Roth, S., Lunetta, K. L., Hemminki, A., Dahia, P. L., Sistonen, P., Zheng, Z., Caron, S., van Orsouw, N. J., Bodmer, W. F., Cottrell, S. E., Dunlop, M. G., Eccles, D., Hodgson, S. V., Jarvinen, H., Kellokumpu, I., Markie, D., Neale, K., Phillips, R., Rozen, P., Syngal, S., Vijg, J., Tomlinson, I. P., Aaltonen, L. A., und Eng, C. (1997). Exclusion of PTEN and 10q22-24 as the susceptibility locus for juvenile polyposis syndrome. *Cancer Res* **57**, 5017-21.
- Martin, K. A., und Blenis, J. (2002). Coordinate regulation of translation by the PI 3-kinase and mTOR pathways. *Adv Cancer Res* **86**, 1-39.

- Mechler, B. M., McGinnis, W., und Gehring, W. J. (1985). Molecular cloning of lethal(2)giant larvae, a recessive oncogene of *Drosophila melanogaster*. *Embo J* **4**, 1551-7.
- Medina, E., Williams, J., Klipfell, E., Zarnescu, D., Thomas, G., und Le Bivic, A. (2002). Crumbs interacts with moesin and beta(Heavy)-spectrin in the apical membrane skeleton of *Drosophila*. *J Cell Biol* **158**, 941-51.
- Meier, R., und Hemmings, B. A. (1999). Regulation of protein kinase B. *J Recept Signal Transduct Res* **19**, 121-8.
- Mitchison, T., und Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**, 237-42.
- Mitchison, T. J. (1992). Compare and contrast actin filaments and microtubules. *Mol Biol Cell* **3**, 1309-15.
- Morton, D. G., Shakes, D. C., Nugent, S., Dichoso, D., Wang, W., Golden, A., und Kemphues, K. J. (2002). The *Caenorhabditis elegans* par-5 gene encodes a 14-3-3 protein required for cellular asymmetry in the early embryo. *Dev Biol* **241**, 47-58.
- Munn, K., und Steward, R. (2000). The shut-down gene of *Drosophila melanogaster* encodes a novel FK506-binding protein essential for the formation of germline cysts during oogenesis. *Genetics* **156**, 245-56.
- Musch, A., Cohen, D., Yeaman, C., Nelson, W. J., Rodriguez-Boulan, E., und Brennwald, P. J. (2002). Mammalian homolog of *Drosophila* tumor suppressor lethal (2) giant larvae interacts with basolateral exocytic machinery in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* **13**, 158-68.
- Myers, M. P., Pass, I., Batty, I. H., Van der Kaay, J., Stolarov, J. P., Hemmings, B. A., Wigler, M. H., Downes, C. P., und Tonks, N. K. (1998). The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13513-8.
- Nelen, M. R., van Staveren, W. C., Peeters, E. A., Hassel, M. B., Gorlin, R. J., Hamm, H., Lindboe, C. F., Fryns, J. P., Sijmons, R. H., Woods, D. G., Mariman, E. C., Padberg, G. W., und Kremer, H. (1997). Germline mutations in the PTEN/MMAC1 gene in patients with Cowden disease. *Hum Mol Genet* **6**, 1383-7.
- Nelson, W. J. (2003). Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature* **422**, 766-74.
- O'Keefe, S. J., Tamura, J., Kincaid, R. L., Tocci, M. J., und O'Neill, E. A. (1992). FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature* **357**, 692-4.
- Ohno, S. (2001). Intercellular junctions and cellular polarity: the PAR-aPKC complex, a conserved core cassette playing fundamental roles in cell polarity. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 641-8.
- Oldham, S., Stocker, H., Laffargue, M., Wittwer, F., Wymann, M., und Hafen, E. (2002). The *Drosophila* insulin/IGF receptor controls growth and size by modulating PtdInsP(3) levels. *Development* **129**, 4103-9.
- Olmsted, J. B. (1986). Microtubule-associated proteins. *Annu Rev Cell Biol* **2**, 421-57.
- Onda, H., Crino, P. B., Zhang, H., Murphey, R. D., Rastelli, L., Gould Rothberg, B. E., und Kwiatkowski, D. J. (2002). Tsc2 null murine neuroepithelial cells are a model for human tuber giant cells, and show activation of an mTOR pathway. *Mol Cell Neurosci* **21**, 561-74.
- Ortolan, T. G., Tongaonkar, P., Lambertson, D., Chen, L., Schaubert, C., und Madura, K. (2000). The DNA repair protein rad23 is a negative regulator of multi-ubiquitin chain assembly. *Nat Cell Biol* **2**, 601-8.
- Parent, C. A., und Devreotes, P. N. (1999). A cell's sense of direction. *Science* **284**, 765-70.

- Pellettieri, J., und Seydoux, G. (2002). Anterior-posterior polarity in *C. elegans* and *Drosophila*--PARallels and differences. *Science* **298**, 1946-50.
- Perrot-Appinat, M., Cibert, C., Geraud, G., Renoir, J. M., und Baulieu, E. E. (1995). The 59 kDa FK506-binding protein, a 90 kDa heat shock protein binding immunophilin (FKBP59-HBI), is associated with the nucleus, the cytoskeleton and mitotic apparatus. *J Cell Sci* **108** (Pt 5), 2037-51.
- Petritsch, C., Tavosanis, G., Turck, C. W., Jan, L. Y., und Jan, Y. N. (2003). The *Drosophila* myosin VI Jaguar is required for basal protein targeting and correct spindle orientation in mitotic neuroblasts. *Dev Cell* **4**, 273-81.
- Petronczki, M., und Knoblich, J. A. (2001). DmPAR-6 directs epithelial polarity and asymmetric cell division of neuroblasts in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* **3**, 43-9.
- Pickart, C. M. (2000). Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci* **25**, 544-8.
- Pickart, C. M., und VanDemark, A. P. (2000). Opening doors into the proteasome. *Nat Struct Biol* **7**, 999-1001.
- Pielage, J., Stork, T., Bunse, I., und Klambt, C. (2003). The *Drosophila* cell survival gene discs lost encodes a cytoplasmic Codanin-1-like protein, not a homolog of tight junction PDZ protein Patj. *Dev Cell* **5**, 841-51.
- Pittenger, M. F., Kazzaz, J. A., und Helfman, D. M. (1994). Functional properties of non-muscle tropomyosin isoforms. *Curr Opin Cell Biol* **6**, 96-104.
- Podsypanina, K., Ellenson, L. H., Nemes, A., Gu, J., Tamura, M., Yamada, K. M., Cordon-Cardo, C., Catoretti, G., Fisher, P. E., und Parsons, R. (1999). Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1563-8.
- Pollard, T. D., Doberstein, S. K., und Zot, H. G. (1991). Myosin-I. *Annu Rev Physiol* **53**, 653-81.
- Potter, C. J., Pedraza, L. G., und Xu, T. (2002). Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat Cell Biol* **4**, 658-65.
- Pratt, W. B., Silverstein, A. M., und Galigniana, M. D. (1999). A model for the cytoplasmic trafficking of signalling proteins involving the hsp90-binding immunophilins and p50cdc37. *Cell Signal* **11**, 839-51.
- Prokopenko, S. N., He, Y., Lu, Y., und Bellen, H. J. (2000). Mutations affecting the development of the peripheral nervous system in *Drosophila*: a molecular screen for novel proteins. *Genetics* **156**, 1691-715.
- Protopopov, V., Govindan, B., Novick, P., und Gerst, J. E. (1993). Homologs of the synaptobrevin/VAMP family of synaptic vesicle proteins function on the late secretory pathway in *S. cerevisiae*. *Cell* **74**, 855-61.
- Radanyi, C., Chambraud, B., und Baulieu, E. E. (1994). The ability of the immunophilin FKBP59-HBI to interact with the 90-kDa heat shock protein is encoded by its tetratricopeptide repeat domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11197-201.
- Radimerski, T., Montagne, J., Hemmings-Mieszczak, M., und Thomas, G. (2002). Lethality of *Drosophila* lacking TSC tumor suppressor function rescued by reducing dS6K signaling. *Genes Dev* **16**, 2627-32.
- Rameh, L. E., und Cantley, L. C. (1999). The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem* **274**, 8347-50.
- Ramrath, A. (2002). Isolierung und Charakterisierung von Bindungspartnern des PDZ-Domänen-Proteins BAZOOKA aus *Drosophila melanogaster*. *Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*.
- Rappleye, C. A., Tagawa, A., Lyczak, R., Bowerman, B., und Aroian, R. V. (2002). The anaphase-promoting complex and separin are required for embryonic anterior-posterior axis formation. *Dev Cell* **2**, 195-206.

- Rickert, P., Weiner, O. D., Wang, F., Bourne, H. R., und Servant, G. (2000). Leukocytes navigate by compass: roles of PI3Kgamma and its lipid products. *Trends Cell Biol* **10**, 466-73.
- Riparbelli, M. G., und Callaini, G. (1996). Meiotic spindle organization in fertilized *Drosophila* oocyte: presence of centrosomal components in the meiotic apparatus. *J Cell Sci* **109 (Pt 5)**, 911-8.
- Rolls, M. M., Albertson, R., Shih, H. P., Lee, C. Y., und Doe, C. Q. (2003). *Drosophila* aPKC regulates cell polarity and cell proliferation in neuroblasts and epithelia. *J Cell Biol* **163**, 1089-98.
- Rongo, C., und Lehmann, R. (1996). Regulated synthesis, transport and assembly of the *Drosophila* germ plasm. *Trends Genet* **12**, 102-9.
- Rorth, P. (1998). Gal4 in the *Drosophila* female germline. *Mech Dev* **78**, 113-8.
- Rosen, M. K., Standaert, R. F., Galat, A., Nakatsuka, M., und Schreiber, S. L. (1990). Inhibition of FKBP rotamase activity by immunosuppressant FK506: twisted amide surrogate. *Science* **248**, 863-6.
- Rosner, M., Hofer, K., Kubista, M., und Hengstschlager, M. (2003). Cell size regulation by the human TSC tumor suppressor proteins depends on PI3K and FKBP38. *Oncogene* **22**, 4786-98.
- Rossi, G., Salminen, A., Rice, L. M., Brunger, A. T., und Brennwald, P. (1997). Analysis of a yeast SNARE complex reveals remarkable similarity to the neuronal SNARE complex and a novel function for the C terminus of the SNAP-25 homolog, Sec9. *J Biol Chem* **272**, 16610-7.
- Roth, S. (2001). *Drosophila* oogenesis: coordinating germ line and soma. *Curr Biol* **11**, R779-81.
- Sadler, P. L., und Shakes, D. C. (2000). Anucleate *Caenorhabditis elegans* sperm can crawl, fertilize oocytes and direct anterior-posterior polarization of the 1-cell embryo. *Development* **127**, 355-66.
- Sanchez-Madrid, F., und del Pozo, M. A. (1999). Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *Embo J* **18**, 501-11.
- Schaefer, M., Shevchenko, A., und Knoblich, J. A. (2000). A protein complex containing Inscuteable and the Galpha-binding protein Pins orients asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Curr Biol* **10**, 353-62.
- Schiene-Fischer, C., und Yu, C. (2001). Receptor accessory folding helper enzymes: the functional role of peptidyl prolyl cis/trans isomerases. *FEBS Lett* **495**, 1-6.
- Schneider, I. (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol* **27**, 353-65.
- Schober, M., Schaefer, M., und Knoblich, J. A. (1999). Bazooka recruits Inscuteable to orient asymmetric cell divisions in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* **402**, 548-51.
- Schreiber, S. L. (1991). Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* **251**, 283-7.
- Sepehrnia, B., Paz, I. B., Dasgupta, G., und Momand, J. (1996). Heat shock protein 84 forms a complex with mutant p53 protein predominantly within a cytoplasmic compartment of the cell. *J Biol Chem* **271**, 15084-90.
- Servant, G., Weiner, O. D., Herzmark, P., Balla, T., Sedat, J. W., und Bourne, H. R. (2000). Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science* **287**, 1037-40.
- Shaw, P. E. (2002). Peptidyl-prolyl isomerases: a new twist to transcription. *EMBO Rep* **3**, 521-6.
- Shi, S. H., Jan, L. Y., und Jan, Y. N. (2003). Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell* **112**, 63-75.

- Sigal, N. H., und Dumont, F. J. (1992). Cyclosporin A, FK-506, and rapamycin: pharmacologic probes of lymphocyte signal transduction. *Annu Rev Immunol* **10**, 519-60.
- Skoufias, D. A., und Scholey, J. M. (1993). Cytoplasmic microtubule-based motor proteins. *Curr Opin Cell Biol* **5**, 95-104.
- Small, J. V. (1989). Microfilament-based motility in non-muscle cells. *Curr Opin Cell Biol* **1**, 75-9.
- Smith, A., Alrubaie, S., Coehlo, C., Leever, S. J., und Ashworth, A. (1999). Alternative splicing of the Drosophila PTEN gene. *Biochim Biophys Acta* **1447**, 313-7.
- Sollner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., und Rothman, J. E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* **362**, 318-24.
- Songyang, Z., Fanning, A. S., Fu, C., Xu, J., Marfatia, S. M., Chishti, A. H., Crompton, A., Chan, A. C., Anderson, J. M., und Cantley, L. C. (1997). Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* **275**, 73-7.
- Sotillos, S., Diaz-Meco, M. T., Caminero, E., Moscat, J., und Campuzano, S. (2004). DaPKC-dependent phosphorylation of Crumbs is required for epithelial cell polarity in Drosophila. *J Cell Biol* **166**, 549-57.
- Spana, E. P., und Doe, C. Q. (1995). The prospero transcription factor is asymmetrically localized to the cell cortex during neuroblast mitosis in Drosophila. *Development* **121**, 3187-95.
- Spradling, A. C. (1993a). Developmental genetics of oogenesis. Edited by Bate M, Martinez-Arias A. *The development of Drosophila melanogaster*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press., 1-70.
- Spradling, A. C. (1993b). Developmental genetics of oogenesis. In the Development of Drosophila melanogaster, Vol. 1 (ed. M. Bate and A. Martinez-Arias), pp. 1-70. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- St Johnston, D., Beuchle, D., und Nusslein-Volhard, C. (1991). Staufén, a gene required to localize maternal RNAs in the Drosophila egg. *Cell* **66**, 51-63.
- Stambolic, V., Suzuki, A., de la Pompa, J. L., Brothers, G. M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J. M., Siderovski, D. P., und Mak, T. W. (1998). Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* **95**, 29-39.
- Standaert, M. L., Bandyopadhyay, G., Kanoh, Y., Sajan, M. P., und Farese, R. V. (2001). Insulin and PIP3 activate PKC-zeta by mechanisms that are both dependent and independent of phosphorylation of activation loop (T410) and autophosphorylation (T560) sites. *Biochemistry* **40**, 249-55.
- Standaert, R. F., Galat, A., Verdine, G. L., und Schreiber, S. L. (1990). Molecular cloning and overexpression of the human FK506-binding protein FKBP. *Nature* **346**, 671-4.
- Steck, P. A., Pershouse, M. A., Jasser, S. A., Yung, W. K., Lin, H., Ligon, A. H., Langford, L. A., Baumgard, M. L., Hattier, T., Davis, T., Frye, C., Hu, R., Swedlund, B., Teng, D. H., und Tavtigian, S. V. (1997). Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* **15**, 356-62.
- Stocker, H., und Hafén, E. (2000). Genetic control of cell size. *Curr Opin Genet Dev* **10**, 529-35.
- Strand, D., Jakobs, R., Merdes, G., Neumann, B., Kalmes, A., Heid, H. W., Husmann, I., und Mechler, B. M. (1994). The Drosophila lethal(2)giant larvae tumor suppressor protein forms homo-oligomers and is associated with nonmuscle myosin II heavy chain. *J Cell Biol* **127**, 1361-73.

- Sullivan, W., und Theurkauf, W. E. (1995). The cytoskeleton and morphogenesis of the early *Drosophila* embryo. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 18-22.
- Tabuse, Y., Izumi, Y., Piano, F., Kemphues, K. J., Miwa, J., und Ohno, S. (1998). Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **125**, 3607-14.
- Tanentzapf, G., und Tepass, U. (2003). Interactions between the crumbs, lethal giant larvae and bazooka pathways in epithelial polarization. *Nat Cell Biol* **5**, 46-52.
- Tautz, D., und Pfeifle, C. (1989). A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma* **98**, 81-5.
- Tee, A. R., Fingar, D. C., Manning, B. D., Kwiatkowski, D. J., Cantley, L. C., und Blenis, J. (2002). Tuberosus sclerosis complex-1 and -2 gene products function together to inhibit mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated downstream signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13571-6.
- Tepass, U., und Knust, E. (1993). Crumbs and stardust act in a genetic pathway that controls the organization of epithelia in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **159**, 311-26.
- Tepass, U., Tanentzapf, G., Ward, R., und Fehon, R. (2001). Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* **35**, 747-84.
- Tetzlaff, M. T., Jackle, H., und Pankratz, M. J. (1996). Lack of *Drosophila* cytoskeletal tropomyosin affects head morphogenesis and the accumulation of oskar mRNA required for germ cell formation. *Embo J* **15**, 1247-54.
- Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., und Pickart, C. M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *Embo J* **19**, 94-102.
- Titus, M. A. (1993). Myosins. *Curr Opin Cell Biol* **5**, 77-81.
- Toker, A., und Newton, A. C. (2000). Cellular signaling: pivoting around PDK-1. *Cell* **103**, 185-8.
- Tomancak, P., Guichet, A., Zavorszky, P., und Ephrussi, A. (1998). Oocyte polarity depends on regulation of gurken by Vasa. *Development* **125**, 1723-32.
- Torres, J., und Pulido, R. (2001). The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation. *J Biol Chem* **276**, 993-8.
- Tram, U., Riggs, B., und Sullivan, W. (2002). Cleavage and Gastrulation in *Drosophila* Embryos. *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Tsunoda, S., Sierralta, J., Sun, Y., Bodner, R., Suzuki, E., Becker, A., Socolich, M., und Zuker, C. S. (1997). A multivalent PDZ-domain protein assembles signalling complexes in a G-protein-coupled cascade. *Nature* **388**, 243-9.
- Vaccari, T., und Ephrussi, A. (2002). The fusome and microtubules enrich Par-1 in the oocyte, where it effects polarization in conjunction with Par-3, BicD, Egl, and dynein. *Curr Biol* **12**, 1524-8.
- Vale, R. D., Reese, T. S., und Sheetz, M. P. (1985). Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* **42**, 39-50.
- van Eeden, F., und St Johnston, D. (1999). The polarisation of the anterior-posterior and dorsal-ventral axes during *Drosophila* oogenesis. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 396-404.
- van Nocker, S., Deveraux, Q., Rechsteiner, M., und Vierstra, R. D. (1996). Arabidopsis MBP1 gene encodes a conserved ubiquitin recognition component of the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 856-60.
- van Slegtenhorst, M., Nellist, M., Nagelkerken, B., Cheadle, J., Snell, R., van den Ouweland, A., Reuser, A., Sampson, J., Halley, D., und van der Sluijs, P. (1998). Interaction between hamartin and tuberlin, the TSC1 and TSC2 gene products. *Hum Mol Genet* **7**, 1053-7.

- von Dassow, G., und Schubiger, G. (1994). How an actin network might cause fountain streaming and nuclear migration in the syncytial *Drosophila* embryo. *J Cell Biol* **127**, 1637-53.
- von Stein, W. (2001). Isolation und funktionelle Analyse von Bindungspartnern des Bazooka-Proteins aus *Drosophila* mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System. *Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*.
- von Stein, W., Ramrath, A., Grimm, A., Müller-Borg, M., und Wodarz, A. (2005). Direct association of Bazooka/PAR-3 with the lipid phosphatase PTEN reveals a link between the PAR/aPKC complex and phosphoinositide signaling. *Development* **132**, 1675-86.
- Wallenfang, M. R., und Seydoux, G. (2000). Polarization of the anterior-posterior axis of *C. elegans* is a microtubule-directed process. *Nature* **408**, 89-92.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A., und Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* **10**, 506-13.
- Wang, F., Herzmark, P., Weiner, O. D., Srinivasan, S., Servant, G., und Bourne, H. R. (2002). Lipid products of PI(3)Ks maintain persistent cell polarity and directed motility in neutrophils. *Nat Cell Biol* **4**, 513-8.
- Warn, R. M., und Magrath, R. (1983). F-actin distribution during the cellularization of the *Drosophila* embryo visualized with FL-phalloidin. *Exp Cell Res* **143**, 103-14.
- Warn, R. M., Magrath, R., und Webb, S. (1984). Distribution of F-actin during cleavage of the *Drosophila* syncytial blastoderm. *J Cell Biol* **98**, 156-62.
- Wegner, A. (1976). Head to tail polymerization of actin. *J Mol Biol* **108**, 139-50.
- Weinert, T. A., und Hartwell, L. H. (1988). The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **241**, 317-22.
- Wheatley, S., Kulkarni, S., und Karess, R. (1995). *Drosophila* nonmuscle myosin II is required for rapid cytoplasmic transport during oogenesis and for axial nuclear migration in early embryos. *Development* **121**, 1937-46.
- White, M. F. (1998). The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem* **182**, 3-11.
- Wodarz, A. (2002). Establishing cell polarity in development. *Nat Cell Biol* **4**, E39-44.
- Wodarz, A., und Huttner, W. B. (2003). Asymmetric cell division during neurogenesis in *Drosophila* and vertebrates. *Mech Dev* **120**, 1297-309.
- Wodarz, A., Ramrath, A., Grimm, A., und Knust, E. (2000). *Drosophila* atypical protein kinase C associates with Bazooka and controls polarity of epithelia and neuroblasts. *J Cell Biol* **150**, 1361-74.
- Wodarz, A., Ramrath, A., Kuchinke, U., und Knust, E. (1999). Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* **402**, 544-7.
- Wolfner, M. F. (1997). Tokens of love: functions and regulation of *Drosophila* male accessory gland products. *Insect Biochem Mol Biol* **27**, 179-92.
- Woods, D. F., und Bryant, P. J. (1991). The discs-large tumor suppressor gene of *Drosophila* encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. *Cell* **66**, 451-64.
- Wu, X., Hepner, K., Castelino-Prabhu, S., Do, D., Kaye, M. B., Yuan, X. J., Wood, J., Ross, C., Sawyers, C. L., und Whang, Y. E. (2000a). Evidence for regulation of the PTEN tumor suppressor by a membrane-localized multi-PDZ domain containing scaffold protein MAGI-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4233-8.
- Wu, Y., Dowbenko, D., Spencer, S., Laura, R., Lee, J., Gu, Q., und Lasky, L. A. (2000b). Interaction of the tumor suppressor PTEN/MMAC with a PDZ domain of MAGI3, a novel membrane-associated guanylate kinase. *J Biol Chem* **275**, 21477-85.

- Yamamoto, A., Guacci, V., und Koshland, D. (1996a). Pds1p is required for faithful execution of anaphase in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **133**, 85-97.
- Yamamoto, A., Guacci, V., und Koshland, D. (1996b). Pds1p, an inhibitor of anaphase in budding yeast, plays a critical role in the APC and checkpoint pathway(s). *J Cell Biol* **133**, 99-110.
- Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Suzuki, A., Sugiyama, Y., Kitamura, K., Maniwa, R., Nagai, Y., Yamashita, A., Hirose, T., Ishikawa, H., und Ohno, S. (2001). PAR-6 regulates aPKC activity in a novel way and mediates cell-cell contact-induced formation of the epithelial junctional complex. *Genes Cells* **6**, 721-31.
- Yin, H. L., und Janmey, P. A. (2003). Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Physiol* **65**, 761-89.
- Yu, F., Cai, Y., Kaushik, R., Yang, X., und Chia, W. (2003). Distinct roles of Galphai and Gbeta13F subunits of the heterotrimeric G protein complex in the mediation of *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions. *J Cell Biol* **162**, 623-33.
- Yu, F., Morin, X., Cai, Y., Yang, X., und Chia, W. (2000). Analysis of partner of inscuteable, a novel player of *Drosophila* asymmetric divisions, reveals two distinct steps in inscuteable apical localization. *Cell* **100**, 399-409.
- Zaffran, S. (2000). Molecular cloning and embryonic expression of dFKBP59, a novel *Drosophila* FK506-binding protein. *Gene* **246**, 103-9.
- Zalokar, M., Audit, C., und Erk, I. (1975). Developmental defects of female-sterile mutants of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **47**, 419-32.
- Zalokar, M., und Erk, I. (1976). Division and migration of nuclei during early embryogenesis of *Drosophila melanogaster*. *J. Mic. Biol. Cell* **23**, 97-106.
- Zheng, Y. (2001). Dbl family guanine nucleotide exchange factors. *Trends Biochem Sci* **26**, 724-32.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

α -...	anti-...
Abb.	Abbildung
ähnl.	Ähnlich
anschl.	anschließend
Anz.	Anzahl
Bal.	Balancer
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
ca.	circa
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
Evtl.	eventuell
g	Gramm
Genom.	Genomisch
HRP	Meerrettich Peroxidase
Lsg	Lösung
m...	milli...(10 ⁻³)
M	Molarität (mol/l)
min	Minuten
NHS	Normal Horse Serum
Hm	homozygot
μ ...	mikro...(10 ⁻⁶)
°C	Grad Celsius
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
St.-Lsg	Stamm-Lösung
Tab.	Tabelle
U	Unit
u.a.	unter anderem
UV-Licht	ultraviolettes Licht
ü/N	über Nacht
Verd.	Verdünnung
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
wt	wild-typ
z. T.	zum Teil
z. Z.	zur Zeit

Erklärung

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

Düsseldorf, im Dezember 2005

von Stein, W., Ramrath, A., Grimm, A., Muller-Borg, M., und Wodarz, A. (2005). Direct association of Bazooka/PAR-3 with the lipid phosphatase PTEN reveals a link between the PAR/aPKC complex and phosphoinositide signaling. *Development* **132**, 1675-86.

Danksagung

Diese Arbeit ist am Institut für Genetik der Heinrich-Heine-Universität unter Anleitung von Prof. Dr. Andreas Wodarz angefertigt worden. Ihm möchte ich für die Überlassung des Themas, die lehrreichen Diskussionen und die Unterstützung danken. Prof. Dr. R. Simons danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Vielen Dank an das gesamte Institut für eine hervorragende Atmosphäre (Arbeit und Freizeit).

Herzlichsten Dank an alle Mitglieder des A-Team Labs: Rammi, Alex, Marion, Nora, Soya, Tanja und Sabine. Auch der „next Generation“, Andreas und Anna, gilt mein Dank. Im A-Team Lab herrschte dank dieser Besetzung immer eine gute Stimmung und man stand sich mit Rat und Tat zur Seite.

Vielen Dank auch an Andre, Olaf und Arno. Ferdi, danke, daß Du mich wieder in den Fußballverteiler aufgenommen hast.

Meinen Eltern danke ich dafür, daß sie mich in allen Lebenslagen unterstützt haben.

Das größte Dankeschön geht an meine liebe Frau Heidi. Trotz einiger Rückschläge hat sie immer zu mir gehalten. Bei ihr und meinen Eltern möchte ich mich nicht nur bedanken, sondern auch für einiges entschuldigen.

Ein großer Dank auch an meine Kinder Alexandra und Konstantin, die es auch in den schwierigsten Lagen immer wieder geschafft haben mich aufzumuntern.