

**Funktion und Wechselwirkungen der
Crumbs und Bazooka Komplexe in
Epithelien von
*Drosophila melanogaster***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Özlem Kempkens

aus Monheim

November 2005

Aus dem Institut für Genetik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referentin: Prof. Dr. E. Knust

Koreferent: Prof. Dr. J.F. Ernst

Tag der mündlichen Prüfung: 18.01.2006

Für meine Familie

1	Einleitung	1
1.1	Epithelien	1
1.1.1	Die Polarität der Epithelzellen umfasst verschiedene Merkmale.....	1
1.1.2	Zell-Verbindungsstrukturen erfüllen unterschiedliche Aufgaben.....	2
1.2	Epithelien in <i>Drosophila</i>	3
1.2.1	Zell-Verbindungsstrukturen und Membrandomänen in <i>Drosophila</i>	4
1.3	Bildung epithelialer Polarität in Säugern und <i>Drosophila</i>	5
1.4	Die Bazooka, Crumbs und Discs large Komplexe arbeiten zusammen in der Bildung der apiko-basalen Polarität	6
1.5	Organisation des Crb Komplexes.....	9
1.6	Sdt gehört zu der Familie der MAGUK (Membrane-Associated Guanylat kinase) Proteine.....	10
1.7	Zielsetzung:	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Chemikalien und sonstige Materialien	13
2.1.1	Bakterienstämme	14
2.1.2	Vektoren	14
2.1.3	Verwendete Oligonukleotide.....	15
2.1.4	Herstellung der verwendeten Plasmid-Konstrukte.....	16
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	17
2.2.1	Herstellung elektrokompenter Zellen	17
2.2.2	Transformation elektrokompenter Zellen.....	18
2.2.3	Isolierung von DNA	18
2.2.3.1	Präparation von Plasmid-DNA.....	18
2.2.4	PCR (Polymerase-Kettenreaktion).....	19
2.2.4.1	Standard-PCR.....	20
2.2.5	Aufreinigung der PCR-Produkte	21
2.2.6	Gelelution	21
2.2.7	Restriktionsverdau und Ligation	21
2.3	Proteinbiochemische Methoden:	22
2.3.1	Herstellung von Embryonenextrakten.....	22
2.3.2	Präadsorbition der Embryonenextrakte an Gluthation-Sepharose-Beads	22
2.3.3	GST-Pulldown mit Proteinen aus Embryonenextrakten	22
2.3.4	Herstellung von GST-Fusionsproteinen.....	23
2.3.5	<i>In vitro</i> Transkriptions-/Translationsreaktion	24
2.3.6	SDS-PAGE-Gelelektrophorese und Western-blotting	24
2.3.7	Erzeugung eines gegen den N-Terminus und die L27C Domäne von Sdt gerichteten Antikörpers	25
2.4	Hefe-Zwei-Hybrid System	26
2.4.1	LiAc vermittelte Transformation von Plasmid DNA in <i>S. cerevisiae</i>	26
2.4.2	Qualitative Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität mit Hilfe des <i>colony-lift filter assay</i>	28
2.4.3	Quantitative Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität	29
2.5	Mikromanipulation von <i>Drosophila melanogaster</i>	30
2.5.1	Keimbahntransformation.....	30
2.5.1.1	Herstellung des Injektionsmixes	30
2.5.1.2	Herstellung der Injektionskapillaren	30
2.5.1.3	Mikroinjektion.....	31
2.5.1.4	Isolierung und Balancierung transgener Fliegen.....	32
2.6	Genetische Methoden.....	32
2.6.1	Fliegenzucht	32

2.6.2	Fliegenstämme, Chromosomen und Allele	33
2.6.2.1	Balancer-Chromosomen	33
2.6.2.2	Mutante Fliegenstämme	33
2.6.2.3	Gal4-Aktivatorlinien	34
2.6.3	Das Gal4/UAS-System	36
2.6.4	Erzeugung von Keimbahnklon-(Kbk) Embryonen	37
2.7	Histologische Methoden	38
2.7.1	Antikörperfärbung an Embryonen	39
2.7.2	Modifizierung des Standardprotokolls	40
2.7.3	Hitzeфикierung	40
2.7.4	Antikörperfärbungen an Flügelimaginalscheiben des dritten Larvalstadiums	41
2.7.5	Präparation embryonaler Kutikula	41
3	Ergebnisse	42
3.1	Komponenten des Crumbs und Bazooka Komplexes kolokalisieren in embryonalen Epithelien	42
3.2	Proteine der subapikalen Region interagieren im Hefe-Zwei-Hybrid System	43
3.2.1	Interaktionen des Crb und Bazooka Komplexes	44
3.2.1.1	Crb und <i>DmPar-6</i> interagieren	44
3.2.1.2	<i>Sdt1-566</i> interagiert mit der PDZ Domäne von <i>DmPar-6</i>	46
3.2.1.3	Crb und <i>Sdt</i> binden nicht <i>DaPKC</i> und <i>Baz</i>	47
3.2.1.4	<i>DmPar-6</i> bindet nicht <i>DPATJ</i> im Hefe-Zwei-Hybrid System	49
3.2.2	Interaktionen zwischen Proteinen des Crb Komplexes	50
3.2.2.1	Die L27N Domäne von <i>Sdt</i> interagiert mit der L27 Domäne von <i>DPATJ</i> ..	50
3.2.2.2	Die intrazelluläre Domäne von Crb dimerisiert nicht	51
3.2.2.3	Die SH3 und Hook-GUK Domänen von <i>Sdt</i> bilden inter- und intramolekulare Bindungen aus	52
3.2.3	Quantifizierung der Bindungsstärken der identifizierten Interaktionen des Crb und <i>Baz</i> Komplexes	54
3.2.4	Crb und <i>Stardust</i> binden an <i>DmPar-6</i> im GST-Pulldown	55
3.2.5	Die Lokalisation von <i>DmPar-6</i> und Crb hängen voneinander ab	57
3.2.6	Die Überexpression von Crb führt zur Fehlverteilung von <i>DmPar-6</i> und <i>DaPKC</i> ..	59
3.2.7	Die Überexpression von <i>Sdt</i> führt in Flügel-Imaginalscheiben zu einer Fehlverteilung von <i>DPATJ</i>	60
3.3	Struktur-Funktions-Analyse der <i>Sdt</i> -MAGUK Isoform und funktionelle Analyse der <i>Sdt</i> -B- Isoform sowie des <i>hMPP5</i>	62
3.3.1	Etablierung transgener Linien mit den <i>Sdt</i> / <i>hMPP5</i> -Effektorkonstrukten	64
3.3.2	Die Überexpression von <i>Stardust</i> mit dem Aktivator <i>Gal4^{daG32}</i> führt mit unterschiedlicher Penetranz zu embryonaler Letalität	64
3.3.3	Embryonale Phänotypen als Folge einer Überexpression von <i>Stardust</i>	66
3.3.4	Lokalisationsanalyse von <i>Sdt</i>	68
3.3.5	Die Überexpression von <i>Stardust</i> führt zu einer Umverteilung von <i>DPATJ</i> , jedoch nicht zu einer Fehlverteilung von Crb, <i>DmPar-6</i> oder endogenem <i>Sdt</i>	71
3.3.6	Der <i>sdt^{EH681}</i> mutante embryonale Phänotyp wird teilweise durch die Überexpression von <i>Sdt</i> abgeschwächt	72
3.3.7	Bestimmung der embryonalen Letalitätsrate nach Überexpression von <i>Sdt</i> im <i>sdt^{EH681}</i> mutanten Hintergrund	77
3.3.8	Welche Auswirkung haben die verschiedenen <i>Sdt</i> - Varianten nach Überexpression?	80
4	Diskussion	85

4.1	Die Mitglieder des Baz (PAR-3) und Crb (CRB) Komplexes und ihre molekularen Wechselwirkungen sind konserviert	85
4.1.1	Modell der Funktion der Baz und Crb Komplexe in embryonalen Epithelien von <i>Drosophila</i>	89
4.2	Struktur-Funktions-Analyse von Stardust.....	91
4.2.1	Die Lokalisation von Sdt an der Plasmamembran ist abhängig von seinem N-Terminus oder der L27C Domäne.....	92
4.2.2	Für die Aufrechterhaltung der Zellpolarität sind die PDZ, SH3 und GUK Domänen von Sdt essentiell	94
4.2.3	Die Überexpression von Sdt führt zu dominanten Effekten	95
4.2.4	Die Überexpression von Sdt führt zu dominant aktiven und negativen Effekten während der Ontogenese von <i>Drosophila</i>	98
4.2.5	hMPP5 rettet den <i>sdt</i> mutanten Phänotypen nicht	98
4.3	Ausblick	100
5	Zusammenfassung:.....	101
6	Literatur	102
7	Anhang	118
7.1	Abkürzungsverzeichnis	118
7.2	Hergestellte UAS- <i>sdt</i> -Effektorlinien.....	119
7.3	Verwendete Plasmid-Konstrukte.....	121

1 Einleitung

Die Entstehung und Aufrechterhaltung von Zellpolarität ist ein grundlegendes Merkmal einzelliger sowie mehrzelliger Organismen. In einigen Organismen beschränkt sie sich auf die Zellteilung, wie es für viele Prokaryonten der Fall ist. Zellen, die zunächst isotrop sind, müssen ihre Symmetrie aufgeben, um eine Polarisationsachse zu entwickeln. Dies kann z.B. spontan oder durch ein externes Signal geschehen, wie durch den Eintritt eines Spermiums oder den initialen Kontakt zwischen zwei isolierten Zellen (Übersichtsartikel von Macara, 2004).

Während der Entwicklung der Metazoa ist Zellpolarität essentiell für die zeitliche und räumliche Regulation der Zell- und Gewebeentwicklung .

1.1 Epithelien

Epithelzellen bilden zusammenhängende Zellschichten, die als Epithelien (Abschlussgewebe) bezeichnet werden. Sie trennen verschiedene Kompartimente eines Organismus voneinander oder schließen ihn zur Außenwelt hin ab.

Epithelgewebe können dabei sehr unterschiedliche Funktionen haben, z.B. Schutzfunktion (Epidermis der Haut), selektive Sekretion oder Aufnahme (Drüsen- oder Darmepithel) oder Sinneswahrnehmung (Retina) (Übersichtsartikel von Rodriguez-Boulan und Nelson, 1989).

1.1.1 Die Polarität der Epithelzellen umfasst verschiedene Merkmale

Epithelzellen brauchen spezialisierte Zell-Adhäsions-Komplexe und die Organisation des Zytoskeletts, um Zell-Zell-Adhäsion und Verbindungen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix (ECM) zu ermöglichen.

Ein weiteres charakteristisches Merkmal der Epithelien ist die Unterteilung der Plasmamembran in strukturell und funktionell unterschiedliche Domänen, die als apikal und basolateral bezeichnet werden. Jede Domäne besitzt eine unterschiedliche Protein- und Lipidzusammensetzung, die wichtig für die Regulation des Ionen- und Stoff-Transports der Epithelzellen ist.

Die unterschiedliche Verteilung der Membranproteine auf die apikalen und basolateralen Plasmamembrandomänen wird durch gerichteten Transport und selektive Stabilisierung etabliert und aufrechterhalten.

1.1.2 Zell-Verbindungsstrukturen erfüllen unterschiedliche Aufgaben

Neben ihrer Polarität sind Zell-Verbindungsstrukturen für die Funktion der Epithelzellen unabdingbar. Sie sind wichtig für vektoriellen Transport, Adhäsion und Kommunikation und die morphogenetischen Eigenschaften von Epithelien (Übersichtsartikel von Müller und Bossinger, 2003). Zell-Kontaktstrukturen können Zellen untereinander und Zellen mit der darunterliegenden extrazellulären Matrix (ECM) verbinden und lassen sich in drei Gruppen unterteilen: undurchlässige Zell-Verbindungsstrukturen (*tight junctions* oder *zonula occludens* der Vertebraten, *septate junctions* der Invertebraten), Haftverbindungen (*adherens junctions* oder *zonula adherens* und Desmosomen) und kommunizierende Verbindungen (*gap junctions*).

Bei den undurchlässigen Zell-Verbindungsstrukturen handelt es sich um die *tight junctions* der Vertebraten und die *septate junctions* der Invertebraten. In ihrer Funktion als Diffusionsbarriere zwischen zwei biologischen Kompartimenten verhindern sie zum einen eine unkontrollierte Diffusion zwischen zweier benachbarter Zellen (interzellulärer Transport) und zum anderen die Diffusion zwischen apikaler und basolateraler Domäne der Plasmamembran (parazellulärer Transport) (Übersichtsartikel von Eaton und Simons, 1995; Gumbiner, 1996; Nelson, 1992; Müller und Bossinger, 2003). Zu den Proteinen, die wichtig für die Bildung und Stabilisierung der *tight junctions* sind, gehören ZO1-3 (*zonula occludens protein*), JAM (*junction associated molecule*), Claudine und Occludine sowie die Mitglieder des PAR-3 und CRB Komplexes.

Haftverbindungen verbinden Zytoskelettbestandteile zweier benachbarter Zellen oder einer Zelle mit der extrazellulären Matrix (ECM). Zu dieser Gruppe gehört die *adherens junction* oder auch *zonula adherens* (ZA), die am häufigsten vorkommende Zell-Kontakt-Struktur in Epithelien. Sie ist in Vertebraten apikal in einem Gürtel unterhalb der *tight junctions* angeordnet und für die Adhäsion benachbarter Zellen zuständig. Für die Bildung dieser Adhäsionskontakte werden homophile Interaktionen zwischen dem extrazellulären Anteil von Ca^{2+} -abhängigen Cadherin-Molekülen benötigt, die über Adaptermoleküle wie α -, β - und γ -Catenin zusätzlich intrazellulär den Kontakt zum Aktinnetzwerk herstellen (Aberle et al., 1996; Übersichtsartikel von Gumbiner, 1996).

In Desmosomen, ebenfalls Haftverbindungen, vermitteln Desmogleine und Desmocolline, Mitglieder der Cadherin-Superfamilie, die Adhäsion zwischen benachbarten Zellen und stehen über Intermediärfilamente mit dem Zytoskelett der Zellen in Kontakt (Gumbiner, 1996).

Hemidesmosomen verbinden die Basallamina mit den zellulären Keratin-Intermediärfilamenten. Ein spezielles Integrin stellt hierbei den Adhäsionsvermittler dar und bindet extrazellulär an Laminin. Der Kontakt zur ECM über Zell-Substrat-Kontakte an der basalen Plasmamembran wird über Integrine, heterodimere Transmembranrezeptoren, die in verschiedener Weise mit dem Zytoskelett in Verbindung stehen können, erreicht (Hynes, 1992). Sie können in hemi *adherens junctions* über aktinbindende Proteine wie Talin oder α -Actinin mit dem Aktinzytoskelett verbunden sein oder in Hemi-Desmosomen über Adaptermoleküle mit den Intermediärfilamenten (Hynes, 1992). Extrazellulär sind in Desmosomen Komponenten der ECM wie Fibronectin, Vitronectin, Laminin oder Kollagen gebunden. Als kommunizierende Zell-Verbindungsstrukturen (*gap junctions*) werden die Zell-Kontakte zusammengefasst, die einen Transport von Ionen und kleinen Molekülen von Zelle zu Zelle ermöglichen. Wichtig für diese Art der Verbindungs-Kontakte sind die Connexine, die einen als Connexon bezeichneten Hohlzylinder zwischen der Plasmamembran zweier benachbarter Zellen bilden (Übersichtsartikel von Bryant, 1997).

1.2 Epithelien in *Drosophila*

Wie in vielen Arthropoden teilen sich die centrolecitalen Eier von *Drosophila* superfiziell (Foe et al., 1993). Die Zellularisierung erfolgt in der Interphase des mitotischen Zykluses 14 und führt zur Bildung einer einfachen epithelialen Zellschicht, des sogenannten zellulären Blastoderms (Mazumdar und Mazumdar, 2002).

Alle Epithelien, die direkt aus dem Blastoderm hervorgehen, werden als primäre Epithelien bezeichnet. Zu ihnen gehören die Epidermis, Tracheen, Vorder- und Hinterdarm, Malpighische Gefäße und Speicheldrüsen. Besondere Merkmale primärer Epithelien sind das Vorhandensein einer ZA und die Expression des Crumbs (Crb) Proteins. Epithelien, die aus nicht polarisiertem mesenchymalem Gewebe entstehen, werden als sekundäre Epithelien bezeichnet. Zu ihnen gehören das Mitteldarmgewebe und das dorsale Gefäß. Im Gegensatz zu primären Epithelien besitzen sekundäre keine ZA und zeigen keine Crb Expression (Übersichtsartikel von Tepass, 1997).

1.2.1 Zell-Verbindungsstrukturen und Membrandomänen in *Drosophila*

Arthropoden, wie *Drosophila melanogaster*, besitzen, ebenso wie Vertebraten, *gap junctions* und *adherens junctions*, jedoch keine Desmosomen oder *tight junctions* (Übersichtsartikel von Tepass, 1997; Müller, 2000; Bryant, 1997). Stattdessen findet man in Arthropoden *septate junctions* (SJs), von denen angenommen wird, dass sie die Funktion der *tight junctions* übernehmen können. Sie verteilen sich jedoch, anders als *tight junctions*, die in Vertebraten noch oberhalb der ZA lokalisiert sind, über einen größeren Bereich der lateralen Membran unterhalb der *zonula adherens* (ZA). Bei *Drosophila* lassen sich diese septierten Zellverbindungen auf elektronenmikroskopischer Ebene ab Stadium 14 erkennen, und es lassen sich zwei Klassen von Septen unterscheiden. Epithelien ektodermalen Ursprungs weisen *pleated septate junctions* auf, wohingegen die *smooth septate junctions* überwiegend im Endoderm auftreten. Neben ihrer Barrierefunktion der parazellulären Diffusion haben die *septate junctions* noch weitere Rollen im Erhalt der epithelialen Polarität und der Zelladhäsion in *Drosophila* (Woods et al., 1996). Proteine der *septate junctions* stellen Discs large (Dlg), Scribble und Lethal giant larvae (Lgl), Tamou, Coracle sowie die Transmembranproteine Fasciclin III und Neurexin IV, Contactin und Neuroglian IV dar (Übersichtsartikel von Bryant, 1997; Cereijido et al., 2004; Faivre-Sarrailh et al., 2004).

Die subapikale Region von *Drosophila* (SAR) ist eine Membrandomäne, die den *tight junctions* der Vertebraten in zwei Aspekten ähnelt: sie lokalisiert wie die *tight junctions* apikal zur ZA und enthält homologe Proteinkomplexe, wie z.B. Mitglieder der Crb und Baz Komplexe (Abb.1).

Desmosomen kommen in *Drosophila* nicht vor, was sich dadurch erklären lässt, dass es in *Drosophila* keine Intermediärfilamente gibt (Übersichtsartikel von Tepass, 1997; Müller, 2000).

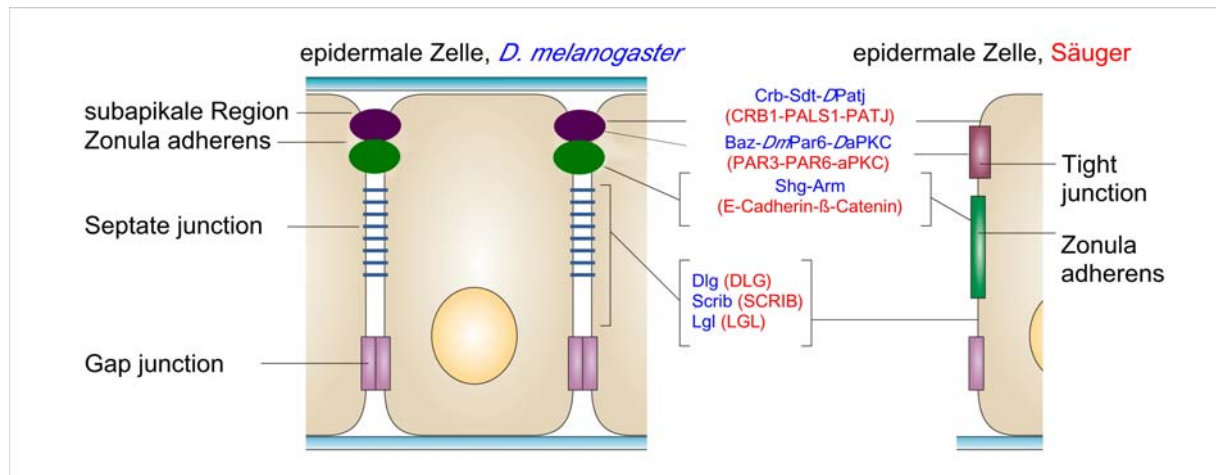


Abb. 1.1 Vergleich der Proteinkomplexe an Zellkontakten einer Epithelzelle von *Drosophila* und Säugern

Die konservierten Proteinkomplexe in Zellkontakten einer Epithelzelle von *Drosophila* und Säugern mit den dort lokalisierenden Proteinkomplexen sind schematisch dargestellt. In *Drosophila* gibt es die subapikale Region, die in ihrer Proteinzusammensetzung teilweise vergleichbar mit der *tight junction* der Säuger ist. Verwendete Abkürzungen für die in blau gekennzeichneten *Drosophila*-Proteine: Crb, Crumbs; Sdt, Stardust; DPATJ, *Drosophila* PATJ-Homolog; Baz, Bazooka; DmPar-6, *Drosophila* Par6-Homolog, DaPKC, *Drosophila*-Homolog der atypischen Proteinkinase Kinase C; Shg, Shotgun= DE-Cadherin; Arm, Armadillo=β-Catenin; Dlg, Discs large; Scrib, Scribble; Lgl, Lethal giant larvae. Die Säugerhomologe sind in rot geschrieben. (modifiziert nach Macara, 2004b und Wasserscheidt, 2005).

1.3 Bildung epithelialer Polarität in Säugern und *Drosophila*

In der Maus sind Anzeichen epithelialer Polarität im 8-Zellstadium zu sehen. Das ist der Zeitpunkt, zu dem E-Cadherin als Adhäsions-Molekül funktionell wird und die ersten Zell-Zellverbindungen ausbildet (Übersichtsartikel von Le Bivic, 2005). Wird seine Aktivität durch Antikörper blockiert, so wird die Epithelentwicklung verhindert (Johnson et al., 1986). Aufgrund dieser Beobachtung und weiteren *in vitro* Studien wurde E-Cadherin eine besondere Rolle in der Organisation der Plasmamembran zugeschrieben, weil es sowohl das kortikale Zytoskelett als auch seine eigene räumliche Verteilung zu organisieren vermag (McNeill et al., 1990 und Übersichtsartikel von Nelson, 2003). Polarität kann in Abwesenheit von *adherens junctions* vorhanden sein, wie es für Neuronen und Spermatoiden sowie Zygoten vieler Spezies der Fall ist, die kortikale Komponenten zu anterioren und und posterioren Polen verteilen können (Doe et al., 2001). Die Entdeckung der *par* (*partitioning defective*) Gene in *C.elegans* erlaubte die Analyse der asymmetrischen Verteilung zellulärer Komponenten (Kemphues et al., 1988). Für sieben Gene, *par-1* bis *par-6* und *pkc-3*, konnte gezeigt werden, dass sie die antero-posteriore Polarität und die erste asymmetrische Zellteilung des Ein-Zell-Stadiums im *C. elegans* Embryo kontrollieren. Die *par* Gene sind ebenfalls in *Drosophila* konserviert. Sie haben eine Funktion in der asymmetrischen Teilung der Neuroblasten sowie der Entstehung der Polarität während der Oogenese in *Drosophila* (Betschinger et al., 2003; Hutterer et al., 2004; Kuchinke et al., 1998; Petronczki und

Knoblich, 2001; Wodarz et al., 2000; Wodarz et al., 1999). Die *par*-Gene sind ebenfalls in der Etablierung und Aufrechterhaltung epithelialer Polarität in Fliegen und auch in Säugern involviert (Übersichtsartikel von Macara, 2004a).

Das erste Epithel, das sich in *Drosophila* bildet, ist das zelluläre Blastoderm. Während der Zellularisierung entstehen laterale und basale Verbindungsstrukturen entlang der sich verlängernden Furchungskanäle, in denen sich DE-Cadherin anreichert. Bazooka hingegen reichert sich nur im apikalen Bereich der Furchungskanäle an. In *shotgun* (DE-Cadherin) oder *armadillo* (β -Catenin) mutanten Embryonen ist *bazooka* (*baz*) während der Zellularisierung immer noch trotz Abwesenheit der *adherens junctions* richtig lokalisiert. In *baz* Mutanten jedoch wird DE-Cadherin nicht mehr an der apiko-lateralen Domäne verteilt, was darauf hindeutet, dass *baz* epistatisch zu DE-Cadherin und notwendig für dessen Lokalisation in den *adherens junctions* ist (Harris und Peifer, 2004). Während der Zellularisierung bilden sich an der lateralen Zelloberfläche *spot adherens junctions* aus, die Vorläufer der ZA darstellen. Diese punktförmigen Strukturen verschmelzen zum Zeitpunkt der Gastrulation zur ZA, die den Zellapex gürtelförmig umschließt. Die Bildung der ZA geht einher mit der Entstehung epithelialer Polarität, der Trennung apikaler und basolateraler Membrandomänen (Übersichtsartikel von Tepass, 2002).

1.4 Die Bazooka, Crumbs und Discs large Komplexe arbeiten zusammen in der Bildung der apiko-basalen Polarität

Genetische Analysen konnten drei Komplexe identifizieren, deren Zusammenarbeit für die Bildung der ZA und der apikobasalen Polarität notwendig sind. Hierzu gehören der Crb Komplex, der aus den Mitgliedern Crumbs (Crb), Stardust (Sdt), DPATJ und D Δ Lin-7 besteht. Der Baz Komplex enthält die Proteine Bazooka (Baz), *Drosophila* atypical protein kinase C (DaPKC), DmPar-6 und DCdc-42. Im dritten Komplex, dem Discs large Komplex, werden Discs large (Dlg), Scribble (Scrib) und Lethal giant larvae (Lgl) zusammengefasst.

Mit Ausnahme des Transmembranproteins Crb sind alle anderen Proteine zytosolische Proteine mit jeweils mehreren Protein-Protein-Interaktionsdomänen. Interessanterweise besitzen sieben von elf dieser Proteine mindestens eine PDZ (Postsynaptic density 95/ Discs large/ Zonula occludens1) Domäne, ein Protein Motiv, das gewöhnlich in Proteinen vorkommt, die in Signalprozesse an interzellulären Verbindungen und Synapsen involviert sind (Bezprozvanny und Maximov, 2002; Übersichtsartikel von Cereijido, 2004). Der Verlust der *baz* Funktion führt im *Drosophila* Embryo zu einer starken Reduktion der

Kernkomponenten der *adherens junctions*. Dies verhindert die Bildung der ZA und führt zu einem Phänotyp, der an Verlustmutationen von *armadillo* erinnert (Müller et al., 1996). In *baz* Mutanten sind apikale Polaritätsmarker reduziert und entlang der gesamten basolateralen Membran fehlverteilt (Bilder et al., 2003). Zusätzlich runden sich die Zellen ab, und die Epidermis wird mehrschichtig (Bilder et al., 2003; Müller und Wieschaus, 1996). Später in der Embryonalentwicklung sterben die meisten epidermalen Zellen durch Apoptose. Sehr ähnliche Phänotypen wurden für *DaPKC* und *DmPar-6* mutante Embryonen beobachtet (Wodarz et al., 2000; Petronczki und Knoblich, 2001). Die Phänotypen der *crb* und *sdt* mutanten Embryonen ähneln dem von *baz* mutanten Embryonen in vielerlei Hinsicht. Allerdings kommen die mutanten Phänotypen von *sdt* und *crb* etwas später zur Ausprägung (Bilder et al., 2003; Müller und Wieschaus, 1996; Müller, 2000), was darauf hindeutet, dass *baz* epistatisch zu *crb* ist. Die Proteine der Crb und Baz Komplexe lokalisieren an der apikalen Plasmamembran und sind angereichert in der subapikalen Region, die oberhalb der ZA liegt (Wodarz et al., 2000; Petronczki und Knoblich, 2001; Bachmann et al., 2001; Hong et al., 2001). Crb ist in *baz* mutanten Embryonen nicht mehr an der apikalen Membran verteilt, wohingegen Baz in *crb* mutanten im selben Entwicklungsstadium normal lokalisiert ist. Dies verstärkt die Annahme, dass *baz* epistatisch zu *crb* ist.

Null Mutanten von *dlg*, *scrib* oder *lgl* zeichnen sich ebenfalls durch einen Verlust der ZA aus. Es treten abnormale Zellformveränderungen und eine Vielschichtigkeit der Epidermis auf. Ihre Phänotypen zeigen einige wichtige Unterschiede zu denen der *crb* und *baz* Mutanten: in letzteren scheint die apikale Membrandomäne stark reduziert oder nicht vorhanden zu sein, wohingegen sie in *dlg* Mutanten vergrößert ist (Bilder et al., 2003, Tanentzapf und Tepass, 2003; Bilder et al., 2000; Bilder und Perrimon, 2000). Ebenfalls gibt es in *dlg* Mutanten keinen ektopischen Zelltod, wie es für *crb* und *baz* Mutanten der Fall ist. Während der Gastrulation reichern sich Scrib und Dlg basal zu der sich neu bildenden ZA an, wohingegen Lgl gleichmässig über die gesamte basolaterale Membran und auch im Zytoplasma verteilt ist (Bilder et al., 2000; Bilder und Perrimon, 2000). Wie auch die Mitglieder der Baz und Crb Komplexe sind die Proteine des Dlg Komplexes voneinander abhängig, um eine richtige subzelluläre Lokalisation zu gewährleisten. Durch genetische Analysen im *Drosophila* Embryo konnte gezeigt werden, dass ein balanciertes Zusammenspiel der drei Komplexe für die Ausbildung der apiko-basalen Polarität verantwortlich ist (Bilder et al. 2003, Tanentzapf und Tepass, 2003).

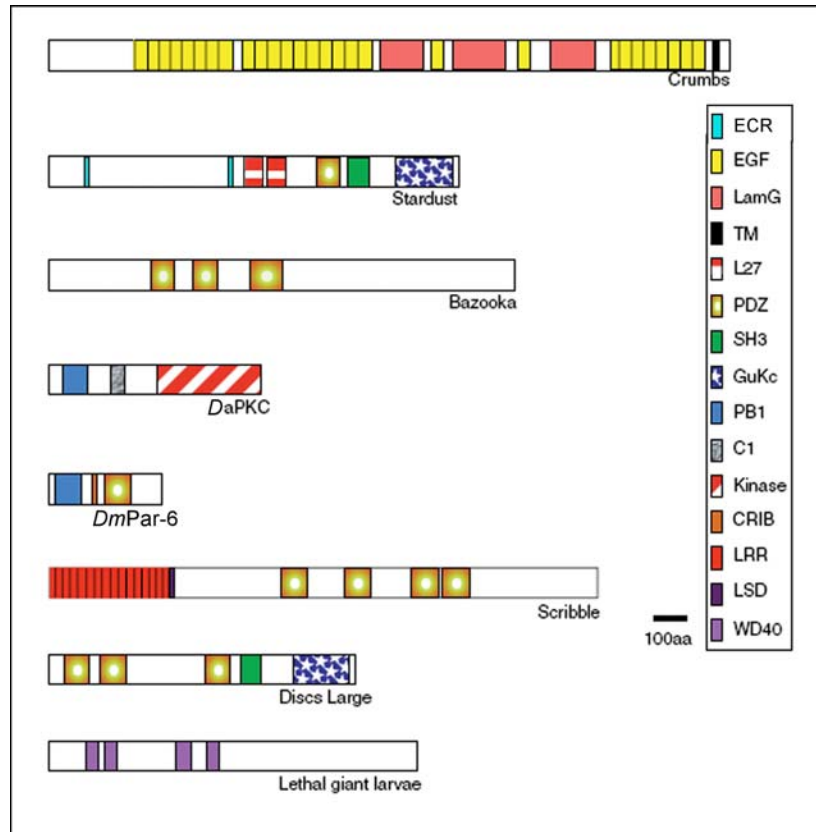


Abb. 1.2 Übersicht über einige der Komponenten der Baz, Crb und Dlg Komplexe

Der Crb Komplex enthält Crumbs und Stardust. Zu den Proteinen des Baz Komplex gehören Bazooka, DaPKC und DmPar-6. Der Dlg Komplex enthält Scribble, Discs Large und Lethal giant larvae (Modifiziert nach Johnson und Wodarz, 2003). Abkürzungen der Protein-Interaktionsdomänen im rechten Balken: ECR: evolutionary conserved region, EGF: epidermal growth factor, LamG: Laminin G, TM: Transmembran, L27: Lin-2/Lin-7 Binde-Motiv, PDZ: (PSD95/SAP90/DLG/ZO-1), SH3 (Src- homology 3), GuKc/GUK (Guanylatkinase-Homolog), PB1 (Phox /Bem1-Bindemotiv) C1 (protein kinase C conserved region 1), CRIB (Cdc42/Rac interactive binding), LRR (leucine-rich repeats), LSD, (leucine-rich repeat, SDS22-like) WD40 (Trp-Asp W-D), oder beta-transducin repeats)

Dabei sind sie Bestandteil eines regulatorischen Signalwegs, der die apiko-basale Zellpolarität etabliert, wobei *baz* epistatisch zu *crb* und *dlg* ist. Die Aufgabe des Dlg Komplex liegt darin, die apikale Identität entlang der basolateralen Region der von Baz initiierten apikalen Polarität zu hemmen. Die Mitglieder des Crb Komplexes werden durch den Baz Komplex apikal rekrutiert, um der Aktivität des Dlg Komplexes entgegenzuwirken. Somit stellt eine fein abgestimmte Balance der Aktivitäten des Crb und Dlg Komplex die Begrenzung in eine apikale und basolaterale Membrandomäne her und ermöglicht die richtige Position von Zell-Verbindungen (Bilder et al., 2003), (Abb. 1.3).

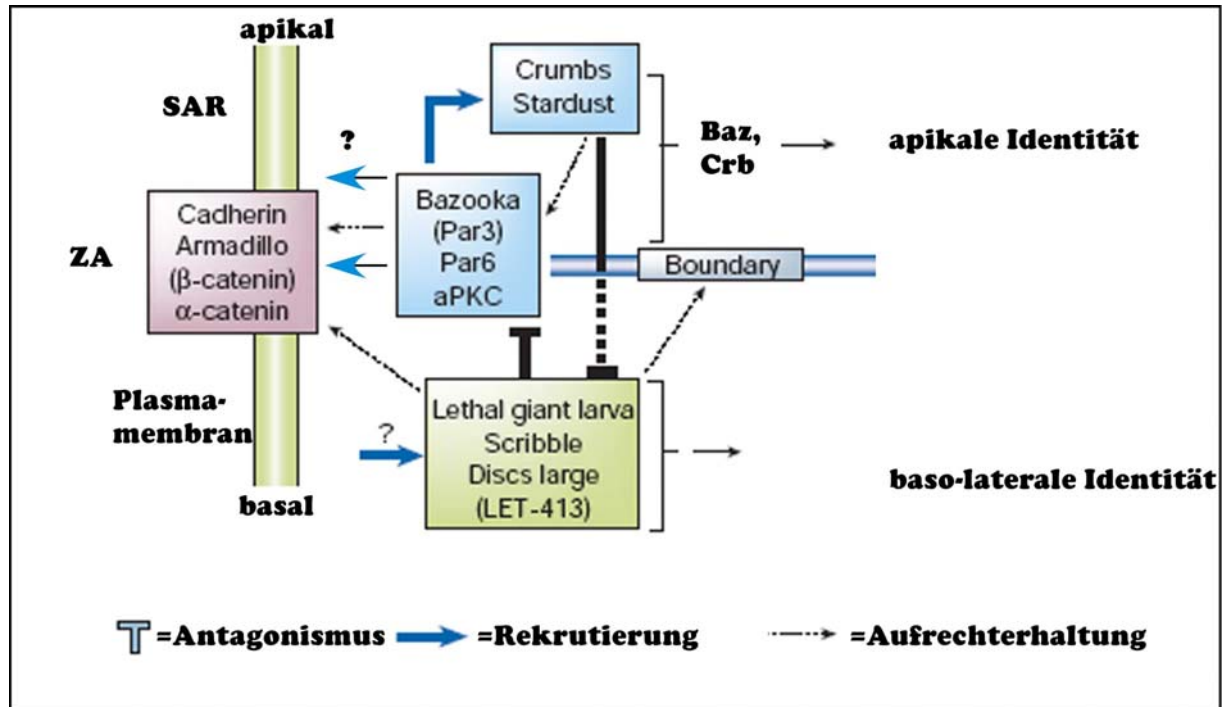


Abb 1.3 Die Mitglieder der Baz, Crb und Dlg Komplexe regulieren zusammen die Etablierung der apiko-basalen Polarität von Epithelzellen

Erklärung s. Text. ZA (zonula adherens) , SAR (subapikale Region) (modifiziert nach Nelson, 2003 und Harris und Peifer., 2004)

1.5 Organisation des Crb Komplexes

Crb und Sdt wirken zusammen mit Mitgliedern des Dlg und Baz Komplexes (1.7) innerhalb einer Signalkette in der Ausbildung einer intakten ZA (Tepass und Knust, 1993). Sowohl Sdt als auch Crb stellen Schlüsselproteine innerhalb des Crb Komplex dar, da sie durch ihre Protein-Binde-Motive verschiedene Proteine in ein komplexes Netzwerksystem an der subapikalen Region integrieren. Das Transmembranprotein Crb besitzt eine sehr große extrazelluläre Region mit 30 EGF (*epidermal growth factor*) ähnlichen Wiederholungen, sowie vier Motive, die mit der globulären Domäne (G-Domäne) von Laminin A verwandt sind (Tepass et al., 1990).

Trotz ihrer Größe und der vorhandenen Domänen konnte im *Drosophila* Embryo keine Funktion für die extrazelluläre Region gezeigt werden (Engelbert, 1997). Im Gegensatz dazu ist die sehr kleine intrazelluläre Region mit nur 37 Aminosäuren sehr wichtig für die Crb-Funktion, wie die Charakterisierung des *crb*^{8F105} Allels gezeigt hat. Der Verlust der 23 C-terminalen Aminosäuren durch das Vorhandensein eines vorzeitigen Stop-Codons führt zu einem vollständigen Funktionsverlust (Wodarz et al., 1993). Weiterhin erzielt eine membrangebundene Form der intrazellulären Region nach Überexpression dieselbe Abschwächung des *crb*⁻-Phänotypen wie das vollständige Crb Protein (Wodarz et al., 1995).

Durch eine detaillierte Analyse der intrazellulären Region von Crb konnten zwei weitere funktionell bedeutsame Regionen identifiziert werden: eine FERM- (4.1. Protein /Ezrin/Radixin/Moesin) Bindestelle und ein PDZ-Bindemotiv (PSD95/SAP90/DLG/ZO-1) am carboxyterminalen Ende (Klebes und Knust, 2000). Über das FERM Binde Motiv stellt das FERM Protein DMoesin die Verbindung von Crb zum Spektrin-Aktin-Membranskelett her (Medina et al., 2002a,b). Spektrine sind lange, tetramere, mit F-Aktin verbundene Proteine, die aus zwei α - und zwei β - Untereinheiten bestehen (Übersichtsartikel von Bennett und Baines, 2001). Das carboxyterminal gelegene PDZ Bindemotiv von Crb bindet die PDZ Domäne des MAGUK (Membrane-Associated Guanylat Kinase) Proteins Sdt (Bachmann et al. 2001, Hong et al. 2001,).

1.6 Sdt gehört zu der Familie der MAGUK (Membrane-Associated Guanylat kinase) Proteine

Viele Mitglieder der MAGUK Protein-Familie bilden Multiproteinkomplexe aus Signalproteinen und Zytoskelettmolekülen an Zell-Verbindungsstrukturen wie den epithelialen *tight* oder *septate junctions* sowie den synaptischen Verbindungen (Übersichtsartikel von Funke et al., 2005; Übersichtsartikel von Dimitratos et al., 1999; Fanning et al., 1998; Itoh et al., 1999; Woods et al., 1991; Bachmann et al., 2004). Für die MAGUK-Proteine ist das Vorhandensein einer bestimmten Kombination von Protein-Interaktionsdomänen charakteristisch, die aus einer oder mehreren PDZ (postsynaptic density 95/ discs large/ zonula occludens1) Domänen, einer SH3 (Src- homology 3) Domäne und einer GUK (homolog zu einer Guanylatkinase) ist. Die GUK Domäne besitzt in den MAGUK Proteinen keine katalytische Aktivität mehr, sondern funktioniert als Protein-Binde-Motiv (Übersichtsartikel von Dimitratos et al., 1999). Einige MAGUK-Proteine wie Dlg, MPP1/p55 besitzen noch eine zusätzliche konservierte 4.1B oder Hook Domäne, einer Region zwischen SH3 und GUK Domäne, die ihnen erlaubt, an Mitglieder der Protein Band 4.1 Superfamilie zu binden (Chishti et al., 1998; Marfatia et al., 1994; Marfatia et al., 1995).

Einige andere Mitglieder der MAGUK-Familie wie Dlg, D Δ Lin-2 oder Sdt besitzen zusätzlich am N-Terminus ein bis zwei L27 Domänen (*Lin-2/Lin-7* Binde motiv) (Übersichtsartikel von Funke et al., 2005; Übersichtsartikel von Dimitratos, 2000; Bachmann et al., 2004).

sdt kodiert unter anderem für zwei MAGUK Proteine (Sdt-MAGUK und Sdt-B), sowie eine GUK-Isoform, welcher der grösste Teil der PDZ, sowie die SH3 und Hook Domänen fehlen (Abb. 1.4), (Bachmann et al., 2001; Hong et al., 2001). Ein Sdt-Homolog im Menschen hMPP5 (*human membrane palmitoylated protein*) konnte ebenfalls identifiziert werden. Einige Bereiche seiner Domänen sind im Vergleich mit der Sdt-MAGUK Isoform stark konserviert (Abb.1.5). Für Sdt sind mehrere Bindungspartner isoliert worden, die seine Funktion als Netzwerk bildendes Molekül unterstützen. So bindet DLin-7 an die C-terminale L27 Domäne von Sdt (Bachmann et al., 2004), *DmPar-6* an die ECR (*evolutionary conserved region*) Regionen von Sdt (Wang et al., 2004 und wie bereits erwähnt bindet Crb an die PDZ Domäne von Sdt (Bachmann et al. 2001; Hong et al., 2001, Berger, unveröffentlichte Daten). Des Weiteren ist DPATJ als Bindungspartner für die C-terminale L27 Domäne von Sdt beschrieben worden (Roh et al., 2002).

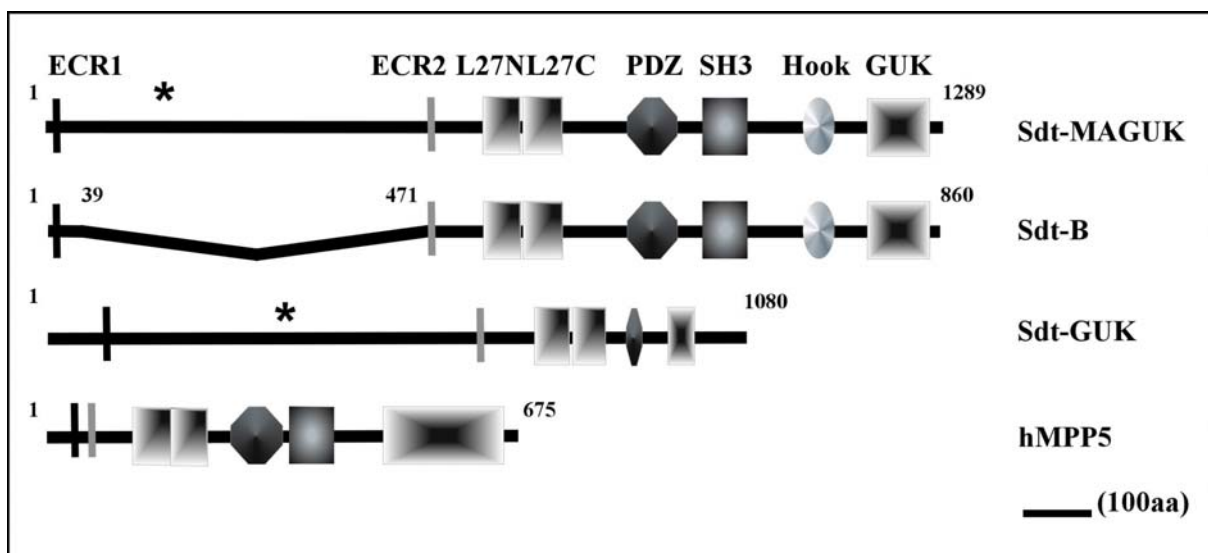


Abb. 1.4: *sdt* kodiert für mehrere Isoformen und ist im Menschen ebenfalls konserviert

Mehrere cDNAs konnten für *sdt* Isoformen im Embryo isoliert werden, die für zwei MAGUK-Proteine, Sdt-MAGUK und Sdt-B und ein Sdt-GUK Protein kodieren. Sdt-B ist bis auf das Fehlen der Aminosäuren (aa) zwischen 39-471 bezogen auf die Sdt-MAGUK Form mit dieser identisch und enthält mehrere Protein-Protein Interaktionsdomänen, unter anderem zwei ECR (*evolutionary conserved region*), zwei L27 (*Lin-2/Lin-7*), eine PDZ (*postsynaptic density 95/ discs large/ zonula occludens1*) eine SH3 (*Src- homology 3*) und eine GUK (*Guanylatkinase*) Domänen. Der Sdt-GUK Isoform fehlen die, in der MAGUK- und B-Isoform enthaltenen, SH3 und Hook Domänen. Außerdem fehlen in dieser Isoform 61 aa der GUK-Domäne und 50 aa der PDZ Domäne bezogen auf die beiden Domänen der MAGUK-Isoform. Ein Sdt Homolog im Menschen hMPP5 existiert ebenfalls. Dieses weist einen kürzeren N- Terminus auf und besteht nur aus einer L27 Domäne. Des Weiteren ist ihre GUK-Domäne grösser als die der MAGUK-Isoform von Sdt. *: in dem Allel *sdt*^{EH681} gibt es an dieser Position ein Stop-Codon, das die beiden Isoformen Sdt-MAGUK und Sdt-GUK betrifft. Die Zahlen in schwarz repräsentieren die Aminosäuren der Proteine.

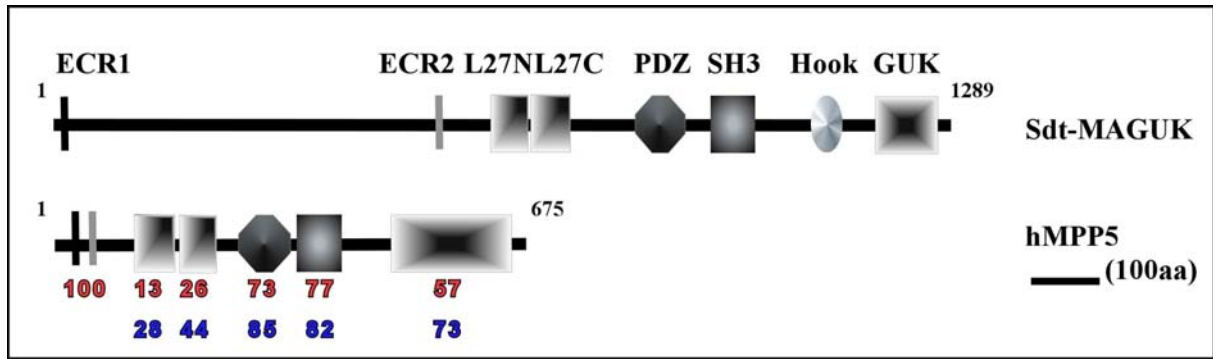


Abb. 1.5: Sdt-MAGUK und hMPP5 beinhalten zum Teil stark konservierte Regionen

Ein Homologievergleich zwischen hMPP5 und Sdt-MAGUK gibt die Identitäten (in rot) und Ähnlichkeiten (in blau) der jeweiligen Domänen in Prozent an (aus Kantardzhieva et al., 2005 und Ilse Gosens, persönliche Mitteilung). Die Zahlen in schwarz repräsentieren die Aminosäuren der beiden Proteine.

1.7 Zielsetzung:

Um ein tieferes Verständnis für die molekularen Wechselwirkungen zwischen Proteinen beider Komplexe zu erlangen, wurde in dieser Arbeit das Hefe-Zwei-Hybrid System zum Studium der Interaktion beider Proteinkomplexe verwendet. Die identifizierten Bindungen wurden durch weitere *in vitro* Versuche und *in vivo* Analysen in der embryonalen und larvalen Epidermis charakterisiert.

Sdt, das ein Mitglied des Crb Komplexes darstellt, kodiert für mehrere Isoformen unter anderem für zwei MAGUK- Proteine und ein GUK- Protein, das noch beide L27 Domänen und die GUK Domäne besitzt. Durch eine Struktur-Funktions Analyse sollten Erkenntnisse darüber gewonnen werden, welche Regionen von Sdt essentiell für seine Lokalisation in der subapikalen Region von Epithelien während der Embryogenese von *Drosophila* sind. Des Weiteren sollte analysiert werden, welche Domänen von Sdt den embryonalen *sdt* Phänotyp retten können und ob durch Überexpression von Sdt dominante Phänotypen sowie embryonale Letalität auftreten.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und sonstige Materialien

Alle Verbrauchskemikalien wurden in der Qualität *pro analysis* von folgenden Firmen bezogen: Acros, Geel, Belgien; Baker, Deventer, Niederlande; Biomol, Hamburg; Bio-Rad, München; Difco, Detroit, USA; Fluka, Buchs, Schweiz; Gibco/BRL Life Technologies, Karlsruhe; Grüssing, Filsum; Merck, Darmstadt; Riedel-de Haën; Seelze; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma-Aldrich, Steinheim.

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

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

Kitsysteme:

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

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

2.1.1 Bakterienstämme

Bezeichnung	Verwendungszweck	Anmerkung
<i>E. coli</i> DH5 α	Standardwirt für diverse Plasmide	Tetrazyklin-Resistenz
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'	Standardwirt für diverse Plasmide	-
<i>E. coli</i> BL21	Standardwirt zur Herstellung von GST-Fusionsproteinen	-

Tab. 2.1: Eingesetzte Bakterienstämme.

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

2.1.2 Vektoren

- pACT2: Hefe-Expressionsvektor zur Herstellung von Fusionsproteinen mit der DNA-Aktivierungsdomäne von Gal4 (Clontech, Heidelberg)
- pBluescript KS+/SK+: Vektor für Subklonierung, Sequenzierung, *in vitro*-Transkription (Stratagene, Heidelberg)
- pCRII-Topo: Vektor zur Insertion von PCR-Produkten mit 5'überhängenden Desoxyadenosin-Resten (Invitrogen, Groningen, Niederlande)
- pGEX: Vektor zur Erzeugung von GST-Fusionsproteinen in *E. coli* (Smith und Johnson, 1998); (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England)
- pUChs $\pi\Delta$ 2-3: „Turbo-Helper“-Plasmid zur Transformation von *Drosophila*, Transposasequelle (Laski et al., 1986)
- pUAS: Vektor zur Herstellung von UAS-Effektorlinien in *Drosophila* (Brand und Perrimon, 1993)
- pGBT9: Hefe-Expressionsvektor zur Herstellung von Fusionsproteinen mit der DNA-Bindungsdomäne von Gal4 (Clontech, Heidelberg)
- pGBKT7: Hefe-Expressionsvektor zur Herstellung von Fusionsproteinen mit der DNA-Bindungsdomäne von Gal4 (Clontech, Heidelberg)

2.1.3 Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Länge	Nukleotidsequenz (5'-->3')
5' <i>DmPar</i> -6 ⁴⁶⁴ <i>Nco</i> I	26bp	CCGCCATGGAAACGCATAGAAGAGTG
3' pACT2 ³¹²⁶⁻³¹⁵²	27bp	GTATCTACGATTCATAGATCTCTCGAG
5' pUAST-hMPP5	27bp	GCCGCGGCCGCGGGATTGATCCCGGCC
3' pUAST-hMPP5	25bp	CGACTCGAGTCAGCCAAGTGGATGG
5' Sdt ¹ <i>Not</i> I	29bp	GAAATGGCGGCCGCGTTGTCCGTGAACCA
3' Sdt ¹⁶⁵⁴ <i>Xho</i> I	24bp	GCGTCCTCGAGGCAGTTGCTCCTG
3' Sdt ²⁰⁴² <i>Xho</i> I	24bp	GCCTCGAGAACGTCGTCGCTGCAG
3' Sdt ²³⁷⁵ <i>Xho</i> I	24bp	CTCCCCTCGAGGCAGTGGCATTGC
5' Sdt ¹ <i>Nde</i> I	28bp	GGAATTCCATATGTTGACCATGTTGTCC
3' Sdt ²⁰⁴³ <i>Sma</i> I	24bp	TCCCCCGGGAACGTCGTCGCTGCA
5' Sdt ¹⁹¹⁷ <i>Eco</i> RI	26bp	GCGGAATTCCAGCTGAGCAAGAGCGG
3' Sdt ²²⁸¹ <i>Sal</i> I	25bp	GCCAGTCGACTGCTGAGTGTCGATCC
5' Sdt ¹⁰³⁰ <i>Eco</i> RI	27bp	GGACGAATTCGGCAGCAAAGGAGCCAC
Midi5-Prot. 3 (Bachmann, 2001)	22bp	GAGTTGATCTCGAGCAGCAGTT
5' Sdt PDZ ²⁴⁹⁴ <i>Eco</i> RI	30bp	CGTATGAATTCGATGGAGAAGTCAACGGAG
3' Sdt PDZ ²⁷⁹¹ <i>Xho</i> I	29bp	CCCTCGAGTTGACTGCCCCGTTGTTCCGCC
5' Sdt SH3 ²⁷⁴⁰ <i>Eco</i> RI	31bp	GGGAATTCGTCGGCGTGATGGGCGGAACAA
3' Sdt SH3 ³¹²⁰ <i>Xho</i> I	30p	CGACCCTCGAGGGCACACAGGAGCGTGGCT
5' Sdt GUK ³⁰⁷⁹	29bp	GGGAATTCATGGGCAGCAAAGGAGCCAC
3' Sdt GUK ³⁸⁵² <i>Xho</i> I	27bp	CTCGTCTCGAGCGTTGTGCACCCACTG

Tab. 2.2: Verwendete Oligonukleotide in dieser Arbeit

Diese Oligonukleotide wurden für die Herstellung der in Tab. 2.3-2.5 verwendeten Plasmid-Konstrukte verwendet

2.1.4 Herstellung der verwendeten Plasmid-Konstrukte

Name des Konstrukts (kodierende Region in As & verwendeter Vektor)	kodierende Regionen	Verwendete Primer und /oder Enzyme für die Klonierung
Crb intra (1-37) pGBKT7	intrazelluläre Domäne	geschnitten mit EcoRI & SalI aus Crb intra pGBT9 (Bachmann et al., 2001)
DmPar-6 (156-261) pACT2	PDZ	5' DmPar-6 ⁴⁶⁴ NcoI & 3' pACT2 ³¹²⁶⁻³¹⁵² , geschnitten mit NcoI & BamHI
SdtN (1-566) pGBKT7	ECR1, ECR2	geschnitten mit 5' Sdt ¹ NdeI & EcoRI aus Sdt (1-681) pGBKT7
Sdt (1-659) pGBKT7	ECR1, ECR2, 1-34 As der L27 N	5' Sdt ¹ NdeI & 3' Sdt ¹⁹⁷⁷ SalI
Sdt (1-681 aa) pGBKT7	ECR1, ECR2, L27 N	5' Sdt ¹ NdeI & 3' Sdt ²⁰⁴³ Sma
Sdt (566-681 aa) pGBKT7	ECR2, L27 N	geschnitten mit EcoRI & SmaI aus Sdt 1-681 pGBKT7
Sdt (640-760) pGBKT7	ab 15. As der L27 N, L27C	5' Sdt ¹⁹¹⁷ EcoRI & 3' Sdt ²²⁸¹ SalI
Sdt (1030-1289) pGBT9	GUK-Hook	5' Sdt ¹⁰³⁰ EcoRI & Midi5-Prot. 3
Sdt (1030-1289) pGBKT7	GUK-Hook	geschnitten aus Sdt (1030-1289) pGBT9

Tab 2.3: Hergestellte Plasmid-Konstrukte für die Hefe-Zwei-Hybrid Analyse

Name des Konstrukts (kodierende Region in As & Vektor)	kodierende Regionen	Verwendete Primer und /oder Enzyme für die Klonierung
hMpp5 (1-675aa) pUAST-8xMyc-Flag	vollständiges Protein mit L27N, L27C, PDZ, SH3, Hook, GUK	5' pUASThMPP5 & 3' pUASThMPP5
SdtN (1-551) pUAST-8xMyc-Flag	ECR1	5' Sdt ¹ NotI & 3' Sdt ¹⁶⁵⁴ XhoI
Sdt (1-681) pUAST-8xMyc-Flag	ECR1, ECR2, L27 N	5' Sdt ¹ NotI & 3' Sdt ²⁰⁴² XhoI
Sdt (1-791) pUAST-8xMyc-Flag	ECR1, ECR2, L27 N, L27C	5' Sdt ¹ NotI & 3' Sdt ²³⁷⁵ XhoI
Sdt (837-928) pUAST- 3xHA	PDZ	5' SdtPDZ ²⁴⁹⁴ EcoRI & 3' SdtPDZ ²⁷⁹¹ XhoI
Sdt-PDZ (837-1286) pUAST-3xHA	PDZ-GUK	5' SdtPDZ ²⁴⁹⁴ EcoRI & 3' Sdt GUK ³⁸⁶³ XhoI
Sdt (1031-1286) pUAST-3xHA	GUK-Hook	5' Sdt GUK ³⁰⁷⁹ & 3' Sdt GUK ³⁸⁵² XhoI
Sdt (920-1040 aa) pUAST-3xHA	SH3	5' Sdt SH3 ²⁷⁴⁰ & 3' Sdt SH3 ³¹²⁰ XhoI

Tab 2.4: Hergestellte Plasmid-Konstrukte für die UAS-sdt-Effektorlinien

Name des Konstrukts (kodierende Region in As & Vektor)	kodierende Regionen	Verwendete Primer und /oder Enzyme für die Klonierung
Sdt (1-681) PCRII-Topo	ECR1, ECR2, L27 N	5'Sdt ¹ NdeI & 3'Sdt ²⁰⁴³ SmaI
Sdt (1-834) PCRII-Topo	ECR1, ECR2, L27 N, L27C	5'Sdt ¹ NdeI & 3'Sdt ²⁵⁰³ SmaI

Tab 2.5: Hergestellte Plasmid-Konstrukte für *in vitro* Transkriptions/ Translationsreaktionen

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Herstellung elektrokompenter Zellen

(angelehnt an Hanahan et al., 1991)

- Animpfen von 50ml SOB -Mg²⁺ mit einer frischen Bakterien-Einzelkolonie (bei E. coli XL1-blue-Zellen 12.5µg/ml Tetrazyklin hinzufügen) und ü.N. bei 37°C, im Schüttler inkubieren
- 500ml vorgewärmtes SOB -Mg²⁺ ohne Antibiotikum mit 7.5ml der ü.N.-Kultur animpfen und bei 37°C, 150Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6-0.8 wachsen lassen
- alle weiteren Arbeitsschritte müssen auf Eis/im Kühlraum erfolgen
- überführen in vorgekühlte Zentrifugenbecher und 15min auf Eis inkubieren
- 15min bei 4°C, 4000Upm zentrifugieren, Überstand vorsichtig abgießen
- Pellet vollständig in 500ml kaltem 10% Glyzerin resuspendieren
- nochmals 15min bei 4°C, 4000Upm zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Pellet erneut in 500ml kaltem 10% Glyzerin resuspendieren
- nochmals 15min bei 4°C, 4000Upm zentrifugieren
- Überstand vollständig entfernen und Pellet in 1.5ml kaltem 10% Glyzerin resuspendieren
- Aliquots à 50µl in Eppendorf-Gefäße überführen, in flüssigem Stickstoff schockgefrieren und bei -70°C lagern (frühestens 1h nach Herstellung verwenden)

Anmerkung: Die Kompetenz der so gewonnenen elektrokompenten Zellen sollte nicht weniger als 1x10⁸ Kolonien/µg Vektor betragen. Zur Testtransformation wird standardmäßig ein pBluescript-Plasmid-Vektor in einer Konzentration von 1ng/µl eingesetzt.

Lösungen:

- SOB -Mg²⁺: 2% Bactotrypton, 0.5% Bactoyeast, 10mM NaCl, 2.5mM KCl

2.2.2 Transformation elektrokompenter Zellen

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

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

Lösungen:

- SOC: 2% Bactotrypton, 0.5% Bactoyeast, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 20mM Glucose
- LB: 1% Bactotrypton, 0.5% Bactoyeast, 1% NaCl
- LB-Agar: 6.3g Agar/300ml LB
- Ampicillin: 100mg/ml Stammlösung in H₂O

2.2.3 Isolierung von DNA

2.2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA

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

- 1ml einer ü.N.-Kultur für 2min bei 13000Upm abzentrifugieren
- Pellet in 150µl P1 resuspendieren
- 150µl P2 zusetzen, invertieren
- 5min bei RT inkubieren
- 150µl P3 zusetzen, invertieren
- 10min bei 13000Upm zentrifugieren, Überstand in frisches Eppendorf-Gefäß überführen und mit 300µl Isopropanol fällen

- 20min bei 13000Upm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet mit kaltem 70% Ethanol waschen und 5min bei 13000Upm zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Pellet lufttrocknen und in 20µl TE 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
- TE: 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0

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

2.2.4 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht die gezielte Amplifikation ausgewählter DNA-Sequenzen (Mullis und Faloona, 1987). Zwei auf den entgegengesetzten DNA-Strängen lokalisierte Oligonukleotide (Primer) dienen dabei als Startstellen für eine hitzestabile DNA-abhängige DNA-Polymerase (z.B. Taq- oder Pfu- Polymerase). Durch sich wiederholende Zyklen aus Denaturieren der DNA, Bindung der Oligonukleotide und Strangsynthese wird die zwischen den Primern liegende DNA-Sequenz exponentiell vervielfältigt. Ein typisches Beispiel einer Standard-PCR ist in Tab zu sehen. Für alle PCR- Anwendungen wurde der Thermocycler PTC-200 der Firma *MJ Research*, Watertown, USA, eingesetzt. Die Aufreinigung aller PCR-Produkte erfolgte mit dem High Pure PCR Product Purification Kit, *Roche Diagnostics*, Mannheim. Für ihre nachfolgende Subklonierung wurde, falls nicht künstliche Schnittstellen eingeführt worden waren, der TOPO TA Cloning Kit von *Invitrogen*, Groningen, Niederlande, nach Herstellerangaben benutzt.

2.2.4.1 Standard-PCR

Die PCR auf Plasmid-DNA erfolgte nach einem Standardprotokoll mit *hot start*. Beim *hot start* Verfahren wurde die *template* DNA mit allen Komponenten zunächst denaturiert. Als letztes gibt man die DNA-Polymerase kurz vor der eigentlichen PCR zu.

PCR-Mix für eine Reaktion, mit einem Gesamtvolumen von 50µl:

- DNA (20ng/µl): 1µl
- dNTP-Mix (je 2.5mM): 1µl
- 5' Primer (10mM): 1µl
- 3'Primer (10µM): 1µl
- 10x *Pfu*-Puffer: 5µl
- dH₂O: 40 µl
-
- Polymerase (3U/µl): 1µl

Standard PCR-Programm:

	Schritt	Temperatur	Dauer	Beschreibung der einzelnen Reaktionsschritte
	1	94 °C	3 min	Denaturierung der DNA, Polymerase erst nach 2 Min zugeben
30x	2	94 °C	15 sec	Denaturierung der DNA
	3	45 °C-72 °C	30 sec	Anlagerung der Primer an die DNA, abhängig von der Schmelztemperatur der Primer
	4	72 °C	1.5-3 min	Verlängerung der Primer durch die DNA-Polymerase, abhängig von der Länge der zu amplifizierenden DNA
	5	72 °C	7 min	Verlängerung der noch nicht vollständig amplifizierten DNA-Sequenzen
	6	4 °C	beliebig	Reaktionsende

2.2.5 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden nach Anleitung des PCR-Reinigungs-Kit Jetquick, Spinkit 250 der Firma Genomed, Bad Oeyenhausen, von freien dNTPs und der DNA-Polymerase gereinigt, damit Letztere in nachfolgenden Schritten, wie Restriktion und Ligation, nicht stören.

Je zwei PCR Ansätze (95-100 µl) wurden mit Säulen des Kits gereinigt.

2.2.6 Gelelution

Um aus einem Gemisch an unterschiedlich großen DNA-Produkten ein bestimmtes DNA-Produkt zu isolieren, wird die DNA gelelektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt. Die gewünschte DNA-Bande wird unter Anregung mit UV-Licht aus dem Gel geschnitten und nach Anleitung des Gelelutions-Kit Jetquick, Spinkit 250 der Firma Genomed, Bad Oeyenhausen, aus dem Agarosegel eluiert.

2.2.7 Restriktionsverdau und Ligation

Die in der Molekularbiologie eingesetzten Restriktionsenzyme erkennen palindromische DNA-Sequenzen (Restriktionsschnittstellen) und schneiden die DNA an diesen Sequenzen (Restriktionsverdau). Dabei entstehen DNA-Fragmente mit glatten oder überhängenden Enden. In der Gentechnologie werden Restriktionsenzyme verwendet, um DNA-Sequenzen unterschiedlicher oder gleicher Herkunft zu schneiden und sie mit Hilfe der T4-DNA-Ligase zu einem rekombinanten DNA-Molekül zu verknüpfen.

Die hier verwendeten Enzyme wurden von der Firma Roche/Boehringer und Fermentas bezogen.

Die Restriktion und Ligation wurde nach den Angaben der Hersteller mit den vom Hersteller gelieferten Restriktionspuffern durchgeführt.

Standard-Ansatz für eine Restriktion:

1µg DNA
2µl Restriktionspuffer
1µl Enzym (10U/µl)
ad 17µl dH₂O auffüllen
bei der Temperatur mit der besten
Enzymaktivität 1h inkubieren lassen

Standardansatz für eine Ligation:

3-facher Überschuss des Inserts
1-fache Menge des Vektors
1µl 10x Ligationspuffer
1µl T4-DNA-Ligasepuffer (10U/µl)
ad 10µl mit dH₂O auffüllen, bei 16°C ü.N.

2.3 Proteinbiochemische Methoden:

2.3.1 Herstellung von Embryonenextrakten

- Embryonen von 4-5 ü.N.-Ablagen sammeln, dechorionisieren und waschen
- 500µl Embryonen im Eppendorf-Gefäß in flüssigem Stickstoff schockgefrieren
- Embryonen mit 2ml Lysis-Puffer versetzen
- auf Eis homogenisieren (mit einem 2ml Glas Homogenisator der Firma Roth)
- 30min auf Eis inkubieren
- 3x 10min bei 13000Upm, 4°C, zentrifugieren
- jeweils die mittlere Phase in ein neues Eppendorf-Gefäß überführen
- Proteinbestimmung durchführen: 800µl H₂O + 200µl RotiQuant (Roth, Karlsruhe) + 2µl Embryonenlysat mischen und die OD600 bestimmen. Eine OD600 von 0.1 entspricht ca. 1mg/ml Gesamtprotein
- Embryonenlysat bei -70°C lagern
- Lysispuffer: 50mM TrisHCl pH 8, 150mM NaCl, 0.5% Triton, 1mMMgCl₂, 1µM Pefabloc, 5µM Leupeptin, 1µM Pepstatin, 0.3µM Aprotinin

2.3.2 Präadsorbition der Embryonenextrakte an Gluthation-Sepharose-Beads

- 10µl an Gluthation-Sepharose-Matrix gekoppeltes Gluthation-S-Transferase Protein mit 400µl Lysat aus Embryonen (5 mg/ml) ü.N. bei 4°C auf dem Taumler inkubieren
- 2min bei 13.000Upm und 4°C zentrifugieren, Überstand entnehmen

2.3.3 GST-Pulldown mit Proteinen aus Embryonenextrakten

- 150µl des präadsorbierten Lysates aus Embryonen auf 500µl Lysispuffer auffüllen und jeweils mit
- 10µl an Glutathion-Sepharose-Matrix gebundenen GST-Fusionsproteinen ü.N. bei 4°C taumeln lassen.
- 3 Min bei 5000Upm zentrifugieren
- 3x mit 1ml Lysispuffer 2min bei 5000Upm waschen
- Elution mit reduziertem Gluthation bei 15min auf dem Taumler bei RT
- 5-10µl des Eluats wird mit einer Hamilton Spitze abgezogen und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

2.3.4 Herstellung von GST-Fusionsproteinen

Um GST-Fusionsproteine herzustellen, wurden DNA-Sequenzen in Leserichtung an das 3'-Ende der für die Glutathion-S-Transferase (GST) kodierenden Region des pGEX-Vektors kloniert. Nach Transformation des pGEX-Konstruktes in BL21 Zellen wurde mit einer Einzelkolonie eine Vorkultur in LBamp-Medium angeimpft und ü.N. bei 37°C im Schüttler inkubiert. Mit 20ml der Kultur wurden 200ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C im Schüttler inkubiert bis die Bakterien eine OD600 bei 0,8 erreichten. Durch Zugabe von IPTG (1mM) wurde die Expression des GST-Fusionproteins über 4 Stunden im Schüttler bei 30°C induziert. Dann erfolgten der Aufschluss der Zellen und die Isolierung des Proteins durch folgende Arbeitsschritte:

- Bakterienkultur 10000Upm für 15min zentrifugieren.
- Überstand verwerfen, Pellet kann bis zur Aufarbeitung bei -20°C aufbewahrt werden
- Pellet in 10ml kaltem 1xPBS versetzt mit Proteaseinhibitoren vollständig resuspendieren
- 5 x 15sec auf Eis sonifizieren.
- 500µl 20% Triton X-100 (= 1%) zugeben
- 30min bei Raumtemperatur auf dem Taumler inkubieren
- 15min bei 10000Upm bei 4°C zentrifugieren
- Überstand in ein frisches Gefäß überführen
- Überstand mit der nach den Angaben des Herstellers (Amersham Bioscience Europe, Freiburg) vorbereiteten Glutathion Sepharose 4B versetzen (pro 100ml Kultur werden 200µl 50%ige, in PBS gewaschene Glutathion Sepharose 4B eingesetzt, das entspricht 133µl der 75%igen vom Hersteller bereitgestellten Suspension.)
- 60min bei Raumtemperatur auf dem Taumler inkubieren
- 15min bei 10000Upm bei 4°C zentrifugieren, Glutathione Sepharose 4B mit 1xPBS waschen
- Die Matrix mit dem gebundenen GST-Fusionsprotein kann bei 4°C aufbewahrt werden.

Lösungen:

PBS(10x): 1.3 M NaCl; 70mM NaHPO₄ ; 30 mM NaH₂PO₄

Proteaseinhibitoren: 1µM Pefabloc, 5µM Leupeptin, 1µM Pepstatin, 0.3µM Aprotinin

2.3.5 *In vitro* Transkriptions-/Translationsreaktion

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

- 25µl Retikulozytenlysate aus Kaninchen
- 2µl TNT Reaktionspuffer
- 1µl T3- bzw. T7-RNA-Polymerase
- 0,5µl AS-Mix (-Leu)
- 0,5µl AS-Mix (-Met)
- 1µl RNase Inhibitor (40U/µl)
- 2µl Template-DNA (0,5µg/µl, entsprechend 1µg)
- 2µl transzendente, biotinylierte Lysin-tRNA
- 16µl dH₂O

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

2.3.6 SDS-PAGE-Gelelektrophorese und Western-blotting

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

der Transfer durch eine Ponceau S-Färbung überprüft. Zur Proteindetektion wurde folgender Maßen vorgegangen:

- Nitrozellulosemembran für 1h in Blockierlösung inkubieren bei RT auf dem Taumler
- Inkubation des primären Antikörpers in Blockierlösung ü.N. bei 4°C auf dem Taumler
- 4 x 15min Waschschrte in 1xTBST
- Inkubation mit dem zweiten Antikörper (POD-gekoppelt; POD = HRP = Meerrettich-Peroxidase, 1: 10.000) in Blockierlösung für 2h bei RT auf dem Taumler
- 4 x 15min Waschschrte in 1xTBST
- 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, 38µl 20% SDS, 2.1ml H ₂ O, 30µl 10% APS, 8µl TEMED
Sammelgel:	310µl 30% Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1), 235µl 1M Tris pH 6.8, 10µl 20% SDS, 1.3ml H ₂ O, 10µl 10% APS, 5µl TEMED
1xTBST:	50mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% Tween
Blockierlösung:	3% Milchpulver, 1% BSA in 1xTBST

2.3.7 Erzeugung eines gegen den N-Terminus und die L27N Domäne von Sdt gerichteten Antikörpers

Die Herstellung von gegen den N-Terminus und die N-terminale L27 Domäne von Sdt gerichteten Antikörpern wurde durch die Firma *Eurogentec*, Seraing, Belgien durchgeführt. Auf der Basis seiner Aminosäuresequenz wurden zwei je 16 Aminosäuren umfassende Bereiche synthetisiert (EP040570: NH₂-GSRKLKALQDTATPGC-CONH₂, Pos. 574-590 Aminosäuren und EP040571: NH₂-IANHTDGTPSPTPTPC-CONH₂, Pos. 144-160 Aminosäuren). Diese Peptide wurden an Trägermoleküle gekoppelt und jeweils gemeinsam zur Immunisierung zweier Kaninchen eingesetzt.

Der Immunisierungsplan sah wie folgt aus:

1. Tag	erste Injektion	24. Tag	erste kleine Blutabnahme
14. Tag	zweite Injektion	50. Tag	zweite Blutung
28. Tag	dritte Injektion	71. Tag	dritte Blutung
56. Tag	vierte Injektion	91. Tag	Ausblutung der Kaninchen

Die gewonnenen Kaninchenserum wurden zum Teil durch die an Träger-gekoppelte Peptide aufgereinigt. Zum Teil wurden sie direkt sowohl in Antikörperfärbungen in Embryonen als auch in Westernblots von Proteinen aus Embryonenextrakten in verschiedenen Verdünnungen und Bedingungen getestet (Daten nicht gezeigt). Bis jetzt konnte noch kein befriedigendes Ergebnis erzielt werden.

2.4 Hefe-Zwei-Hybrid System

Durch die Zwei-Hybrid-Analyse können *in vivo* Interaktionen zwischen zwei Proteinen nachgewiesen werden. Dabei wird das eine Protein an eine spezifische DNA-Bindedomäne, das andere an eine Aktivierungsdomäne fusioniert. Im Falle einer Interaktion beider Proteine wird durch die Bindung an den Promotor ein Reportergen transkribiert, dessen Aktivität auf die Interaktion rückschließen lässt. Diese Methode (James et al., 1996) verwendet die Gal4p-Aktivierungs- und -Bindedomäne aus *S. cerevisiae*. Als Reportergene dienen genomische *GAL1p*-HIS3, und *GAL1p*-MEL1 sowie *GAL1p-lacZ*, die im Falle von HIS3 Aminosäureprototrophie vermittelt, während mithilfe des lacZ-Gens und MEL1 Gens die Interaktion über eine enzymatische Umsetzung von synthetischen Substraten der β -Galaktosidase bzw. α -Galaktosidase gemessen werden kann.

Zum Nachweis einer möglichen Interaktion wurden die DNA-Konstrukte die für die Hybridproteine kodieren in den Hefestamm Y190 transformiert und auf synthetischen Minimalmedien, denen ein Gemisch aus Aminosäuren ohne den entsprechenden Auxotrophiemarker zugesetzt wurde, ausplattiert. Alternativ wurde eine Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität durchgeführt.

2.4.1 LiAc vermittelte Transformation von Plasmid DNA in *S. cerevisiae*

(Modifiziert nach dem Protokoll (PT3024-1) der Firma Clontech, Palo Alto, USA)

Mit einer Einzelkolonie des Hefestammes Y190 wurde eine Vorkultur in YPD-Medium angeimpft und ü. N. bei 30°C und 200Upm im Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Hefen mit YPD-Medium auf eine OD600 von 0,2 verdünnt und im Schüttler bei 30°C und 200 Upm bis die OD600 zwischen 0,6-0,8 erreichte. Für jeweils 5-6 Transformationen wurden je 20ml Hefelösung angesetzt. Dann erfolgten die folgenden Transformationsschritte:

- 20 ml der Hefekultur für 5min bei 5000Upm zentrifugieren
- Pellet mit 20ml dH₂O waschen und erneut bei 5000Upm für 5min zentrifugieren
- Pellet mit 20ml 0.1M LiAc waschen und zentrifugieren
- Pellet in 1xTELiAc bis zu einem Endvolumen von 300µl resuspendieren
- 15min bei 30°C inkubieren
- 2µl Heringssperm DNA (10mg/ml), 1µg zu transformierende Plasmid DNA mischen
- 50 µl der Hefelösung mit der DNA mischen
- 300µl PEG/LiAc/TE zu der Hefe-DNA-Mischung geben
- 150µl mischen und 30min bei 30°C auf dem Schüttler bei 200Upm inkubieren
- 20min bei 42°C Hitzeschock durchführen
- 30sec bei 7000Upm zentrifugieren
- Pellet in 1ml YPD resuspendieren und 1h bei 30°C und 200Upm auf dem Schüttler inkubieren
- 30sec bei 7000Upm zentrifugieren und Pellet in 50µl dH₂O resuspendieren
- Auf selektiver SD-Agarplatte ausstreichen und 3-4 Tage im Inkubator bei 30°C wachsen lassen

Die Interaktionsanalysen wurden in vier unabhängigen Versuchen wiederholt. Es wurden bei jedem Testansatz Positivkontrollen sowie Negativkontrollen durchgeführt.

Lösungen:

YPD (Voll-) Medium:	20 g/L Difco Pepton, 10 g/L Hefe-Extrakt, 20 g/L Agar (nur für Platten), auf 50 ml mit dH ₂ O auffüllen, autoklavieren, nach dem Abkühlen auf ca. 55°C 2% Dextrose (Glukose) (50 ml einer sterilen 40% Stocklösung) zugeben
10X LiAc:	1 M Lithiumacetat, auf pH 7,5 einstellen, autoklavieren
50% PEG 3350:	50% PEG (Polyethylene glycol, MW: 3,350) in sterilem warmem dH ₂ O auflösen
10X TE Puffer:	0.1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, auf pH 7,5 autoklavieren

<u>PEG/LiAc/TE-Lösung:</u>	<u>Endkonz.</u>	<u>Für 10 ml Lösung</u>
PEG 4000:	40%	8 ml of 50% PEG
TE buffer :	1X	1 ml of 10X TE
LiAc:	1X	1 ml of 10X LiAc

SD (Selektiv-) Medium: 0,67% „Yeast nitrogen base w/o amino acids“, 20g/L (nur für Platten) auf 850ml auffüllen, nach dem Abkühlen auf ca. 55°C, 2% Dextrose (Glukose) (50 ml einer sterilen 40% Stocklösung) und 100ml einer sterilen 10xDO-Lösung zugeben

10xDO (Dropout) Lösung: 10x konzentrierte Nährlösung :
 L-Adenine Hemisulfat Salz: 200 mg/
 L-Arginine HCl 200 mg/L
 L-Histidine HCl Monohydrat 200 mg/L
 L-Isoleucin 300 mg/L
 L-Leucin 1000 mg/L
 L-Lysin HCl 300 mg/L
 L-Methionin 200 mg/L
 L-Phenylalanin 500 mg/L
 L-Threonin 2000 mg/L
 L-Tryptophan 200 mg/L
 L-Tyrosin 300 mg/L
 L-Uracil 200 mg/L
 L-Valin 1500 mg/L
 ad 1L mit dH₂O auffüllen und autoklavieren

2.4.2 Qualitative Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität mit Hilfe des *colony-lift filter assay*

- 2ml Z-Puffer/X-Gal-Lösung luftblasenfrei auf ein Whatman-Filterpapier in einer Petrischale pipettieren
- eine sterile, verstärkte NC-Membranscheibe auf eine Platte mit mindestens 30 Hefekolonien pro Transformation legen
- die NC-Membran mit den übertragenen Hefekolonien für ca. 15sec in flüssigen Stickstoff halten

- nach dem Auftauen die Membran mit den Kolonien nach oben auf das mit Z-Puffer/XGal getränkte Whatmanpapier legen
- bei 30°C ein bis vier Stunden inkubieren und die Blaufärbung dokumentieren

Lösungen:

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

Z-Puffer: 62mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 40mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 10mM KCl; 1mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; pH 7,0, ad 1 L auffüllen, autoklavieren

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

2.4.3 Quantitative Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität

Die genaue Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität der Zellen, die in der Zwei-Hybrid-Analyse verwendet wurden, erfolgte mittels einer Endpunktbestimmung. Die OD600 einer Übernachtskultur wurde gemessen und 1 ml dieser Kultur für 2 min, 13000 Upm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 μl Lysis-Puffer (0,1 M Tris/HCl pH 7,5; 0,05 % Triton X-100) aufgenommen und mindestens zwei Stunden bei -70°C gefroren. Die Proben wurden bei 30°C aufgetaut und mit 750 μl Z-Puffer mit frischem ONPG (60 mM Na_2HPO_4 ; 40 mM NaH_2PO_4 ; 10mM KCl; 1 mM MgSO_4 ; 1 mg/ml O-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid, pH 7,0) bis zur Gelbfärbung inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 μl 1 M Natriumcarbonat-Lösung gestoppt und die Inkubationszeit (t) ermittelt. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde die Extinktion bei 420 nm photometrisch bestimmt, wobei die Extinktion 1,0 nicht überschritten werden sollte. Die Enzymaktivität wurde mit der folgenden Formel ermittelt (Golemis und Khazak, 1994; Miller, 1972):

$$(1000/t) \times (\text{OD}_{420}/\text{OD}_{600}) = y \text{ Miller Units.}$$

Für den Test wurden jeweils doppelte Übernachtskulturen angesetzt, von denen wiederum Doppelproben untersucht wurden. Für jede untersuchte Protein-Interaktion wurden Positivkontrollen sowie Negativkontrollen durchgeführt.

2.5 Mikromanipulation von *Drosophila melanogaster*

2.5.1 Keimbahntransformation

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

2.5.1.1 Herstellung des Injektionsmixes

Sowohl die DNA des P-Element-Transformationsvektors, als auch die des Helferplasmids wurden mit dem Jetstar Plasmid Midi Kit der Firma Genomed, Bad Oeynhausen, isoliert und für den Injektionsmix etwa 4 μ g P-Element-Transformationsvektor und 1 μ g Helfer-Plasmid (pUCHs π Δ 2-3) gemischt. Des Weiteren wurden 1 μ l 10xInjektionspuffer sowie 1 μ l 2% Phenolrot zugefügt und mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 10 μ l aufgefüllt.

Lösungen:

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

2.5.1.2 Herstellung der Injektionskapillaren

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

Injektionsmix unter mikroskopischer Kontrolle von vorne in die Kapillare aufgezogen werden.

2.5.1.3 Mikroinjektion

Für die Injektionen werden w^- -Embryonen (w1118) benutzt. Da alle P-Element-Transformationsvektoren ein w^+ -Gen tragen, welches ins Fliegen-genom mitintegriert, können transgene Fliegen anhand ihrer Augenfarbe (von schwach gelb bis dunkelrot, je nach Integrationsort) erkannt werden. Die Injektion in den posterioren Teil der w^- -Embryonen erfolgt vor Bildung der Polzellen, welche die spätere Keimbahn der Fliege bilden. Nur so bietet sich die Möglichkeit, dass die DNA bei der Zellbildung mitinternalisiert und ins Genom der Polzellen integriert wird. Dies ist etwa bis 1.5h nach Befruchtung möglich, weil der Embryo bis dahin ein Synzytium von sich teilenden Kernen darstellt (Campos-Ortega and Hartenstein, 1997). Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, die w^- -Fliegen zur Eiablage etwa zwei Tage vor Beginn der Mikroinjektion auf Apfelsaft-Agarplatten zu setzen und diese häufiger zu wechseln, da dann mehr Eier gelegt werden und die Embryonen einer Ablage vom Alter her synchronisiert sind. w^- -Fliegen werden für ca. 30min auf Apfelsaft-Agarplatten gesetzt und die abgelegten Eier von Hand oder chemisch (2min in einem 1:1 Gemisch aus Natriumhypochlorid und H_2O , anschließend gut waschen) dechorionisiert. Anschließend werden die Embryonen in gleicher Orientierung auf einem Apfelsaft-Agarblöckchen aufgereiht und auf ein vorher mit Kleber bestrichenes Deckglas übertragen. Nun lässt man die Embryonen unter optischer Kontrolle trocknen, bis sich bei Berührung mit einer Präpariernadel Falten bilden. Das Deckglas wird auf einem Objektträger fixiert und die Embryonen mit 3S Voltalef-Öl überschichtet. Die Injektionen erfolgen unter dem Mikroskop mit dem vorbereiteten Mikromanipulator. Der Injektionsdruck kann über eine Mikrometerschraube variiert werden und sollte so eingestellt sein, dass der Injektionsmix erst beim Eindringen in einen Embryo ausfließt. Dies kann durch den Phenolrot-Zusatz gut kontrolliert werden. Fertig injizierte Embryonen werden mit 3S Voltalef-Öl überschichtet und bis zum Schlüpfen in einer feuchten Kammer bei 18°C aufbewahrt. Geschlüpfte L1-Larven werden zu 50 Individuen in ein vorbereitetes frisches Fliegenröhrchen (Brei wird angefeuchtet, aufgelockert und mit einem Tupfer Hefe versehen) gesammelt und bis zum Schlüpfen der adulten Fliegen ebenfalls bei 18°C gehalten.

Kleber:	tesa-Pak Paketklebeband (Beiersdorf, Hamburg) einige Tage in Heptan einweichen, dann abzentrifugieren und Überstand verwenden
Apfelsaftagarplatten:	40g Agar, 340ml Apfelsaft (100%) und 17g Rohrzucker mit H ₂ O auf 1l auffüllen, aufkochen, nach Abkühlen auf 60°C mit 30ml Nipagin versetzen und Platten giessen
10% Nipagin:	100g Nipagin in 1l 70% Ethanol lösen

2.5.1.4 Isolierung und Balancierung transgener Fliegen

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

2.6 Genetische Methoden

2.6.1 Fliegenzucht

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

Lösungen:

Standardmedium: 356g Maisschrot, 47.5g Sojamehl, 84g Trockenhefe, 225g Malzextrakt, 75ml 10% Nipagin, 22.5ml Propionsäure, 28g Agar, 200g Zuckerrübensirup, mit 4.9L H₂O auffüllen, aufkochen und nach dem Abkühlen auf ca. 55 °C in Fliegenröhrchen oder Flaschen füllen

2.6.2 Fliegenstämme, Chromosomen und Allele

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

2.6.2.1 Balancer-Chromosomen

Stämme	Bemerkung	Referenz
<u>1. Chromosom</u>		
FM7	Balancer-Chr.	Lindsley and Zimm, 1992
<u>2. Chromosom</u>		
CyO	Balancer-Chr.	Lindsley and Zimm, 1992
<u>3. Chromosom</u>		
TM3	Balancer-Chr.	Lindsley and Zimm, 1992
TM6B	Balancer-Chr.	Lindsley and Zimm, 1992

Tab.2.6: Verwendete Balancer-Chromosomen

2.6.2.2 Mutante Fliegenstämme

Mutation in	Bemerkung	Referenz
<u>1. Chromosom</u>		
<i>stardust</i> ^{EH681}	amorph	Wieschaus et al., 1984
<i>DmPar-6</i> ^{A226} , P[w ⁺ , FRT]9-2/ FM7 <i>ftzLacZ</i>	amorph	Petronczki und Knoblich, 2001
<u>3. Chromosom</u>		
<i>crumbs</i> ^{TIA22}	amorph	Jürgens et al., 1984

Tab. 2.7: verwendete mutante Fliegenlinien

Genotyp	Referenz
<i>DmPar-6</i> ^{A226} , P[w ⁺ , FRT]9-2	Petronczki und Knoblich, 2001
<i>ovo</i> ^{D2} <i>v</i> ²⁴ P{FRT(<i>w</i> ^{hs})}9-2/C(1)DX, <i>y</i> ¹ <i>f</i> ¹ /Y; P{ <i>hsFLP</i> }38	# 1843, Bloomington

Tab. 2.8: Zur Herstellung von *DmPar-6* Keimbahnklon-Embryonen verwendete Fliegenlinien

2.6.2.3 Gal4-Aktivatorlinien

Stämme	Bemerkung	Referenz
<u>2. Chromosom</u>		
Gal4 ^{559.1}	<i>patched</i> -Gal4	Hinz et al., 1994
Gal4 ^{en}	<i>engrailed</i> -Gal4	Han und Manley, 1993
<u>3. Chromosom</u>		
Gal4 ^{pan}	<i>pannier</i> -Gal4	Jose Pastor
Gal4 ^{daG32}	<i>daughterless</i> -Gal4	Wodarz et al., 1995
<u>2.+3.Chromosom</u>		
Gal4 ^{mat67, mat67; mat15, mat15}	maternaler <i>tubulin</i> -Gal4	St. Johnston und Müller

Tab. 2.9: verwendete Gal4-Aktivatorlinien

Stämme	Bemerkung	kodierende Region	Referenz
<u>2. Chromosom</u>			
UAS- <i>crb</i> ^{30.12e}	<i>crb</i> Effektor, stark	vollständiges Crb Protein	Wodarz, 1990
UAS- <i>crb</i> ^{38.14a}	<i>crb-intra</i> Effektor, stark	intrazelluläre Region von Crb	Wodarz, 1990
UAS- <i>crb</i> ^{<i>intra</i>ΔERLI} (AMB-14)	<i>crb-intra</i> ^{ΔERLI} Effektor, stark	intrazelluläre Region von Crb ohne ERLI-Motiv	Klebes, 2000
UAS- <i>DmPar-6</i>	<i>DmPar-6</i> Effektor, stark	<i>DmPar-6</i> und 5' und 3' flankierende Regionen	Petronczki und Knoblich, 2001

Tab. 2.10: verwendete UAS-Effektorlinien

Stämme	Abkürzung in dieser Arbeit	Referenz
<u>1. Chromosom</u>		
UAS- <i>sdt</i> ^{1.2.53.2}	SdtN (1)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{1.2.34.2}	SdtN (2)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{2.7.18.6}	Sdt1-L27N (1)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{2.7.101}	Sdt1-L27N (2)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{3.5.68.2}	Sdt1-L27C (1)	diese Arbeit

Tab. 2.11: Beschriftung s. nächste Seite

Stämme	Abkürzung in dieser Arbeit	Referenz
UAS- <i>sdt</i> ^{3.5.52.1}	Sdt1-L27C (2)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{4.1.26.4}	SdtPDZ (1)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{4.1.48.1}	SdtPDZ (2)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{5.1.35.3}	SdtSH3(1)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{5.1.35.2}	SdtSH3(2)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{6b.39.2}	SdtGUK-Hook (1)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{6b.5.2}	SdtGUK-Hook (2)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{7.1.48.1}	SdtPDZ-GUK (1)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{7.1.49.2}	SdtPDZ-GUK (2)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{MAGUK}	Sdt-MAGUK (1)	Bulgakova, nicht veröffentlicht
UAS- <i>sdt</i> ^{MAGUK}	Sdt-MAGUK (2)	Bachmann et al., 2001
UAS- <i>sdt</i> ^{Δ1-L27N}	SdtΔ1-L27N (1)	Bulgakova, nicht veröffentlicht
UAS- <i>sdt</i> ^{Δ1-L27C(1)}	SdtΔ1-L27C (1)	Bulgakova, nicht veröffentlicht
UAS- <i>sdt</i> ^{Δ1-L27C 7761}	SdtΔ1-L27C (2)	Bulgakova, nicht veröffentlicht
UAS- <i>sdt</i> ^{ΔPDZ (1)}	SdtΔPDZ (1)	Bulgakova, nicht veröffentlicht
UAS- <i>sdt</i> ^{ΔPDZ (57642)}	SdtΔPDZ (2)	Bulgakova, nicht veröffentlicht
UAS- <i>sdt</i> ^{ΔSH3-Hook(63311)}	SdtΔSH3-Hook (1)	Bulgakova, nicht veröffentlicht
UAS- <i>sdt</i> ^{ΔSH3-Hook(63541)}	SdtΔSH3-Hook (2)	Bulgakova, nicht veröffentlicht
UAS- <i>sdt</i> ^{ΔHook(1)}	SdtΔHook (1)	Bulgakova, nicht veröffentlicht
UAS- <i>sdt</i> ^{ΔHook(4a233)}	SdtΔHook (2)	Bulgakova, nicht veröffentlicht
UAS- <i>sdt</i> ^{ΔGUK-Hook(1)}	SdtΔGUK-Hook(1)	Bulgakova, nicht veröffentlicht
UAS- <i>sdt</i> ^{ΔGUK-Hook23116.2}	SdtΔGUK-Hook (2)	Bulgakova, nicht veröffentlicht

Tab. 2.11, Anfang s. vorherige Seite: verwendete UAS-*sdt*-Effektorlinien

Genauere Angaben zu der kodierenden Region der Konstrukte sind im Anhang zu finden

2.6.3 Das Gal4/UAS-System

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

Die Funktion eines Gens lässt sich jedoch nicht nur anhand von Verlust-Mutationen beschreiben, sondern auch durch dessen Expression an ektopischen Orten oder in unphysiologisch hohen Dosierungen. Möglich wurde dies durch den Einsatz des Hitzeschock-induzierbaren hsp70-Promotors. Dem zu untersuchenden Gen vorgeschaltet aktiviert dieser durch Inkubation bei 37°C dessen Transkription. Dies ermöglicht zwar eine zeitliche, aber keine räumliche Kontrolle der Genexpression, da diese ubiquitär erfolgt. Außerdem besitzt der hsp70-Promotor bereits bei niedrigeren Temperaturen eine Basalaktivität, die je nach zu untersuchendem Gen letal sein kann. Erst mit Hilfe des von entwickelten Gal4/UAS-Systems wurde eine zeitlich und räumlich beeinflussbare Genexpression möglich (Brand und Perrimon, 1993). Unter dem Einfluss zeit- und gewebespezifischer Enhancer wird in einem als „Aktivator“ bezeichneten Fliegenstamm der Hefe-Transkriptionsfaktor Gal4 exprimiert. In einem zweiten, „Effektor“ genannten Fliegenstamm steht das zu untersuchende Gen unter dem Einfluss von UAS-Sequenzen („upstream activating sequences“), den Bindungsstellen für Gal4. Durch Kreuzung von „Aktivator“- und „Effektor“-Stamm gelangen beide Komponenten in einen Organismus und führen zur Gal4/UAS-vermittelten Expression des Zielgens unter der räumlichen und zeitlichen Kontrolle der Enhancer.

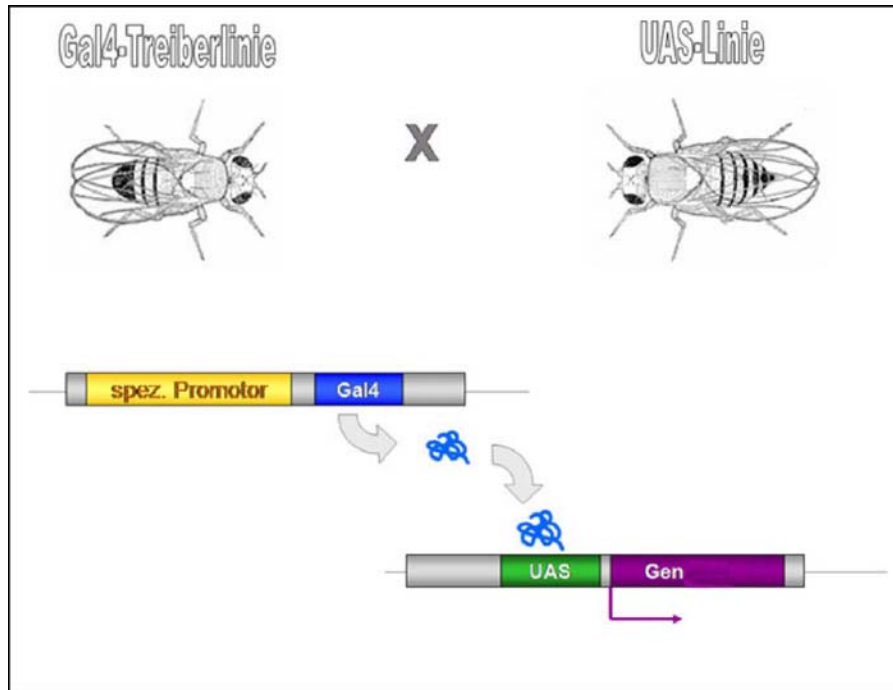


Abb 2.1: Das Prinzip des UAS-Gal4 Systems

Bei dem UAS-Gal4-System handelt es sich um ein *in vivo* System, welches aus zwei transgenen Fliegenlinien besteht: einer sogenannten Gal4-Treiber-Linie (Aktivatorlinie) und einer UAS-Linie (Effektorlinie). In der Gal4-Treiber-Linie wird ein natürlicherweise nicht vorkommender Transkriptionsfaktor (Gal4p) aus Hefe unter der Kontrolle eines spezifischen Promotors exprimiert. Kreuzt man die Treiber-Linie mit einer bestimmten UAS-Linie, so bindet Gal4 an die UAS-Sequenzen und induziert die Expression des gewünschten Gens. Auf diese Weise ermöglicht dieses System *in vivo* die durch den Promotor der Treiber-Linie spezifizierte räumlich und zeitlich gerichtete Expression eines bestimmten DNA-Abschnitts oder Gens. (modifiziert nach <http://www.mpibpc.gwdg.de/inform/MpiNews/cientif/jahrg10/4.04/blanke3g.jpg>)

2.6.4 Erzeugung von Keimbahnklon-(Kbk) Embryonen

Bei dem Flp-DFS-System (Flipase-dominant female sterile [ovoD1]) 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 µm 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 und Perrimon (1992) wurde dieses System erstmals zur Erzeugung von Keimbahnklonen genutzt. Hierzu wurden Chromosomen erzeugt, die *fs(1) ovo^{D1}* und FRT-Elemente tragen. Für die Erzeugung von Keimbahnklon-Embryonen denen

sowohl maternales als auch zygotisches Genprodukt für *DmPar-6* fehlt, wurden die beiden Stämme aus Tab. 2.7 miteinander gekreuzt. Mitotische Rekombination wurde in deren Nachkommen im zweiten Larvalstadium durch einen zweistündigen Hitzeschock bei 37°C an zwei aufeinanderfolgenden Tagen induziert.

2.7 Histologische Methoden

Antikörper	Beschreibung	Verdünnung	Referenz
aPKC	polyklonaler Kaninchen-Antikörper (nPKCζ C20)	1:500	Santa Cruz
Armadillo	monoklonaler Maus-Antikörper (7A1)	1:50	Riggelman et al., 1990
β-Galaktosidase	polyklonaler Kaninchen-Antikörper	1:5000	Promega
Bazooka	polyklonaler Kaninchen-Antikörper	1:500	Wodarz et al., 2000
Bazooka	polyklonaler Ratten-Antikörper	1:500	Wodarz et al., 1999
Crumbs	monoklonaler Maus-Antikörper (Cq4)	1:5	Tepaß und Knust, 1993
Crumbs	polyklonaler Ratten-Antikörper	1:500	Knust, nicht veröffentlicht
<i>DmPar-6</i>	polyklonaler Meerschweinchen-Antikörper	1:500, 1:1000(Wb)	Wodarz, nicht veröffentlicht
DPATJ	polyklonaler Kaninchen-Antikörper	1:1000-1:2000 (Wb)	Richard, 2005
Flag	monoklonale Maus-Antikörper (M2 und M5)	1:1000	Sigma
HA	monoklonaler Maus-Antikörper (12CA5)	1:500	Roche
Myc	monoklonaler Maus-Antikörper (c-Myc 9E10)	1:10	Evan et al., 1985
Myc	polyklonaler Kaninchen-Antikörper	1:1000	Upstate Biotechnology
Neurotakin	monoklonaler Maus-Antikörper	Nrt (Neurotakin)	Hartsch et al., 1990
StardustGUK	polyklonaler Ratten-Antikörper	1:500	Berger, nicht veröffentlicht
StardustN-L27C	polyklonaler Kaninchen-Antikörper	1:10-1:1000	diese Arbeit
Stardust1-N	polyklonaler Ratten-Antikörper	1:10-1:1000	Bulgakova, nicht veröffentlicht
StardustPDZ	polyklonaler Kaninchen-Antikörper	1:500	Bulgakova, nicht veröffentlicht

Tab. 2.12 verwendete Primärantikörper

Antikörper	Konjugat	Verdünnung	Referenz
Esel-anti-Kaninchen	Cy2	1:200	Dianova
Esel-anti-Kaninchen	Cy3	1:200	Dianova
Esel-anti-Meerschweinchen	Cy3	1:200	Dianova
Esel-anti-Ratte	Cy2	1:200	Dianova
Esel-anti-Ratte	Cy3	1:200	Dianova
Ziege-Anti-Maus	Cy2	1:200	Dianova
Ziege-Anti-Maus	Cy3	1:10.000	Dianova
Ziege-anti-Maus	HRP (Meerettichperoxidase)	1:10.000	Dianova

Tab. 2.13 verwendete Sekundärantikörper

2.7.1 Antikörperfärbung an Embryonen

Standardprotokoll (4%FA-Fixierung)

Embryonen 4 min in Natriumhypochlorid dechorionisieren, mit H₂O waschen

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

- Zweiten Antikörper abziehen, Embryonen 3 x 20 min mit PBT waschen
- Der Nachweis der Markierung erfolgt durch Fluoreszenzmikroskopie

Lösungen:

Fixierlösung : 1.92 ml PBS, 0.26 ml Formaldehyd (37%),
 1.82 ml Heptan
PBT : 1 x PBS mit 0,1% Triton X-100
PBS (10 x): 1.3 M NaCl; 70mM NaHPO₄ ; 30 mM NaH₂PO₄

2.7.2 Modifizierung des Standardprotokolls

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

2.7.3 Hitzefixierung

Die Hitzefixierung (Müller und Wieschaus, 1996) stellt eine alternative Fixierungsmethode zur Standardfixierung mit Formaldehyd dar und ist besonders dafür geeignet um die Lokalisation von Proteinen, die an die Plasmamembran lokalisieren, zu studieren. Für die Hitzefixierung werden folgende Schritte ausgeführt.

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

2.7.4 Antikörperfärbungen an Flügelimaginalscheiben des dritten Larvalstadiums

- Larven des gewünschten Stadiums in eiskaltem 1xPBS sammeln
- Imaginalscheiben in 1xPBS präparieren und in 3er Blockschälchen sammeln
- Fixierung in 4% Paraformaldehyd für 20min
- mindestens 3 x 20min in PBT waschen
- Inkubation mit dem primären Antikörper in PBT/5% Pferdeserum ü.N. bei 4°C
- mindestens 3 x 20min in PBT waschen
- Inkubation mit dem sekundären, Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper in PBT/5% Pferdeserum für 2h bei RT
- mindestens 3 x 20min in PBT waschen
- Imaginalscheiben eindeckeln in Glyzerin/Propylgalat (Präparate dunkel und kühl aufbewahren)

Lösungen:

PBT: 1 x PBS mit 0,1% Triton X-100

Glyzerin/Propylgalat: 50mg/ml Propylgalat in 75% Glyzerin

2.7.5 Präparation embryonaler Kutikula

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

Lösungen:

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

3 Ergebnisse

3.1 Komponenten des Crumbs und Bazooka Komplexes kolokalisieren in embryonalen Epithelien

Proteine des Crumbs Komplexes, Crb, Sdt, DPATJ, DLin-7 kolokalisieren in der subapikalen Region (SAR) von embryonalen Epithelien in *Drosophila melanogaster* (Bachmann et al., 2001; Bachmann et al., 2004; Bilder et al., 2003; Hong et al., 2001; Klebes and Knust, 2000). Für die Proteine des Bazooka Komplexes Baz, DmPar-6 und DaPKC, wurde ebenfalls eine apikale Lokalisation an der Membran epithelialer Zellen beobachtet (Betschinger et al., 2003; Hutterer et al., 2004; Kuchinke et al., 1998; Petronczki and Knoblich, 2001; Wodarz et al., 2000; Wodarz et al., 1999). Eine genauere immunohistochemische Lokalisation einiger Komponenten des Baz Komplexes, wie Bazooka, DmPar-6 und DaPKC in Bezug auf die Lokalisation von Crb, Sdt und DPATJ in dieser Arbeit zeigte, dass Proteine beider Komplexe ab dem Stadium der Gastrulation an der SAR von embryonalen Epithelien kolokalisieren. Exemplarisch für alle untersuchten Proteine ist eine Doppelfärbung für Crb und DmPar-6 abgebildet (Abb. 3.1). DmPar-6 und Crb kolokalisieren in Derivaten des Ektoderms, z.B. dem Vorder - und Hinterdarm, den Speicheldrüsen und der Epidermis sowie den trachealen Gruben, welche die Vorläufer der Tracheen darstellen. Zusätzlich ist DmPar-6 auch in Geweben lokalisiert, in denen Crb nicht zu finden ist, so z. B. im Mitteldarm (Abb. 3.1) und in den Neuroblasten (Abb. 3.14, C' Pfeil). Die starke Kolokalisation der beiden Proteinkomplexe in der SAR und ihre genetischen Wechselwirkungen (Bilder et al., 2003, Tanentzapf et al., 2003) lassen die Vermutung zu, dass die beiden Protein-Komplexe physikalisch miteinander wechselwirken können und vielleicht Teil einer Wirkungskette sind. Um einen genaueren Einblick in die Interaktionen der Proteine der subapikalen Region zu erhalten, wurde die Bindungsanalyse zwischen Komponenten des Baz Komplexes: Baz, DaPKC, DmPar-6 sowie DCdc-42 mit Proteinen des Crb Komplexes: Crb, DPATJ und Sdt durchgeführt. Des Weiteren wurde die Interaktion zwischen Komponenten des Crb Komplexes, Crb, DPATJ und Sdt untereinander analysiert. Die Wechselwirkungen zwischen Mitgliedern des Baz Komplexes wurden nicht näher analysiert, da bereits ausführliche Interaktionsstudien der Proteine des Baz Komplexes durchgeführt wurden. (Ramrath, 2002; Egger-Adam, 2005). Für die Bindungsanalysen wurde im ersten Schritt das Hefe-Zwei-Hybrid System verwendet, eine Methode, die es unter anderem erlaubt, Interaktionen bekannter Proteine nachzuweisen (s. 3.2).

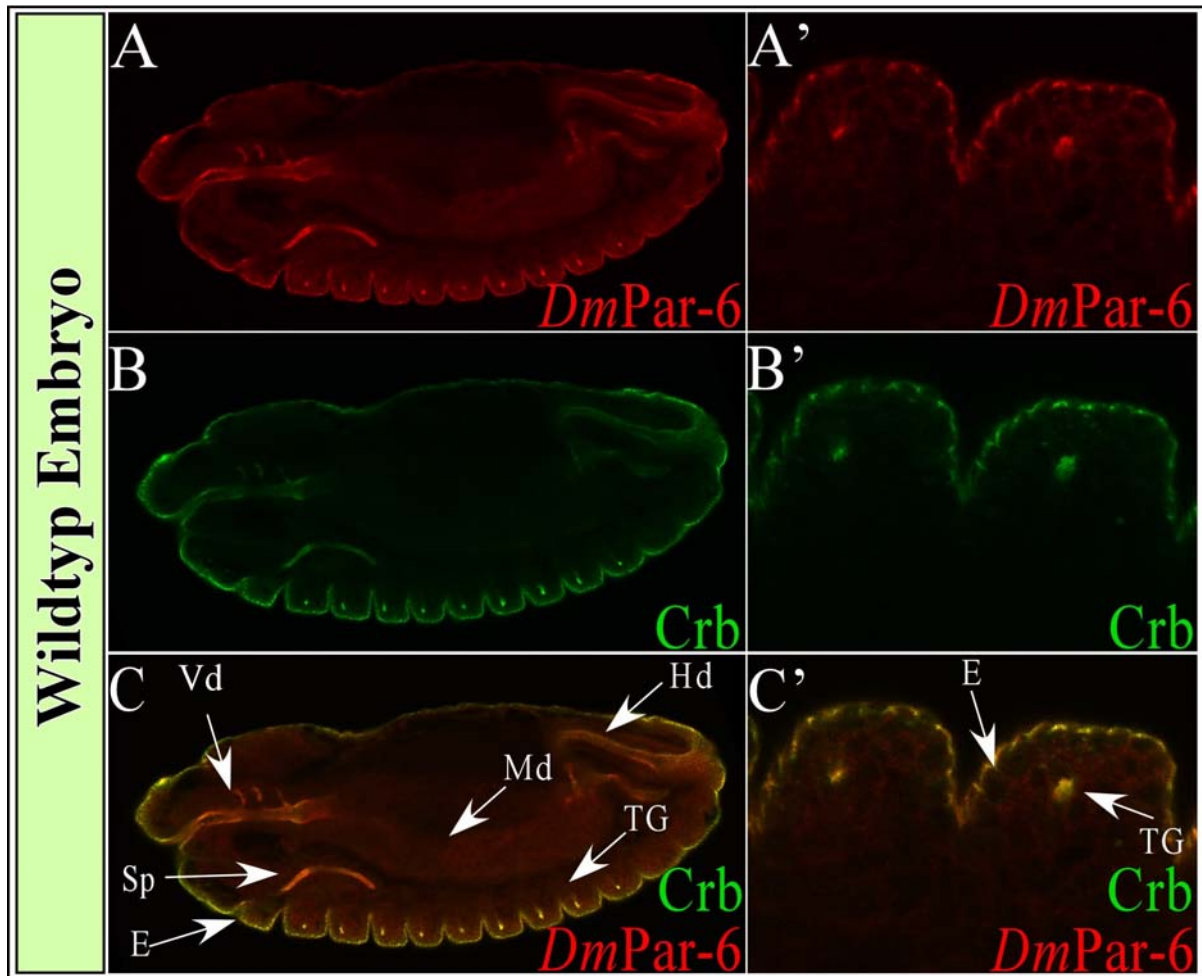


Abb. 3.1: Crb und DmPar-6 kolokalisieren subapikal in embryonalen Epithelien von *Drosophila melanogaster*

A-C Stadium 13 Wildtyp Embryo, A' - C' Vergrößerung desselben Embryos, Fokus auf die Epidermis (E). Crb und DmPar-6 kolokalisieren in Derivaten des Ektoderms: Epidermis (E), Hinterdarm (Hd), Vorderdarm (Vd), Speicheldrüsen (Sp) und den trachealen Gruben (TG), im Mitteldarm (Md) wird nur DmPar-6 exprimiert. Anterior zeigt nach links, posterior nach rechts, dorsal nach oben und ventral nach unten.

3.2 Proteine der subapikalen Region interagieren im Hefe-Zwei-Hybrid System

Das Hefe-Zwei-Hybrid System ist eine von Fields und Song (1989) entwickelte Methode, in der die zu untersuchenden Proteine mit der Gal4p-DNA-Bindedomäne bzw. der Gal4p-Aktivierungsdomäne fusioniert und in einem speziellen *S. cerevisiae* Reporterstamm produziert werden. Bei einer Interaktion der Proteine kommt es zu einer Aktivierung der in den Stamm integrierten Reportergene *lacZ* und *HIS3*. Das Wachstum des auxotrophen Stammes auf Histidin-freiem Medium sowie die Aktivität der β -Galaktosidase werden hierbei als Maß für die Stärke der Interaktion betrachtet. Durch eine qualitative Methode (*colony-lift-filter assay*) wurden die Interaktionen zwischen einigen Proteinen der subapikalen Region

nachgewiesen. Eine Quantifizierung der hier identifizierten Interaktionen erfolgte anschließend durch einen flüssigen ONPG-Test.

3.2.1 Interaktionen des Crb und Bazooka Komplexes

In diesem Abschnitt wurde untersucht, ob die Komponenten des Crb Komplexes (Crb, Sdt, DPATJ) mit Komponenten des Baz Komplexes (Baz, *DmPar-6*, DaPKC) im Hefe-Zwei-Hybrid mitaneinander interagieren.

3.2.1.1 Crb und *DmPar-6* interagieren

In Vertebraten konnte gezeigt werden, dass eine Verbindung zwischen den CRB und PAR-3 Komplexen besteht und dass PAR-6 dabei als Verbindungsmolekül fungiert. So konnte in epithelartigen HeLa Zellen, die aus einer stabilen Zelllinie eines Zervix-Karzinoms der Patientin Henrietta Lacks stammen, gezeigt werden, dass CRB3 (ein Crb Homolog in Vertebraten) abhängig von seinem PDZ Bindemotiv PAR-6 an die Plasmamembran rekrutieren kann (Hurd et al., 2003). Eine direkte Interaktion zwischen PAR-6 und hCRB3 (dem humanen Homolog von Crumbs) wurde im Hefe-Zwei-Hybrid System beobachtet (Lemmers, et al., 2004).

Um herauszufinden, ob diese Interaktion ebenfalls in *Drosophila* zu finden ist, wurde Crb mit *DmPar-6* auf Interaktion hin analysiert. Eine Bindung zwischen der intrazellulären Region von Crb und *DmPar-6* konnte in *Drosophila* mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid Systems identifiziert werden. Um herauszufinden, welche Domäne von *DmPar-6* für diese Interaktion verantwortlich ist, wurden verschiedene Domänen von *DmPar-6* getestet (Abb. 3.2). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die PDZ Domäne von *DmPar-6* für die Interaktion mit Crb ausreichend ist. Die letzten vier Aminosäuren (ERLI) der intrazellulären Domäne von Crb stellen ein PDZ-Bindemotiv dar. Dies lässt vermuten, dass die Interaktion zwischen der PDZ Domäne von *DmPar-6* über diese Aminosäuren stattfindet. Tatsächlich findet keine Interaktion zwischen Crb und *DmPar-6* statt, wenn das ERLI Motiv deletiert ist (Abb. 3.3).

Crumbs intrazelluläre Domäne PDZ-Binde-Motiv ERLI 1-37	DmPar-6 PB1 Crib PDZ 1-351 100 aa	Interaktion Nachweis der Interaktion durch enzymatische Farbentwicklung in Anwesenheit von β -Galaktosidase
ERLI 1-37	1-351	++
ERLI 1-37	1-133	-
ERLI 1-37	114-176	-
ERLI 1-37	114-267	+
ERLI 1-37	156-261	++

Abb. 3.2: Crb interagiert mit DmPar-6 im Hefe-Zwei-Hybrid System

Zwischen der intrazellulären Region von Crb und dem vollständigen DmPar-6 sowie der PDZ Domäne von DmPar-6 konnte eine starke Bindung nachgewiesen werden. Eine Region, welche die CRIB und die PDZ Domänen von DmPar-6 umfasst, zeigt eine schwache Interaktion mit Crb. Sowohl die ersten 133 Aminosäuren als auch die Crib Domäne von DmPar-6 binden nicht an Crb. Die Interaktionen wurden durch einen enzymatischen Farbttest, der die Expression des Reportergens wiedergibt, überprüft. Die visuelle Beobachtung ergab entweder eine starke Blaufärbung nach einer Stunde (+: starke Interaktion), eine schwache Blaufärbung nach 1- 4 Stunden (+: schwache Interaktion) oder keine Blaufärbung nach 4 Stunden (-: keine Interaktion). Die Zahlen geben die Aminosäuren der Proteine an, die für die Untersuchungen verwendet wurden.

Crumbs intrazelluläre Domäne PDZ-Binde-Motiv ERLI 1-37	DmPar-6 PB1 CribPDZ 1-351 100 aa	Interaktion Nachweis der Interaktion durch enzymatische Farbentwicklung in Anwesenheit von β -Galaktosidase
ERLI 1-33	1-351	-
ERLI 1-33	114-267	-
ERLI 1-33	156-261	-

Abb. 3.3: Das ERLI Motiv von Crb ist notwendig für die Bindung an DmPar-6 im Hefe-Zwei-Hybrid System

Die Interaktion wurde durch einen enzymatischen Farbttest, der die Expression des Reportergens wiedergibt, überprüft. Die visuelle Beobachtung ergab keine Blaufärbung nach 4 Stunden (-: keine Interaktion). Die Zahlen geben die Aminosäuren der Proteine an, die für die Untersuchungen verwendet wurden.

3.2.1.2 Sdt1-566 interagiert mit der PDZ Domäne von *DmPar-6*

Neben der im Abschnitt 2.2.1.1 erwähnten Bindung zwischen CRB3 und PAR-6 in Vertebraten wurde eine Bindung zwischen PAR-6 und PALS1 (dem Vertebraten Homologen von Sdt) in HEK293 (*human embryonic kidney*) Zellen identifiziert (Hurd et al., 2003). Um herauszufinden, ob neben Crb auch Sdt potentielle Bindungsstellen für *DmPar-6* besitzt, wurde im Folgenden die Bindung zwischen Sdt und *DmPar-6* im Hefe-Zwei-Hybrid System analysiert. Für Stardust konnte gezeigt werden, dass sein N- Terminus *DmPar-6* bindet (Abb. 3.4). Um die Bindungsstelle von *DmPar-6* an Stardust näher einzugrenzen, wurden die Crib und PDZ Domänen sowohl zusammen als auch einzeln mit Stardust auf Interaktion getestet. Dabei zeigte sich, dass die Bindung zwischen Stardust und *DmPar-6* abhängig von der PDZ-Domäne von *DmPar-6* ist. Die mit *DmPar-6* interagierende Region von Stardust ist auf die ersten 566 Aminosäuren von Stardust begrenzt (Abb. 3.5). Diese Region enthält beide ECR (*evolutionary conserved region*) Domänen (Wang et al., 2004). Im Gegensatz dazu binden weder die Hook-GUK noch die PDZ oder die PDZ-GUK Domänen an *DmPar-6*.

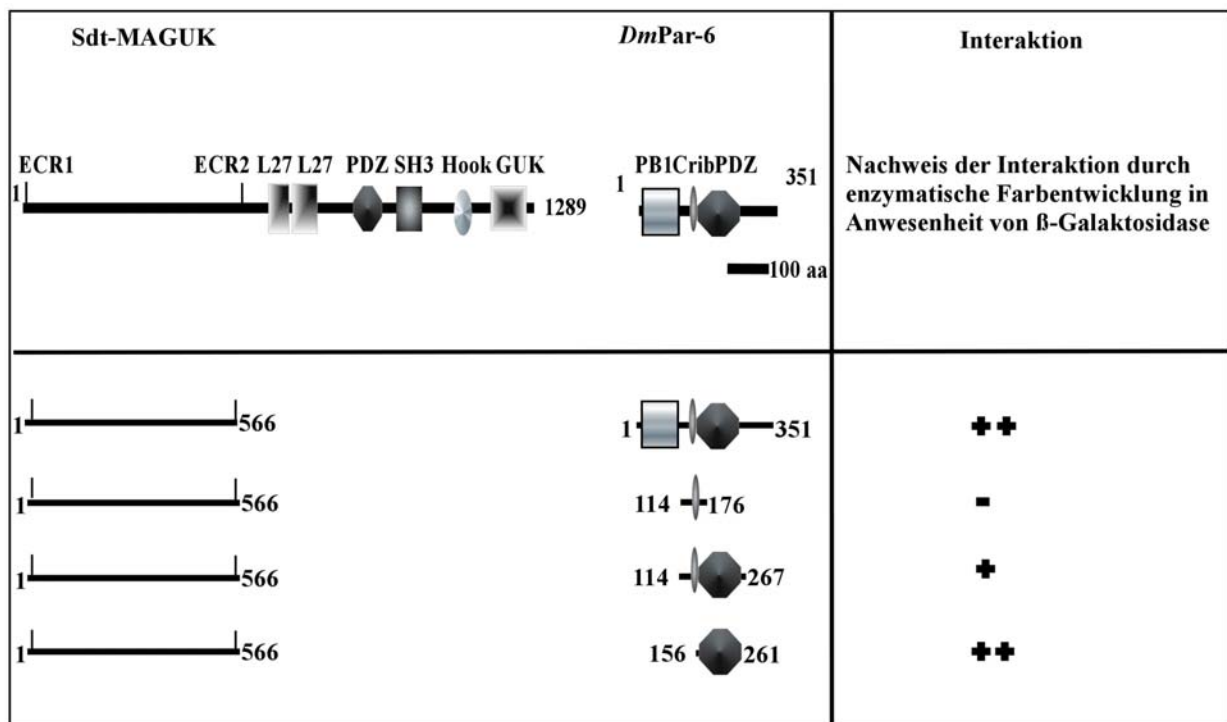


Abb. 3.4: Sdt bindet an die PDZ-Domäne von *DmPar-6* im Hefe-Zwei-Hybrid System

Sowohl das vollständige *DmPar-6* als auch die PDZ Domäne von *DmPar-6* alleine zeigen eine starke Interaktion mit Stardust. Eine Region, welche die beiden Crib und PDZ Domänen von *DmPar-6* enthält, zeigt eine schwache Interaktion mit Stardust. Die Interaktionen wurden durch einen enzymatischen Farbttest überprüft, der die Expression des Reportergens wiedergibt. Die visuelle Beobachtung ergab entweder eine starke Blaufärbung (++: starke Interaktion) nach einer Stunde, eine schwache Blaufärbung nach 1-4 Stunden (+: schwache Interaktion), oder keine Blaufärbung nach 4 Stunden (-: keine Interaktion). Die Zahlen geben die Aminosäuren der Proteine an, die für die Untersuchungen verwendet wurden.

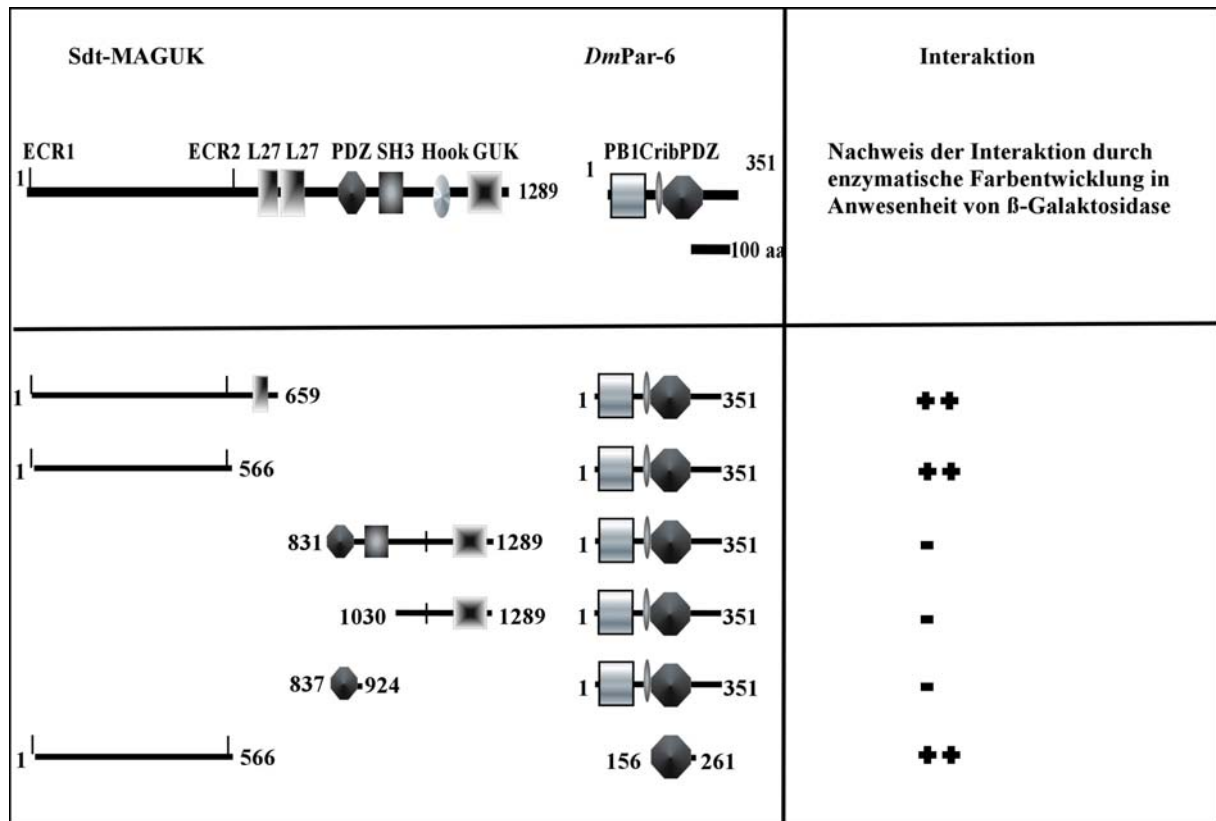


Abb. 3.5: Die ersten 566 Aminosäuren von Stardust binden an die PDZ-Domäne von *DmPar-6* im Hefe-Zwei-Hybrid System

Die ersten 566 Aminosäuren von Stardust, welche beide ECR Domänen enthalten, reichen aus, um die PDZ Domäne von *DmPar-6* zu binden. Die Interaktionen wurden durch einen enzymatischen Farbttest, der die Expression des Reportergens wiedergibt, überprüft. Die visuelle Beobachtung ergab entweder eine starke Blaufärbung nach einer Stunde (++: starke Interaktion) oder keine Blaufärbung nach 4 Stunden (-: keine Interaktion). Die Zahlen geben die Aminosäuren der Proteine an, die für die Untersuchungen verwendet wurden.

3.2.1.3 Crb und Sdt binden nicht DaPKC und Baz

Um eine mögliche Interaktion von Crb und Sdt mit DaPKC und Baz zu testen, wurden die intrazelluläre Regionen von Crb und die PDZ-GUK, Hook-GUK Domänen von Sdt benutzt (Abb. 3.6 und 3.7). Mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid Systems konnte keine Interaktion zwischen den untersuchten Proteinen festgestellt werden.

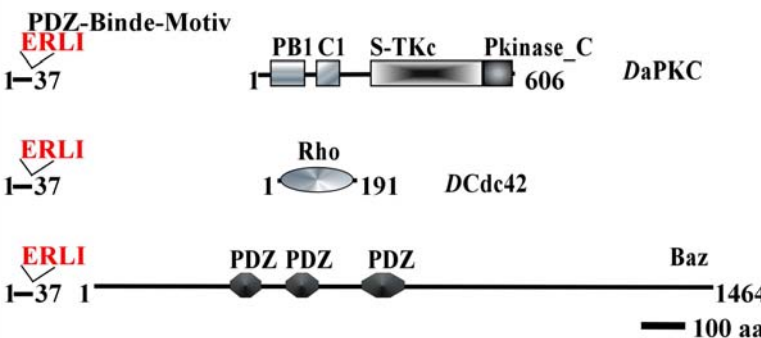
Crumbs intrazelluläre Domäne <i>DaPKC, DCdc42, Baz</i>	Interaktion Nachweis der Interaktion durch enzymatische Farbentwicklung in Anwesenheit von β-Galaktosidase
	- - -

Abb. 3.6: Crb interagiert nicht mit Baz, DaPKC und DCdc-42 im Hefe-Zwei-Hybrid System

Die vollständigen DaPKC und Bazooka Proteine wurden mit der intrazellulären Domäne von Crb auf Interaktion getestet. Die Interaktionen wurden durch einen enzymatischen Farbttest überprüft, der die Expression des Reportergens wiedergibt. Die visuelle Beobachtung ergab keine Blaufärbung nach 4 Stunden (-: keine Interaktion). Die Zahlen geben die Aminosäuren der Proteine an, die für die Untersuchungen verwendet wurden.

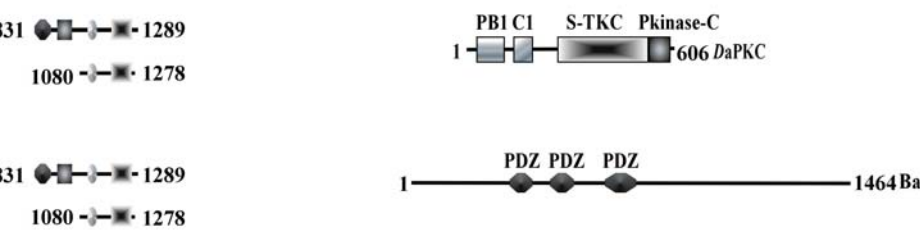
Sdt-MAGUK Baz und DaPKC (s.u.)	Interaktion Nachweis der Interaktion durch enzymatische Farbentwicklung in Anwesenheit von β-Galaktosidase
	- - - -

Abb. 3.7: SdtPDZ-Guk und SdtHook-GUK interagieren nicht mit Baz und DaPKC im Hefe-Zwei-Hybrid System

DaPKC und Baz wurden mit der PDZ-GUK Domäne bzw. mit der Hook-GUK Domäne von Sdt auf Bindung getestet. Die Interaktionen wurden durch einen enzymatischen Farbttest, der die Expression des Reportergens wiedergibt, überprüft. Die visuelle Beobachtung ergab keine Blaufärbung nach 4 Stunden (-: keine Interaktion). Die Zahlen geben die Aminosäuren der Proteine an, die für die Untersuchungen verwendet wurden.

3.2.1.4 *DmPar-6* bindet nicht *DPATJ* im Hefe-Zwei-Hybrid System

Mit Hilfe von *in vitro* und *in vivo* Analysen konnte gezeigt werden, dass *DmPar-6* und Baz aneinander binden (Petronczki et al., 2001). In Vertebraten und in *C.elegans* konnte gezeigt werden, dass die dritte PDZ Domäne von PAR-3 und die PDZ Domäne von PAR-6 in eine direkte Interaktion involviert sind (Joberty et al., 2000; Lin et al., 2000). Ein weiteres PDZ Protein stellt das *DPATJ* Protein dar, das Mitglied des Crb Komplexes ist. Um eine mögliche Interaktion zwischen *DmPar-6* und *DPATJ* zu testen, wurde diese Bindung im Hefe-Zwei-Hybrid System getestet. Die Bindungsanalyse zwischen *DmPar-6* und *DPATJ* zwischen den untersuchten Bereichen der Proteine ergab keine Interaktion (Abb. 3.8). Für die Bindungsstudien wurden die ersten 133 Aminosäuren von *DmPar-6*, welche die PB1 Domäne enthalten und eine Region, welche die Crib und PDZ Domänen von *DmPar-6* enthält, mit den PDZ Domänen von *DPATJ* getestet.

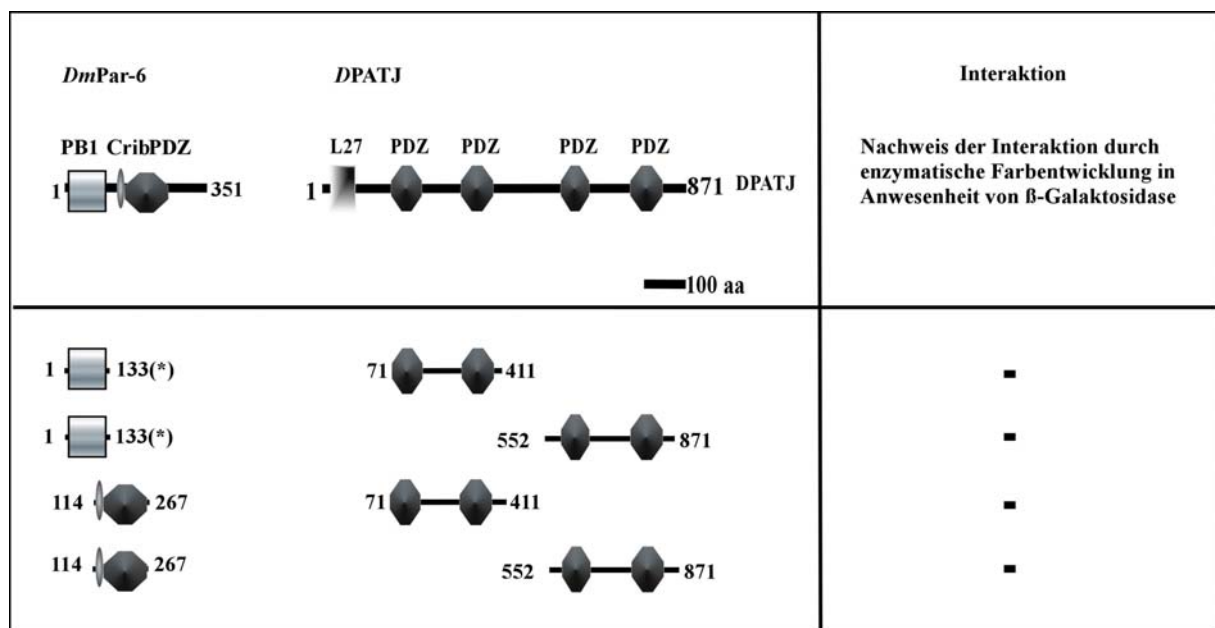


Abb. 3.8: *DmPar-6* bindet nicht *DPATJ* im Hefe-Zwei-Hybrid System

Die PDZ Domänen von *DPATJ* wurden jeweils mit der PB1 Domäne von *DmPar-6* oder mit den Crib-PDZ enthaltenden Region auf Wechselwirkung getestet. Es konnte keine Interaktion zwischen den untersuchten Proteinen gezeigt werden. Die Interaktionen wurden durch einen enzymatischen Farbttest überprüft, der die Expression des Reportergens wiedergibt. Die visuelle Beobachtung ergab keine Blaufärbung nach 4 Stunden (-: keine Interaktion). Die Zahlen geben die Aminosäuren der Proteine an, die für die Untersuchungen verwendet wurden.

3.2.2 Interaktionen zwischen Proteinen des Crb Komplexes

In diesem Abschnitt wurde untersucht, ob die Komponenten des Crb Komplexes (Crb, Sdt, DPATJ) im Hefe-Zwei-Hybrid miteinander interagieren.

Für die bereits bekannte Interaktion zwischen DPATJ und Sdt (Roh et al., 2002, Kilinc et al., 2002) wurde eine Feinkartierung der Bindungsregionen zwischen Sdt und DPATJ durchgeführt, außerdem untersucht, ob die beiden Proteine Sdt und Crb dimerisieren können.

In früheren Versuchen konnte gezeigt werden, dass Crb und Sdt aneinander binden (Bachmann et al., 2001, Berger, unveröffentlichte Daten), im Gegensatz zu Crb und DPATJ, die keine direkte Interaktion zeigen (Kilinc, 2002).

3.2.2.1 Die L27N Domäne von Sdt interagiert mit der L27 Domäne von DPATJ

In Vertebraten bindet das Sdt-Homolog PALS1 mit seiner N-terminalen L27 Domäne an die L27 Domäne von PATJ. Die Interaktion der beiden Proteine ist in *Drosophila* ebenfalls konserviert und es wurde gezeigt, dass für diese Bindung der N-Terminus von Sdt mit der L27 Domäne von DPATJ notwendig ist (Roh et al., 2002; Kilinc, 2002). In *Drosophila* gibt es eine konservierte L27 Domäne, die stark homolog zu der C-terminalen L27 Domäne von PALS1 ist. Diese Domäne bindet sowohl in Vertebraten als auch *Drosophila* an Lin-7/ DLin-7. Anhand von Homologievergleichen konnte eine weniger konservierte L27 Domäne von Sdt in seinem N-Terminus identifiziert werden (Knust, unveröffentlichte Daten). Um herauszufinden, ob diese N-terminale L27 Domäne von Sdt für die Bindung mit der L27 Domäne von DPATJ verantwortlich ist, wurde diese Interaktion im Hefe-Zwei Hybrid System untersucht. Bei Interaktionsanalysen zwischen Sdt und DPATJ konnte gezeigt werden, dass die L27 Domäne von DPATJ ausreichend ist, eine Region von Sdt zu binden, die beide L27 Domänen enthält (Abb. 3.9). Weiterhin stellte sich heraus, dass die N-terminale L27 Domäne von Sdt ausreichend ist, um DPATJ zu binden. Weder die C-terminale L27 Domäne noch der N-Terminus mit den beiden ECR Domänen oder die PDZ Domäne von Stardust binden DPATJ.

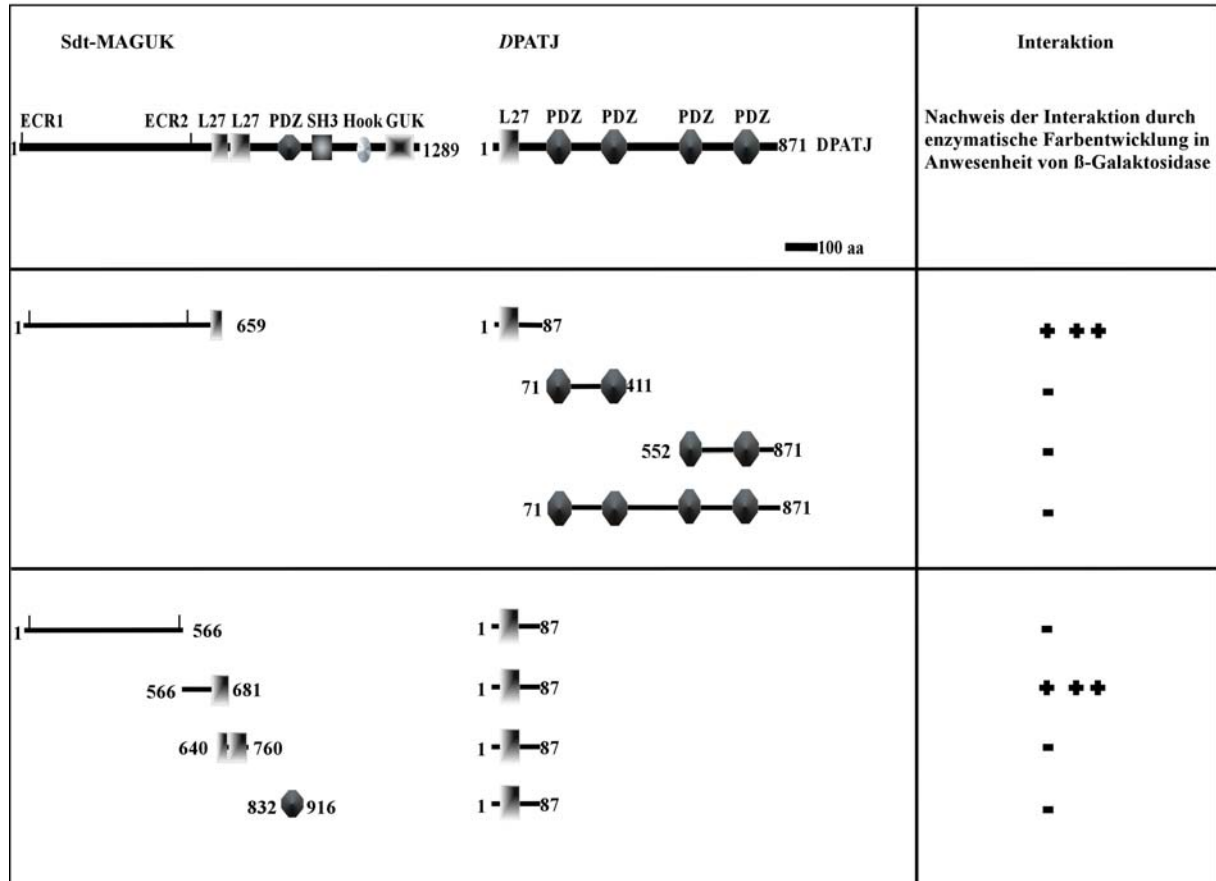


Abb. 3.9: Sdt bindet über seine N-terminale L27 Domäne an die L27 Domäne von DPATJ im Hefe-Zwei-Hybrid System

Die ersten 87 Aminosäuren von DPATJ, die die L27 Domäne enthalten, reichen aus, um die ersten 659 Aminosäuren von Sdt zu binden, welche die N-terminale L27 Domäne und die ECR Domänen von Sdt enthalten. Die N-terminale L27 Domäne von Sdt reicht aus, um die L27 Domäne von DPATJ zu binden. Die Interaktionen wurden durch einen enzymatischen Farbtest überprüft, der die Expression des Reportergens wiedergibt. Die visuelle Beobachtung ergab entweder eine sehr starke Blaufärbung (+++: sehr starke Interaktion) nach einer Stunde oder keine Blaufärbung nach 4 Stunden (-: keine Interaktion). Die Zahlen geben die Aminosäuren der Proteine an, die für die Untersuchungen verwendet wurden.

3.2.2.2 Die intrazelluläre Domäne von Crb dimerisiert nicht

Um eine mögliche Dimerisierung zwischen der intrazellulären Region von Crb zu identifizieren wurden die 37 Aminosäuren von Crb im Hefe-Zwei-Hybrid System auf Interaktion getestet. Es konnte keine Interaktion identifiziert werden (Abb. 3.10).

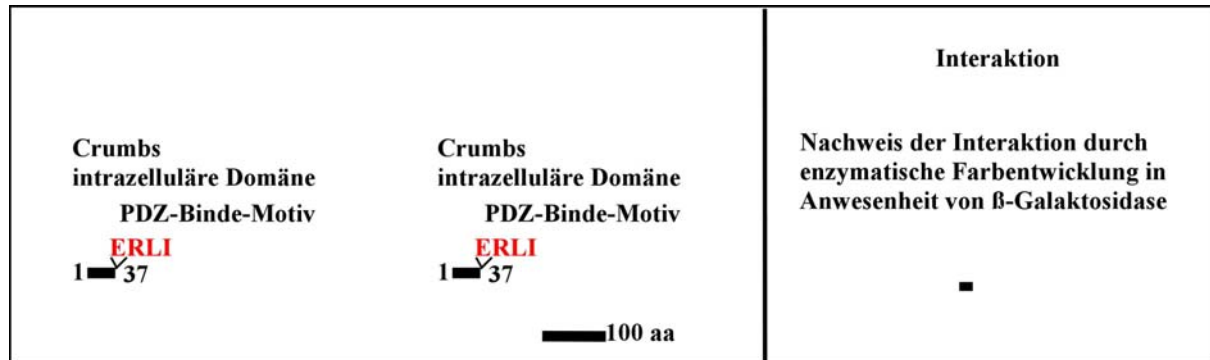


Abb. 3.10: Die intrazelluläre Domäne von Crb bindet nicht an seine eigene intrazelluläre Domäne im Hefe-Zwei-Hybrid System

Die Interaktion wurde durch einen enzymatischen Farbttest überprüft, der die Expression des Reportergens wiedergibt. Die visuelle Beobachtung ergab keine Blaufärbung nach 1-4 Stunden (-: keine Interaktion). Die Zahlen geben die Aminosäuren der Proteine an, die für die Untersuchungen verwendet wurden.

3.2.2.3 Die SH3 und Hook-GUK Domänen von Sdt bilden inter- und intramolekulare Bindungen aus

Das humane Homolog von Stardust, hMPP5, sowie hCASK, Dlg und PSD-95, die zu den Membran-assoziierten Guanylatkinasen gehören, zeigen jeweils inter- bzw. intramolekulare Interaktionen, in denen ihre SH3 und GUK Domänen involviert sind (Masuko et al., 1999; McGee und Bredt, 1999; Nix et al., 2000; Shin et al., 2000; Kantardzhieva, Gosens et al. 2005).

Um herauszufinden, ob es diese inter- bzw. intramolekularen Wechselwirkungen zwischen den GUK und SH3 Domänen in Stardust gibt, wurden diese Interaktionen ebenfalls im Hefe-Zwei-Hybrid System getestet. Verschiedene Bereiche von Sdt wurden dazu untereinander getestet (Abb. 3.11). In früheren Versuchen konnte keine direkte Interaktion zwischen der SH3 Domäne und GUK Domäne von Sdt im Hefe-Zwei-Hybrid System gezeigt werden (Kilinc, 2002). Da für diese Art der Interaktion nicht nur die einzelnen Domänen, sondern auch flankierende Bereiche notwendig sind (McGee und Bredt, 2001; Kantardzhieva et al., 2005), wurde die zu testende Region mit der GUK Domäne N-terminal um 30 Aminosäuren verlängert. Diese Aminosäuresequenz, die neben der GUK auch die Hook Domäne enthält, wurde mit der SH3 Domäne von Sdt auf Interaktion getestet. In diesem Falle konnte eine sehr starke Bindung identifiziert werden. Diese Bindung war stärker als die Interaktion zwischen einer Region von Sdt (PDZ-GUK), welche die PDZ, SH3, Hook und GUK Motive umfasst, einem Bereich von Sdt, die die Hook und GUK Domänen enthält. Es wurde keine Interaktion zwischen PDZ-GUK und PDZ-GUK beobachtet, was auf eine intramolekulare Bindung schließen lässt.

Der N-Terminus 1-566 von Stardust, der eine interne PDZ-Bindestelle beinhaltet, kann die PDZ Domäne von *DmPar-6* (2.2.1.2) binden. Hier wurde untersucht, ob der N-Terminus von Stardust seine eigene PDZ Domäne binden kann. Eine Bindung zwischen den getesteten Regionen konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. L27 Domänen stellen heterologe Protein-Bindungen her, so binden z. B. Lin-7/Lin-2 oder DPATJ/Stardust, PALS1/DPATJ, durch Heterodimerisierung aneinander. Um herauszufinden, ob auch Homodimerisierungen in L27 Domänen vorkommen, wurden die beiden L27 Domänen von Sdt auf Interaktion getestet. Dazu wurden die L27N und die L27C Domäne von Stardust bzw. L27C und L27C Domäne untereinander getestet. Es wurde jedoch keine Interaktion gefunden.

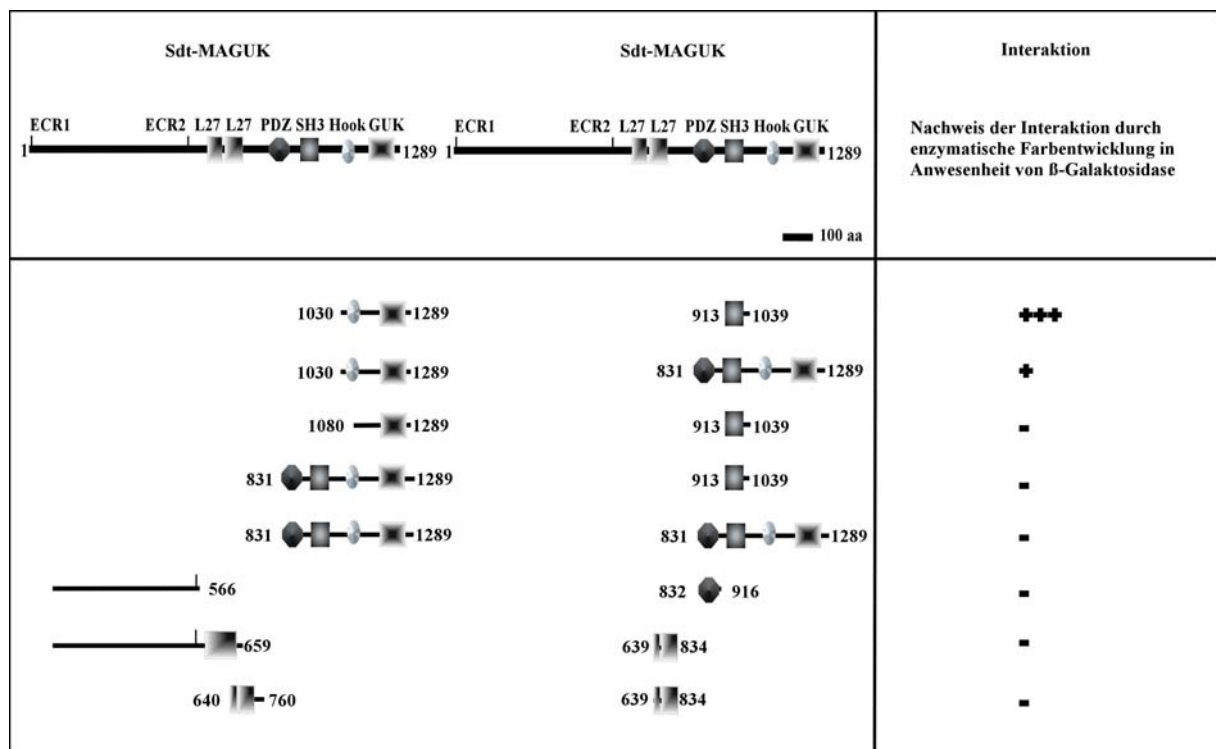


Abb. 3.11: Die SH3 und Hook-GUK Domänen von Stardust binden im Hefe-Zwei-Hybrid System aneinander
Neben der Bindung zwischen Hook-GUK an die SH3 Domäne von Stardust gibt es auch eine Interaktion zwischen den Hook-GUK Domänen und einer Region von Sdt, welche die PDZ-GUK Domänen von Stardust enthält. Diese ist im Vergleich zu der Ersteren viel schwächer. Im Gegensatz dazu bindet der N-Terminus von Sdt nicht seine PDZ Domäne und die L27 Domänen von Sdt zeigen ebenfalls keine Interaktion. Die Interaktionen wurden durch einen enzymatischen Farbttest, der die Expression des Reportergens wiedergibt, überprüft. Die visuelle Beobachtung ergab entweder eine sehr starke Blaufärbung (+++: sehr starke Interaktion) nach einer Stunde, eine schwache Blaufärbung nach einer Stunde (+: schwache Interaktion) oder keine Blaufärbung nach vier Stunden (-: keine Interaktion). Die Zahlen geben die Aminosäuren der Proteine an, die für die Untersuchungen verwendet wurden.

3.2.3 Quantifizierung der Bindungsstärken der identifizierten Interaktionen des Crb und Baz Komplexes

Um einen Hinweis darüber zu erhalten, ob eine der identifizierten Bindungen präferentiell ausgebildet wird, wurden die Bindungsaffinitäten zwischen Crb und den PDZ Domänen von Sdt und *DmPar-6* unter Verwendung eines quantitativen ONPG-Tests näher bestimmt.

Bei der von Miller (1972) entwickelten Methode wird das Substrat ONPG (o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid) in ein gelbes Produkt gespalten, das photometrisch bei 420 nm bestimmt wird. Mit der in 2.4.3 angegebenen Formel berechnet sich hieraus die Enzymaktivität, die in Miller Units (MU) angegeben wird.

Zunächst wurden die Interaktionsstärken zwischen der intrazellulären Domäne von Crb mit den PDZ Domänen von Stardust und *DmPar-6* bestimmt (Abb. 3. 12). Sie erwiesen sich als sehr ähnlich und betrugen 3 bzw. 2,5 MU. Fehlt das PDZ Bindemotiv ERLI in der intrazellulären Domäne von Crb, erniedrigt sich die Bindungsstärke auf 0,15 MU. In derselben Tabelle (Abb. 3. 12) ist die Interaktion zwischen den ersten 566 Aminosäuren von Stardust mit der PDZ Domäne von *DmPar-6* zu finden, deren Wert bei 4 MU lag. Die Bindungsstärken zwischen der SH3 und GUK Domäne von Stardust (Abb. 3. 13) ergaben mit 52 MU die stärkste Interaktion. Die Interaktion zwischen SdtPDZ-GUK und SdtHook-GUK hingegen lag mit 0,24 MU sehr nah bei den Werten der Negativkontrollen, die wie für alle verwendeten Negativkontrollen Bindungsstärken zwischen 0, 16 und 0,18 MU zeigten. Die Quantifizierung der Bindungs-Stärke zwischen der L27N Domäne von Stardust mit der L27 Domäne von DPATJ ergab 43 MU.

Zusammenfassung der mittels Hefe-Zwei-Hybrid Systems getesteten Interaktionen

Anh der durchgeführten Analysen konnte eine Bindung zwischen der intrazellulären Region von Crb und der PDZ Domäne von *DmPar-6* identifiziert werden. Ebenfalls interagiert die PDZ Domäne von *DmPar-6* mit dem N-Terminus 1-566 von Stardust. Außerdem konnte eine inter- oder intramolekulare Bindung zwischen der Hook-GUK und SH3 Domäne von Stardust identifiziert werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die L27 Domäne von DPATJ an die L27N Domäne von Stardust bindet. Die identifizierten Interaktionen wurden quantitativ mit Hilfe eines flüssigen ONPG-Tests bestimmt. Am stärksten interagierten dabei die SdtHook-GUK und SdtSH3 Domänen untereinander, gefolgt von der Bindung zwischen SdtL27N und DPATJL27. Die Interaktion zwischen *DmPar-6* und Sdt war die drittstärkste, gefolgt von den Bindungen zwischen der intrazellulären Region von Crb und den PDZ Domänen von Stardust und *DmPar-6*, die ungefähr gleich stark waren. Es konnte keine direkte

Bindung zwischen Crb und Baz, Crb und DaPKC, Sdt und Baz, Sdt und DaPKC, DPATJ und *DmPar-6* nachgewiesen werden.

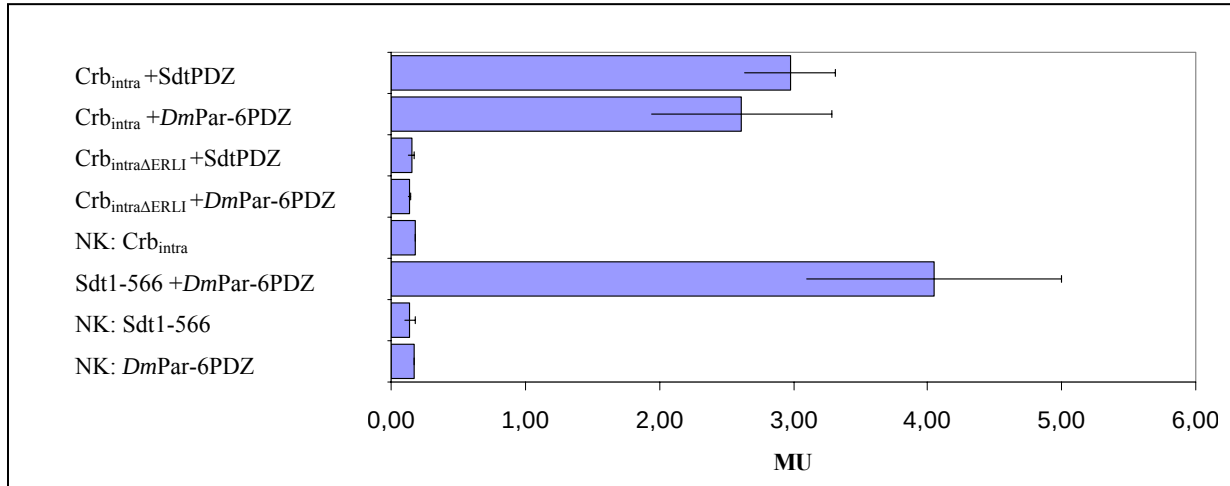


Abb. 3.12: Quantifizierte Bindungsstärken zwischen Crb und Sdt/ *DmPar-6* sowie zwischen Sdt1-566 und *DmPar-6* mit Hilfe eines flüssigen ONPG-Tests

Die Bindung zwischen der intrazellulären Region von Crb und SdtPDZ bzw. *DmPar-6*PDZ ist mit 3 bzw. 2,5 MU (Miller Units) ähnlich stark. Die Interaktionsstärke zwischen *DmPar-6* und Sdt1-566 liegt mit 4 MU höher als die zuvor beschriebenen. Das Fehlen des ERLI Motivs in der intrazellulären Region von Crb führt dazu, dass die Bindung zwischen Crb und den PDZ Domänen von Sdt bzw. *DmPar-6* mit 0,15 MU abnimmt und ähnlich stark ist wie die Negativkontrollen mit 0,14 und 0,18 MU. Die Enzymaktivität der β -Galaktosidase wurde von je drei unabhängigen Transformanten bestimmt.

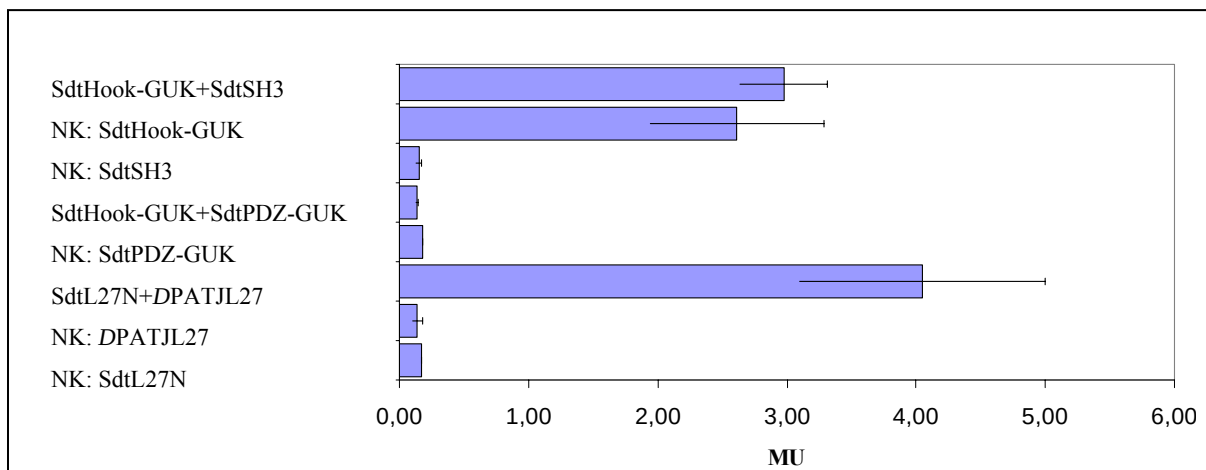


Abb. 3.13: Quantifizierte Bindungsstärken zwischen den SH3 und Hook-GUK Domänen von Sdt und zwischen SdtL27 und DPATJL27

Die Bindung zwischen SdtHook-GUK und SdtSH3 liegt bei 3,0 MU (Miller Units), diejenige zwischen SdtL27N und DPATJL27 bei 4,0 MU. Die Bindung zwischen SdtPDZ-GUK und SdtHook-GUK ist mit 0,24 MU nicht wesentlich höher als die der Negativkontrollen, mit 0,16 und 0,18 MU. Die Enzymaktivität der β -Galaktosidase wurde von je drei unabhängigen Transformanten bestimmt.

3.2.4 Crb und Stardust binden an *DmPar-6* im GST-Pulldown

Um die mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid Systems gefundenen Interaktionen zwischen Crb und *DmPar-6* sowie zwischen Sdt und *DmPar-6* zu verifizieren, wurde ein GST-Pulldown

durchgeführt. Hierzu wurden GST- (Gluthation S-Transferase) Fusionsproteine verwendet, die die ersten 566 As von Sdt, sowie die vollständige intrazelluläre Domäne von Crb und die intrazelluläre Domäne von Crb, ohne das PDZ-Bindemotiv ERLI enthielten. Der GST-Pulldown ergab, dass sowohl die intrazelluläre Domäne von Crb als auch die ersten 566 As von Stardust *DmPar-6* aus Proteinextrakt von Wildtyp-Embryonen binden können (Abb. 3.14 A).

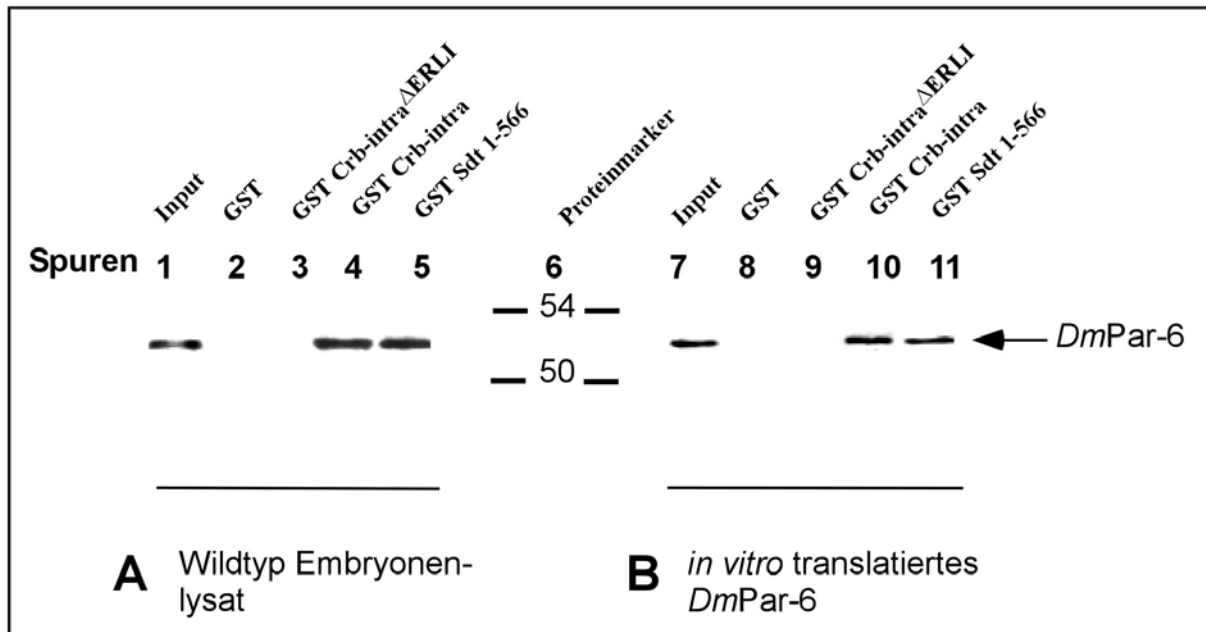


Abb. 3.14: Stardust und Crb binden an *DmPar-6* im GST-Pulldown

Westernblot mit A (Spuren 1-5): Proteinextrakt aus Wildtyp-Embryonen, B (7-11): *in vitro* translatiertes *DmPar-6*, Spur 6: Proteinmarker, der Input beträgt 1/10 der eingesetzten Proteinelösung.

A: Im Input ist *DmPar-6* bei 52 kDa zu sehen (Spur 1). Crb bindet *DmPar-6* (Spur 4). Wird das ERLI Motiv deletiert (GST-Crb intra Δ ERLI), bindet Crb nicht mehr an *DmPar-6* (Spur 3). Sdt bindet ebenfalls an *DmPar-6* (Spur 5). Die Bindung zu *DmPar-6* erfolgt über die ersten 566 As von Sdt. B: Im Input ist *in vitro* transkribiertes und translatiertes *DmPar-6* ebenfalls bei 52 kDa zu sehen (Spur 7). Sowohl Crb (Spur 10) als auch Sdt (Spur 11) binden an *in vitro* translatiertes *DmPar-6*. Die Bindung zwischen Crb und *DmPar-6* findet nicht mehr statt, wenn das ERLI Motiv fehlt (Spur 9). Nachgewiesen wurde *DmPar-6* mit einem Meerschweinchen anti *DmPar-6* Antikörper.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die drei Proteine in einem Komplex vorkommen. Um zu überprüfen, ob es eine direkte Interaktion zwischen diesen Proteinen gibt, wurde der GST-Pulldown mit *in vitro* transkribiertem und translatiertem *DmPar-6* wiederholt. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Crb als auch Sdt direkt an *DmPar-6* binden können (Abb. 3.14. B). Die Bindung zwischen *DmPar-6* und Crb hängt ab von der Anwesenheit des ERLI Motivs von Crb. Wenn diese Aminosäuren fehlen, bindet Crb nicht mehr *DmPar-6* (Abb. 3.14. A, B). Durch einen kompetitiven GST-Pulldown sollte analysiert werden, ob *DmPar-6* gleichzeitig an Crb und Sdt bindet oder ob es eine unterschiedliche Affinität zwischen den Bindungen gibt. Es gelang jedoch nicht, unterschiedliche Bereiche von Sdt *in vitro* zu transkribieren/

translatieren. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass das Sdt Protein nicht stabil ist. Für das Sdt Homolog PALS1 in Vertebraten konnte gezeigt werden, dass seine Stabilität von der Anwesenheit seines Bindungspartners PATJ abhängig ist (Shin et al., 2005). Deshalb wurde versucht, Sdt und DPATJ zusammen *in vitro* zu transkribieren/ translatieren. Jedoch führte auch dieser Versuchsansatz zu keinem nachweisbaren Sdt Protein (Daten nicht gezeigt).

3.2.5 Die Lokalisation von *DmPar-6* und *Crb* hängen voneinander ab

Eine weitere Methode, die es erlaubt, Abhängigkeiten von Proteinen herauszufinden, ist die Analyse der Lokalisation und Expression des einen Proteins in der Abwesenheit des jeweils anderen Bindungspartners. Für Baz und *DmPar-6* oder *Crb* und Sdt (Tepass und Knust, 1993; Bachmann et al., 2001) konnte in solchen Mutationsanalysen gezeigt werden, dass beide Proteine voneinander abhängig sind (Petronczki, et al., 2001). Um herauszufinden, ob die Lokalisation von *DmPar-6* und *Crb* in den Derivaten des Ektoderms (Abb. 3.1) voneinander abhängen, wurde die Expression und Lokalisation eines Proteins in Abwesenheit des jeweils anderen Proteins untersucht.

In *crb*^{11A22} und *sdt*^{EH68} mutanten Embryonen (gezeigt nur für *crb*^{11A22} in Abb. 3.15, D und D') ist die subapikale Lokalisation von *DmPar-6* in Derivaten des Ektoderms im Vergleich zu Wildtyp Embryonen (Abb. 3.15, A, A') gestört, die Polarität der epithelialen Zellen geht verloren. Neuroblasten, die sich unabhängig von *Crb* entwickeln und in denen *Crb* nicht exprimiert ist, zeigen hingegen eine wildtypische Lokalisation von *DmPar-6* sowie eine intakte Morphologie der Zellen (Abb. 3.15, C').

Für die Analyse von *Crb* in einem *DmPar-6* mutanten Hintergrund war es notwendig, Keimbahnklone herzustellen, da *DmPar-6* eine starke maternale Genexpression aufweist. Keimbahnklon-Embryonen gehen aus Keimbahnzellen hervor, denen das maternale Genprodukt fehlt und resultieren in homozygot mutanten Embryonen, die für das jeweilige Gen weder maternales noch zygotisches Genprodukt besitzen. In *DmPar-6*^{Δ226} Keimbahnklon-Embryonen (Abb. 3.15. B, B') ist *Crb* in Derivaten des Ektoderms im Vergleich zu Wildtyp Embryonen (Abb. 3.15. C, C') stark reduziert und lokalisiert nicht mehr subapikal. Die Polarität des Epithels geht verloren.

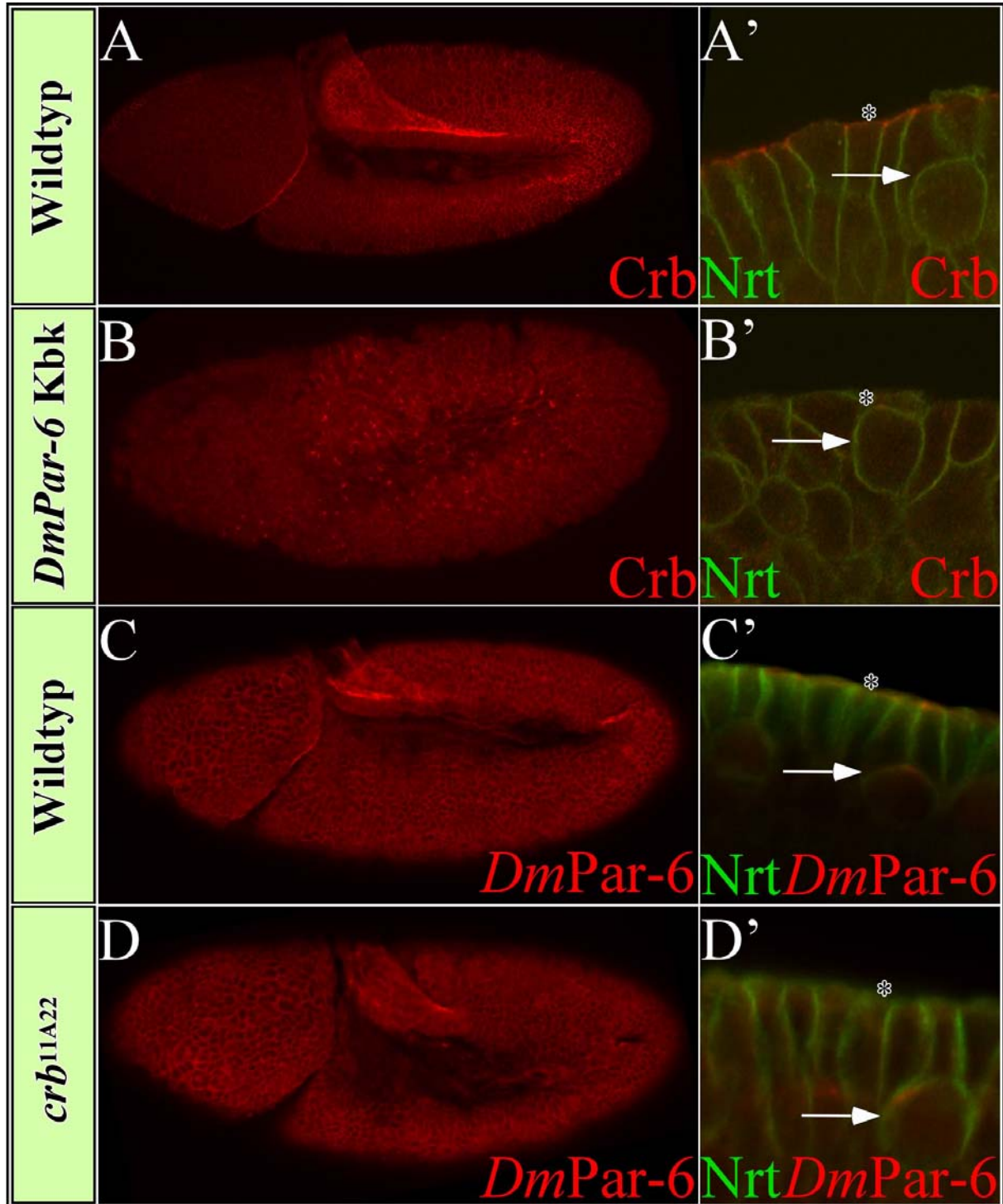


Abb. 3.15: Die Lokalisation von *DmPar-6* und *Crb* hängen voneinander ab.

A-D: Embryonen des Stadiums 9. A-D': Vergrößerung der Epidermis und Neuroblasten. A-A': Wildtyp Embryo, *Crb* Expression ist in der Epidermis und der Amnioserosa zu sehen. A': *Crb* lokalisiert subapikal, Neurotaktin dient hier als Marker der basolateralen Membran der Epidermis, bzw. als kortikaler Marker des Neuroblasten. B-B': *DmPar-6*^{A226} mutanter Keimbahnklon (Kbk) Embryo, *Crb* ist nicht richtig lokalisiert. B': *Crb* ist fehlverteilt, aber die Lokalisation von Neurotaktin ist nicht gestört. C: Wildtyp Embryo, *DmPar-6* lokalisiert subapikal in der Epidermis und in einem apikalen Halbmond in Neuroblasten, die sich in der Metaphase befinden. D-D': *crb*^{11A22} mutanter Embryo, die Lokalisation von *DmPar-6* ist diffus in der Epidermis, aber normal im Neuroblasten. (*: Sternchen weisen auf die apikale Region der Epidermis, Pfeile auf die Neuroblasten). Anterior zeigt nach links, posterior nach rechts, dorsal nach oben und ventral nach unten.

3.2.6 Die Überexpression von Crb führt zur Fehlverteilung von *DmPar-6* und *DaPKC*

Eine weitere Möglichkeit, die Abhängigkeit der Lokalisation von Proteinen *in vivo* zu testen, besteht in der Überexpression von Genen in verschiedenen Geweben und unterschiedlichen Stadien des *Drosophila* Embryos mit Hilfe des Gal4/UAS-Systems (Brand und Perrimon, 1993). Dieses Zwei-Komponenten- Expressionssystem verwendet den Transkriptionsfaktor Gal4p aus der Hefe und seine Zielsequenz UAS (upstream activation sequence), an die Gal4p bindet, um die Gen-Transkription zu aktivieren.

Das vollständige Crb Protein wurde mit dem Aktivatorstamm *engrailed* (Gal4^{en}) in 14 Streifen entlang der posterioren Segmentgrenzen in der Epidermis in Wildtyp-Embryonen überexprimiert (Abb. 3.16). Dies hat zur Folge, dass Crb nicht nur subapikal sondern auch basolateral lokalisiert und die Proteine *DmPar-6* und *DaPKC* der Fehlverteilung von Crb folgen. Bazooka hingegen wird nicht umverteilt, sondern weist eine wildtypische subapikale Lokalisation auf (Daten nicht gezeigt).

Der reziproke Versuch, *DmPar-6* mit Gal4^{en} zu überexprimieren, ergab keine Fehlverteilung der untersuchten Proteine. So wurden weder Crb noch Sdt und DPATJ sowie andere bekannte Bindungspartner wie Baz und *DaPKC* fehlverteilt (Daten nicht gezeigt).

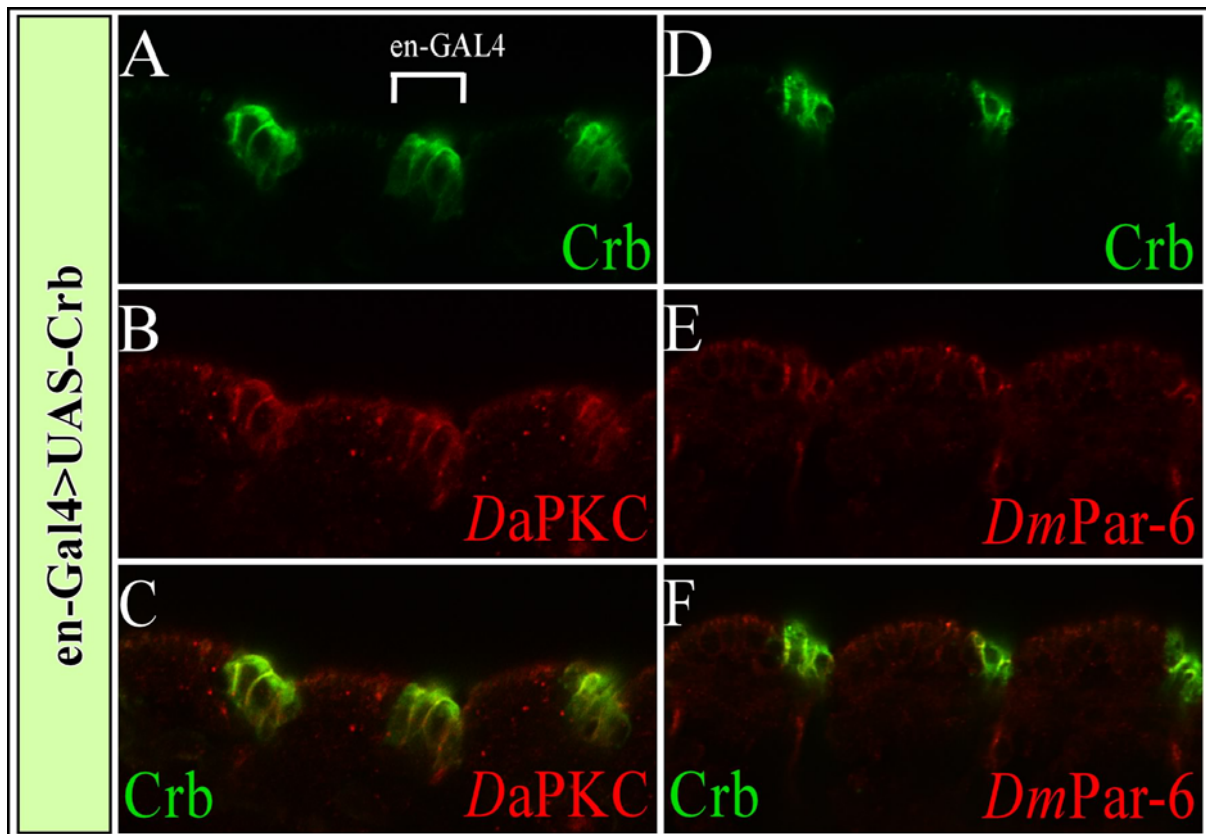


Abb. 3.16, Erklärung s. nächste Seite

Abb. 3.16, vorherige Seite: Die Überexpression von Crb führt zu einer Fehlverteilung von *DmPar-6* und *DaPKC*

A-F: Vergrößerung der Epidermis von Wildtyp Embryonen im optischen Sagitalschnitt: Alle gezeigten Embryonen befinden sich im Stadium 13 und überexprimieren Crb im *engrailed* Muster, d.h. in 14 Streifen in jedem posterioren Kompartiment eines Segmentes (*en-Gal4>UAS-Crb*). Die Fehllokalisation von Crb nach lateral führt zur Umverteilung von *DaPKC* (A-C), sowie zu einer Fehlverteilung von *DmPar-6* (D-F).

C: Überlagerung der Einzelfärbungen aus A und B. F: Überlagerung der Einzelfärbungen aus D und E.

3.2.7 Die Überexpression von Sdt führt in Flügel-Imaginalscheiben zu einer Fehlverteilung von *DPATJ*

Die Überexpression der Sdt-MAGUK Isoform (Bachmann et al., 2001) mit *Gal4^{en}* im Embryo führte zu keiner Umverteilung von bekannten oder putativen Interaktionspartnern wie *DPATJ*, *DmPar-6* oder Crb (Daten nicht gezeigt). Um herauszufinden, ob die Überexpression von Sdt in anderen epithelialen Geweben in der Lage ist, *DmPar-6* und Crb fehlzuverteilen, wurde Sdt mit dem Aktivator *patched* in einem Streifen entlang der antero-posterioren Kompartimentsgrenze in Imaginalscheiben des 3. Larvalstadiums überexprimiert (Abb. 3.17). In den Flügel-Imaginalscheiben hat die Fehlverteilung von Stardust zur Folge, dass zwar *DPATJ* (Abb. 3.17, E) aber weder Crb (Abb. 3.17, D) noch *DmPar-6* (Abb. 3.17, E) fehlverteilt werden.

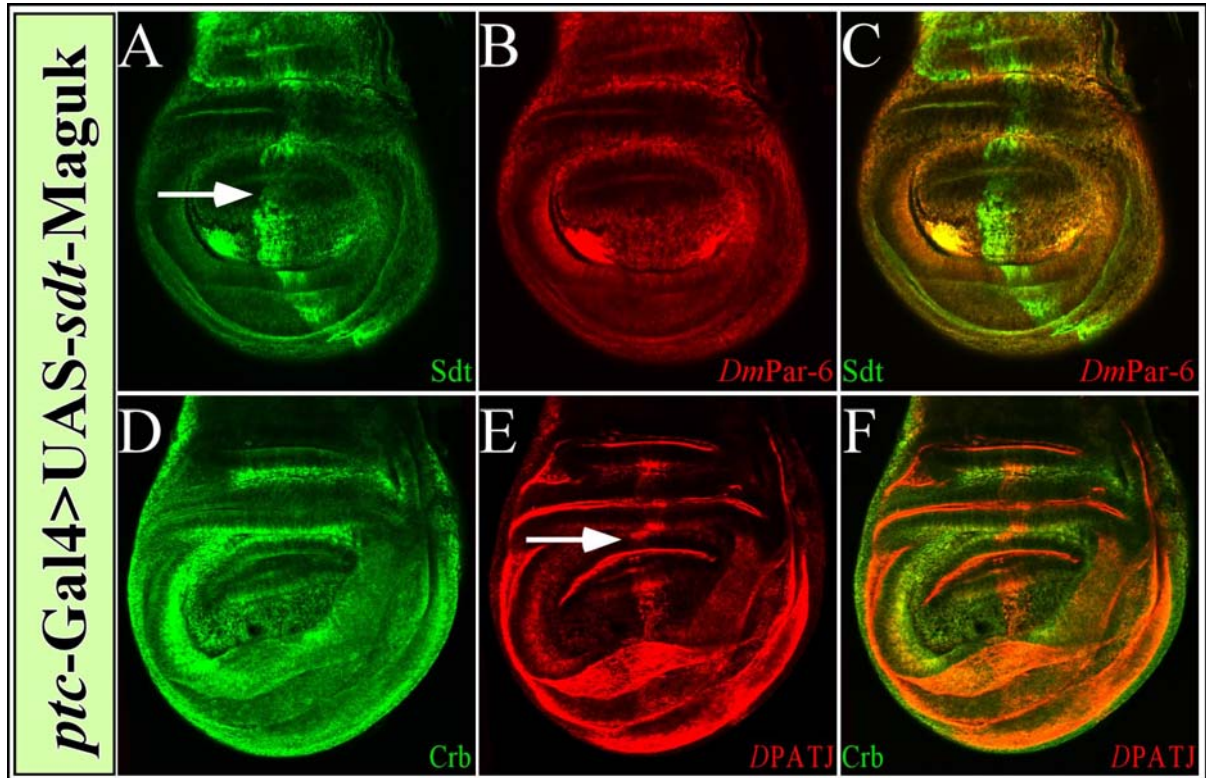


Abb. 3.17: Die Überexpression von Sdt führt zur Umverteilung von DPATJ, aber weder zu einer Umverteilung von Crb noch DmPar-6 in Flügelimaginalscheiben

A-F: Flügel-Imaginalscheiben des dritten Larvalstadiums überexprimieren die Sdt-MAGUK Isoform mit dem Aktivatorstamm *ptc-Gal4* (*ptc-Gal4>UAS-sdt-Maguk*) in einem Streifen entlang der antero-posterioren Kompartimentsgrenze (Pfeil in A). Der Fokus liegt auf der Oberfläche der Epidermis.

Die Überexpression von Stardust verändert weder die Lokalisation von DmPar-6 (B) noch Crb (D), wohl aber die Lokalisation von DPATJ (E). C und F: stellen die Überlagerung der Einzelfärbungen aus A und B bzw. D und E dar.

Zusammenfassung der Experimente aus den Abschnitten 3.2.4 - 3.2.6

Die Interaktion zwischen DmPar-6 und Crb sowie DmPar-6 und Sdt konnte im GST-Pulldown bestätigt werden. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, dass sowohl GST-Crb als auch GST-Sdt DmPar-6 aus Proteinextrakt von Wildtyp-Embryonen binden können. Das lässt vermuten, dass DmPar-6 in einem Komplex mit Crb und Sdt vorliegt. Durch einen weiteren GST-Pulldown mit *in vitro* transkribiertem/translatiertem DmPar-6 konnte gezeigt werden, dass eine direkte Bindung zwischen Crb und DmPar-6 sowie Sdt und DmPar-6 möglich ist. Untersuchungen in Embryonen, die mutant für *crb* oder *DmPar-6* waren, ergaben, dass die richtige Lokalisation von DmPar-6 und Crb in der subapikalen Region von epidermalen Epithelien von der Anwesenheit des jeweils anderen Proteins abhängt. In Neuroblasten z. B., in denen Crb nicht exprimiert wird, ist die Lokalisation von DmPar-6 nicht betroffen. Ähnlich wie in *crb* mutanten Embryonen zeigen *sdt* mutante Embryonen eine Fehllokalisation von DmPar-6.

Eine weitere Bestätigung der Abhängigkeit zwischen *DmPar-6* und *Crb* wurde durch Überexpressionsstudien in Embryonen erzielt. Die Überexpression von *Crb* hat eine Umverteilung von *DmPar-6* zur Folge. Die Überexpression von *DmPar-6* hingegen hat keine Auswirkung auf die Lokalisation von *Crb* und *Sdt*, aber auch nicht auf andere Bindungspartner von *DmPar-6*, wie *Baz* und *DaPKC*. Ein ähnliches Ergebnis liefert die Überexpression von *Sdt* in Flügel-Imaginalscheiben, in denen weder für *Crb* noch für *DmPar-6* wohl aber für *DPATJ* eine Fehllokalisation zu sehen ist.

3.3 Struktur-Funktions-Analyse der Sdt-MAGUK Isoform und funktionelle Analyse der Sdt-B- Isoform sowie des hMPP5

Detaillierte molekulare Analysen über Stardust ergaben, dass es viele putative Isoformen für *Sdt* gibt (Schneider, 1996; Bachmann, 2000; Bachmann und Knust, 2001; Berger, 2005). Als verifizierte Isoformen gelten die MAGUK-Isoform und GUK-Isoform (Bachmann und Knust, 2001) sowie die B-Isoform (Abb. 1. 4) (Hong et al., 2001). Im Menschen konnte ebenfalls ein *Sdt*-Homolog hMPP5 identifiziert werden. Der Grad der Konservierung zwischen *Sdt* und hMPP5 beträgt bezogen auf die gesamte Proteinsequenz 23%, jedoch sind die MAGUK Domänen viel stärker konserviert (Abb. 1.5), (Kantardzhieva et al., 2005).

Durch das Vorhandensein vieler Protein-Binde Motive in *Sdt* stellt sich die Frage, welche dieser Domänen in Bezug auf die Funktion von *Sdt* in der Aufrechterhaltung epithelialer Zellpolarität während der Embryogenese von *Drosophila* wichtig ist.

Um ein besseres Verständnis für die Funktion von *Sdt* während der Epithelentwicklung zu erlangen, wurde eine Struktur-Funktions-Analyse von einzelnen bzw. mehreren Domänen und Deletionsvarianten der Stardust-MAGUK Isoform durchgeführt (Abb. 3.18). Das Ziel dieser Untersuchungen war es herauszufinden, ob die Überexpression von verkürzten *Sdt* Proteinen, der *Sdt*-MAGUK Isoform und der *Sdt*-B Isoform sowie hMPP5 zu embryonaler Letalität und dominanten Phänotypen führt, wie es für einen seiner Bindungspartner, *Crb*, und seinem humanen Homolog hCRB1 beschrieben wurde (Wodarz, et al., 1995; Klebes und Knust, 2000, den Hollaender et al., 2001). Außerdem sollte die Region von *Sdt*-MAGUK isoliert werden, die für seine subapikale Lokalisation in embryonalen Epithelien verantwortlich ist. Des Weiteren wurde untersucht, welche Region von *Sdt* für eine partielle Abschwächung/Rettung des *sdt* mutanten embryonalen Phänotyps verantwortlich ist und ob hMPP5 in der Lage ist, im *sdt* mutanten Embryo die Funktion des *Sdt* Proteins zu substituieren.

Für die Rettungsexperimente und Analyse dominanter Phänotypen wurden Kutikulapräparate von Embryonen angefertigt und unter dem Lichtmikroskop analysiert. Mit Hilfe der Immunohistochemie wurde untersucht, welche Region von Stardust in Embryonen für seine Lokalisation an der Membran wichtig ist.

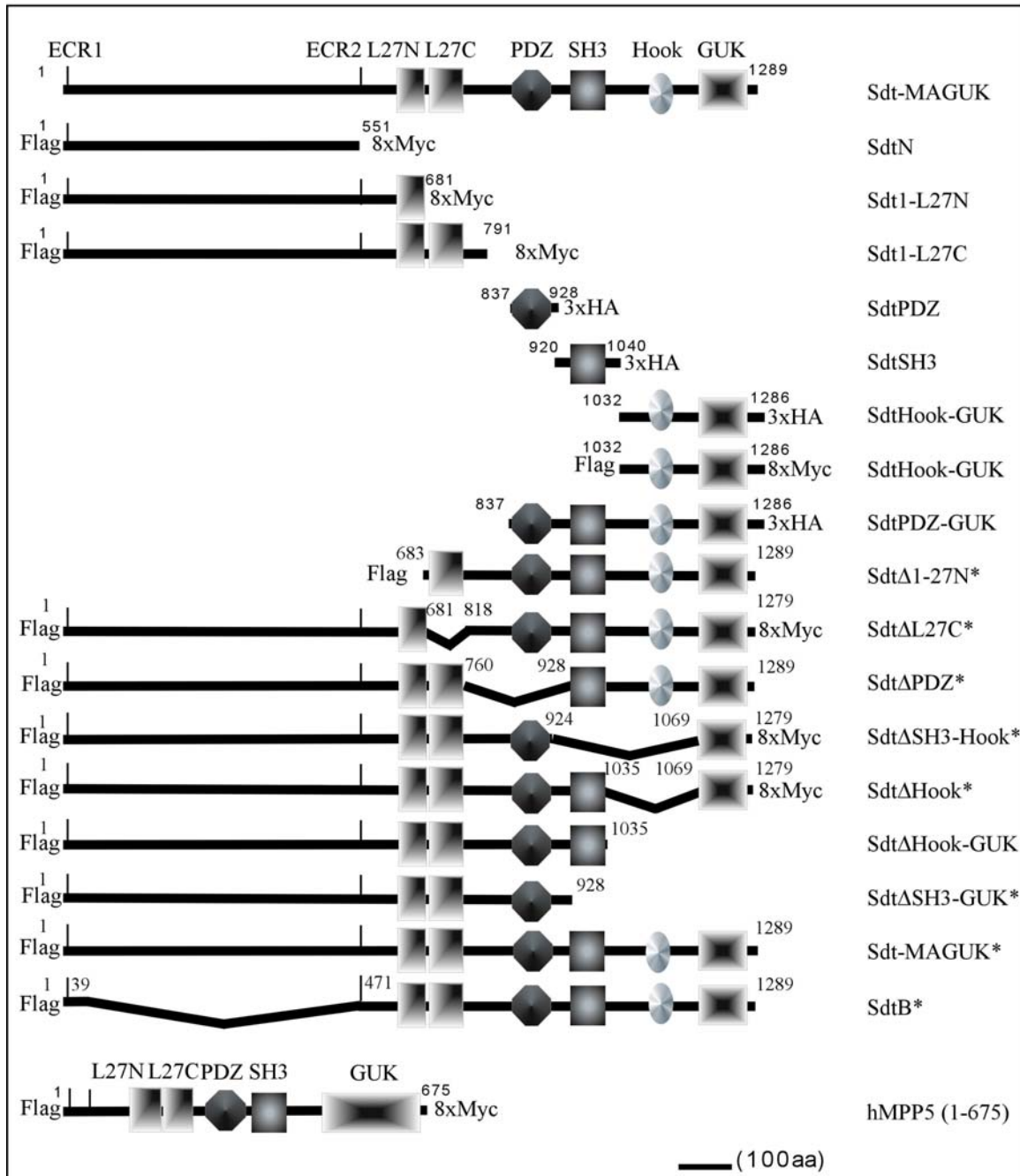


Abb. 3.18: Hergestellte Sdt-/ hMPP5 Effektorstrukturen

Unterschiedliche Regionen von Sdt, sowie die Sdt-B und Sdt-MAGUK Isoformen und das humane Homolog von Stardust (hMPP5), wurden in eines von drei unterschiedlichen pUAST-Vektoren kloniert, die sich in der Sequenz ihrer Reportergene unterscheiden, (8xMyc und Flag bzw. 3x HA oder Flag). Anschließend wurden mit diesen Effektorstrukturen transgene Fliegenstämme etabliert. Die Zahlen repräsentieren die Aminosäuren der jeweiligen Proteine. Die Sdt-B Isoform ist bis auf eine Deletion der As 39-471 identisch zu der Sdt-MAGUK Isoform. *: diese Konstrukte wurden von Natalia Bulgakova hergestellt.

3.3.1 Etablierung transgener Linien mit den Sdt/ hMPP5 -Effektorkonstrukten

Nach Injektion der verschiedenen Sdt-Konstrukte (Abb. 3.18) in w^{1118} Embryonen konnten für jedes Konstrukt mehrere transgene Fliegenstämme etabliert werden (s. Material & Methoden). Die Stämme wurden balanciert oder, wenn möglich, homozygot gehalten (s. Anhang). Die hergestellten Konstrukte von Sdt und hMPP5 wurden mit Hilfe des Gal4/UAS-Systems in Embryonen mit verschiedenen Aktivatorlinien überexprimiert, worauf folgende Abschnitte eingehen.

3.3.2 Die Überexpression von Stardust mit dem Aktivator Gal4^{daG32} führt mit unterschiedlicher Penetranz zu embryonaler Letalität

Um herauszufinden, ob die Überexpression von Stardust zu embryonaler Letalität führt, wurden die verschiedenen Sdt- bzw. hMPP5 Konstrukte mit dem ubiquitär exprimierenden Aktivator Gal4^{daG32} in Embryonen überexprimiert. Die Expression erfolgt unter anderem in der Epidermis und der Amnioserosa, in Geweben, in denen Sdt normalerweise auch exprimiert wird. Anschließend wurde ein Letalitätstest durchgeführt. Es wurde überprüft, ob die Sterberaten der Sdt/hMPP5 überexprimierenden Embryonen höher lagen als 15 %, was einer wildtypischen Letalitätsrate entspricht. Für jedes Konstrukt, bis auf hMPP5, für das nur eine transgene Linie erhalten werden konnte, wurden Embryonen zweier verschiedener transgener Fliegenstämme analysiert (Abb. 3.19 und Zusammenfassung Abb. 3.29).

Die embryonale Letalität nach Überexpression der verkürzten Sdt-Proteine wie SdtN, SdtPDZ, SdtSH3, SdtHook-GUK, SdtPDZ-GUK sowie hMPP5, entspricht der normalen Sterberate des Wildtyps und liegt in einem Bereich von 7-15 %.

Die höchste Letalität mit 61-74 % wird erreicht, wenn Sdt Δ SH3-Hook oder die Region 1-L27C überexprimiert werden. Die Überexpression der anderen untersuchten Sdt-Varianten zeigt Sterberaten, die zwischen 16 und 55 % liegen (Abb. 3.19 und Abb. 3.29). Einige Sdt-Effektorlinien zeigen vermutlich in Abhängigkeit ihrer Expressionsstärke unterschiedliche Letalitätsraten, wie z. B. für Sdt Δ PDZ (1) mit 56 % Letalität im Gegensatz zu Sdt Δ PDZ(2) mit einer Sterberate von 13 % (Abb. 3.19).

Die Überexpression der Sdt-Proteine sowie hMPP5 mit schwächeren Aktivatoren wie GAL^{en} und Gal4^{Pn} führt zu keiner wesentlichen Erhöhung der wildtypischen Sterberate (Daten nicht gezeigt).

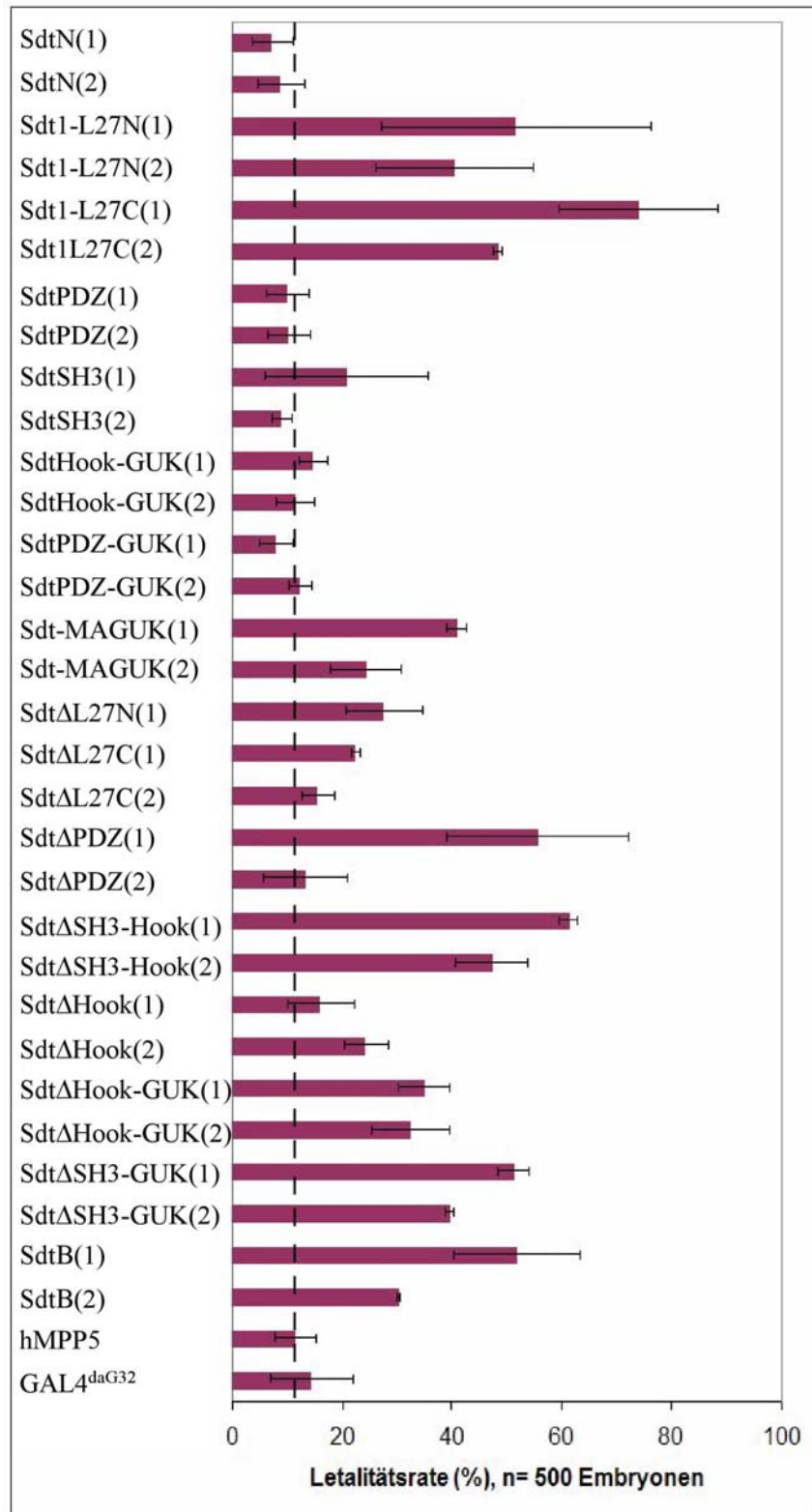


Abb. 3.19: Embryonale Letalitätsrate der Sdt-/hMpp5 Überexpression mit dem ubiquitär exprimierenden Aktivator Gal4^{daG32}

Je zwei Sdt-Effektorlinien (1,2), die dasselbe Transgen tragen, wurden mit der Aktivatorlinie Gal4^{daG32} gekreuzt und deren Embryonen auf Letalität untersucht. Die Sterberate der Embryonen variiert zwischen 7-15 %, was einer wildtypischen Letalitätsrate entspricht (gestrichelte Linie), wie z.B. auch für SdtN, SdtPDZ, SdtSH3-Hook, SdtHook-GUK, SdtPDZ-GUK und hMPP5 zu sehen ist. Die Letalität steigt bis auf 74 % an, wenn Sdt1-L27C exprimiert wird. Für die Bestimmung der Letalitätsraten wurden jeweils ca. 500 Embryonen in unabhängigen Versuchen ausgewertet und daraus der Mittelwert gebildet.

3.3.3 Embryonale Phänotypen als Folge einer Überexpression von Stardust

Die Überexpression der verschiedenen Sdt-Effektorkonstrukte mit dem ubiquitär exprimierenden Aktivator Gal4^{daG32} führt entweder zu keinen oder variablen dominanten, embryonalen Phänotypen (Abb. 3.20), die für alle untersuchten Konstrukte in Abb. 3.29 zusammengefasst sind. Die Kutikula jener Embryonen, die nach Überexpression der Stardust-/ hMPP5- Konstrukte sterben, wurde lichtmikroskopisch auf das Vorhandensein von Defekten untersucht. Alle untersuchten Sdt-/ hMPP5 Konstrukte, die nach Überexpression zu embryonaler Letalität führen, zeigen bis auf Sdt1-L27N drei variable Phänotypen:

Der erste Phänotyp zeigt kleine anteriore Löcher in der Kopfgregion (Abb. 3.20 C, D) mit einer Penetranz von 60%. Im zweiten Phänotyp treten größere Löcher in der dorsalen Kutikula (Abb. 3.20 E) mit einer Penetranz von 30% auf. Der dritte Kutikula-Phänotyp zeigt Embryonen, die ihre Eihülle nicht komplett ausfüllen und deren Kopfstrukturen fehlen (Abb. 3.20 F). Die Penetranz dieses Phänotyps liegt hier bei 10%.

In Kutikula-Präparaten von Embryonen, die Sdt1-L27N überexprimiert haben, erhält man nur zwei der bereits erwähnten Phänotypklassen: kleine anteriore Löcher in der Kopfgregion, mit einer Penetranz von 90 % und mit einer Penetranz von 10 % Kutikula-Phänotypen, in denen der Embryo nicht die ganze Eihülle ausfüllt.

Wird ein maternaler Aktivator Gal4^{mat15; mat16} verwendet, der die Expression von Sdt sehr früh während der Embryogenese anschaltet, so wird der Phänotyp verstärkt: die Kutikula weist mit einer Penetranz von 30 % dorsal größere Löcher auf, die sich zum Teil bis auf die Hälfte des Embryos ausstrecken (Abb. 3.20 G, H). Neben diesem Phänotyp treten die schon beschriebenen Phänotypen mit kleinen anterioren Löchern auf. Die Penetranz liegt hier bei 60 % und der Kutikula-Phänotyp, in denen der Embryo die Eihülle nicht komplett ausfüllt, erscheint ebenfalls mit einer Penetranz von 10 %. Die Differenzierung der Zähnchenbänder in allen beobachteten Kutikula-Präparaten ist nicht betroffen (Abb. 3.20 D-H).

Die Überexpression von Sdt oder hMPP5 führt nicht zu grundlegenden Veränderungen der Zellform und einer Desorganisation der epithelialen Gewebestruktur, wie es für Crb beschrieben wurde (Wodarz, 1993). Die Überexpression der Sdt-Proteine sowie hMPP5 mit schwächeren Aktivatoren wie GAL^{en} und Gal4^{pn} führt zu keinen dominanten embryonalen Phänotypen. Ebenfalls zeigt die Expression der Sdt Proteine mit Gal4^{en} in den Flügel-Imaginalscheiben des dritten Larvalstadiums keine Defekte in der Flügelentwicklung (Daten nicht gezeigt), wie es ebenfalls für Crb beobachtet wurde (Wodarz, 1993; Klebes, 1999).

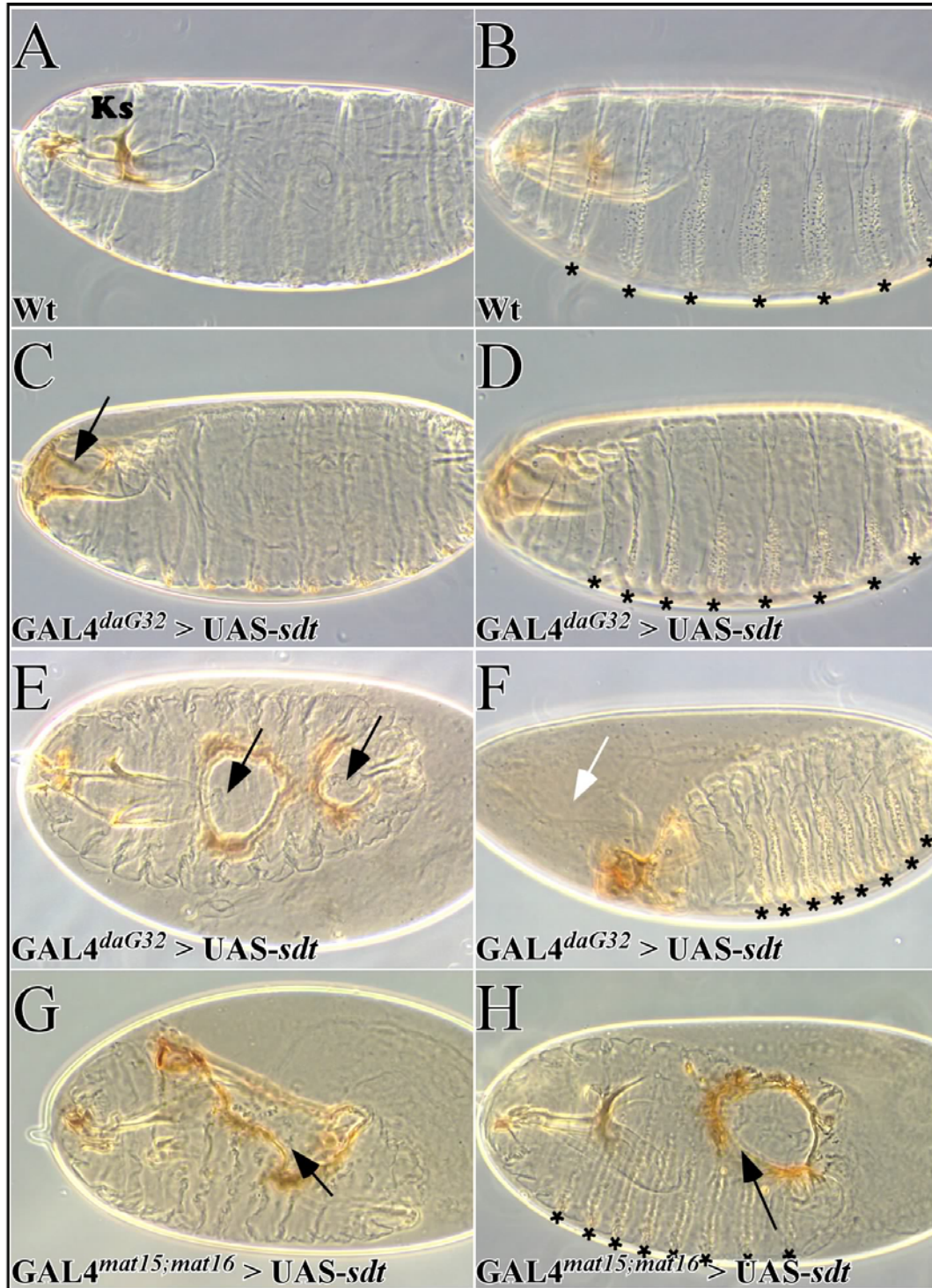


Abb. 3.20: Sdt Überexpression führt zu dominanten embryonalen Phänotypen

A-G: Kutikula-Präparate von Embryonen verschiedenen Genotyps sind hier zu sehen.

A-B: Wildtyp Embryo, A: Fokus auf das Kopfskelett (Ks), B: Fokus auf die Zähnenbänder (*)

C-F: Exemplarisch für alle untersuchten Sdt-Konstrukte*, die nach Überexpression zu variablen Phänotypen führen, sind hier die Kutikula-Phänotypen von Embryonen gezeigt, die Sdt-MAGUK mit dem ubiquitären Aktivator $GAL4^{daG32}$ überexprimieren C: Fokus auf das anterior gelegene Loch (Pfeil) im Kopfskelett, D: Fokus auf die intakten Zähnenbänder (*) desselben Embryos wie in C, E: Embryo mit dorsalen Löchern (Pfeile) F: Embryo mit anteriorem Defekt (weisser Pfeil) in der Kutikula, die Eihülle ist nicht vollständig ausgefüllt,

G-H: Embryonen, die UAS-Sdt MAGUK mit dem maternalen Treiber $GAL4^{mat15; mat16}$ überexprimieren, G: zeigt einen Embryo mit einem stärkeren Phänotypen. Hier fehlt ein größerer Teil der dorsalen Kutikula. In H ist ein Embryo mit einem dorsalen Loch, ähnlich wie in E zu sehen, auch hier sind die Zähnenbänder immer noch intakt. * bis auf Sdt1-L27N überexprimierende Embryonen, die nicht den Kutikula Phänotypen zeigen, in denen dorsale Löcher vorkommen.

3.3.4 Lokalisationsanalyse von Sdt

Um herauszufinden, welche Domänen von Stardust für die Lokalisation an der apikalen Membran verantwortlich sind, wurden die bereits beschriebenen Konstrukte (Abb. 3.18) in Embryonen mit dem Aktivator Gal4^{daG32} überexprimiert. Im Rahmen dieser immunohistochemischen Untersuchungen zeigte sich jedoch, dass die Expression mit dem Gal4^{daG32} Treiber zu stark war, um eine genaue Analyse der Lokalisation zu ermöglichen, da das überexprimierte Protein in der gesamten Zelle zu sehen war (Daten nicht gezeigt).

Aus diesem Grund wurde der schwächere Aktivator Gal4^{en} für die Überexpression von Sdt in 14 Streifen entlang der posterioren Segmentgrenzen der Epidermis verwendet.

Allerdings konnte auch mit diesem Treiber für keine der untersuchten Sdt-Varianten und Isoformen eine wildtypische Lokalisation ausschließlich an der subapikalen Region der Plasmamembran erreicht werden. Neben einer apikalen Anreicherung einiger untersuchter Sdt-Proteine war stets eine Färbung in der basolateralen Membran zu sehen.

Dennoch konnten die verkürzten Sdt-Varianten, sowie die Sdt-MAGUK und Sdt-B Proteine (Abb. 3.18) in drei unterschiedliche Klassen in Bezug auf ihre Lokalisation (Abb. 3.21) unterteilt werden. Als Marker für die apikale bzw. basolaterale Membrandomäne wurden Crb bzw. Nrt verwendet.

In die Klasse I wurden die Sdt Proteine eingeordnet, die an der Plasmamembran lokalisieren (Abb. 3.21 A-C). Zu dieser Gruppe gehört der N-Terminus von Stardust, der Bindestellen für DmPar-6 enthält (Wang et al., 2004 und diese Arbeit). In Klasse I fallen auch die Sdt-MAGUK und Sdt-B Isoformen, die trunkierten Proteine Sdt1-L27N, Sdt1-L27C sowie die Deletionsvarianten SdtΔL27C, SdtΔSH3-Hook, SdtΔHook, SdtΔSH3-GUK und SdtΔHook-GUK. Die Klasse II (Abb. 3.21 D-E) besteht aus den Sdt-Varianten, die eine zytoplasmatische Verteilung im Embryo zeigen, wie es für SdtPDZ (enthält die Crb Binde-Region), SdtSH3-Hook und SdtHook-GUK sowie SdtPDZ-GUK und hMPP5 der Fall ist. Sdt-Proteine der Klasse III (Abb. 3.21 F-H) zeigen eine schwächere Lokalisation an der Membran und eine etwas diffuse Lokalisation im Zytoplasma. In diese Gruppe gehören die beiden Deletionsvarianten SdtΔ1-L27N und SdtΔPDZ (Zusammenfassung Abb. 3.22).

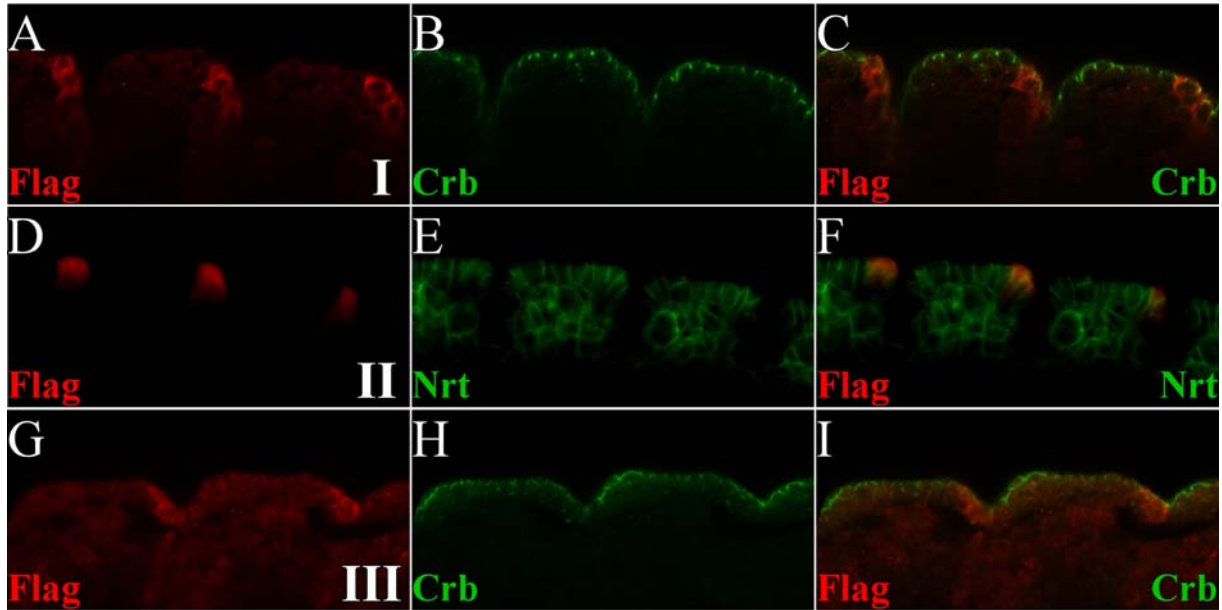


Abb. 3.21: Die untersuchten Sdt Proteine lassen sich in Bezug auf ihre Lokalisation in 3 Klassen unterteilen

A-H: Vergrößerung der Epidermis von Embryonen des Stadiums 12 im optischen Sagittalschnitt, die verschiedene Sdt-Proteine mit dem Gal4^{en} Treiber in 14 Streifen in jedem posterioren Kompartiment eines Segmentes überexprimieren. A, D, G zeigen die Expression der transgen-kodierten Sdt Proteine, die durch das Flag-Epitop markiert wurden. In B, E, H ist als Marker der apikalen Membrandomänen entweder Crb (B, H) oder der basolateralen Membran Nrt (E) zu sehen. C, F, I zeigen die Überlagerung der Färbungen. Klasse I (A-C): Exemplarisch für die Sdt-Proteine, die an die Membran lokalisieren, ist die Überexpression von dem N-Terminus von Sdt gezeigt. Klasse II (D-F): Als ein Beispiel der Sdt Varianten dieser, im Zytoplasma lokalisierenden Gruppe ist SdtHook-GUK zu sehen. Weitere Mitglieder dieser Gruppe sind die PDZ, SH3 Domänen von Sdt, ebenso wie das Sdt Protein PDZ-GUK und hMPP5. Klasse III (G-I): Die Verteilung von SdtΔ1-L27N ist gezeigt. Zusammen mit SdtΔPDZ gehören die beiden Proteine zu einer Klasse, die eine schwache Lokalisation an der Membran und eine diffuse Verteilung im Zytoplasma aufweisen.

Zusammenfassung:

Mit Hilfe des Aktivators Gal4^{en} konnte gezeigt werden, dass die transgen kodierten Sdt Proteine entweder durch ihre N-terminalen 1-551 As (SdtN) oder in Abhängigkeit ihrer C-terminalen L27 Domäne (SdtΔ1-L27N) an die Plasmamembran epithelialer Zellen lokalisieren können.

Kleinere Sdt-Proteine wie die PDZ Domäne, welche die Bindestelle für Crb enthält, oder die Regionen SH3, GUK-Hook sowie PDZ-GUK lokalisieren im Zytoplasma.

Fehlen entweder der Bereich 1-L27N oder die PDZ Domäne von Sdt, ist eine schwächere Lokalisation der Proteine an der Membran einhergehend mit einer diffusen Verteilung ins Zytoplasma zu sehen. Dies deutet auf eine Abnahme der Protein-Stabilität hin.

Eine genauere Kartierung der Lokalisation an die subapikale Region der Plasmamembran war nicht möglich, was vermutlich an den durch das UAS-Gal4 System bedingten erhöhten Proteinmengen lag.

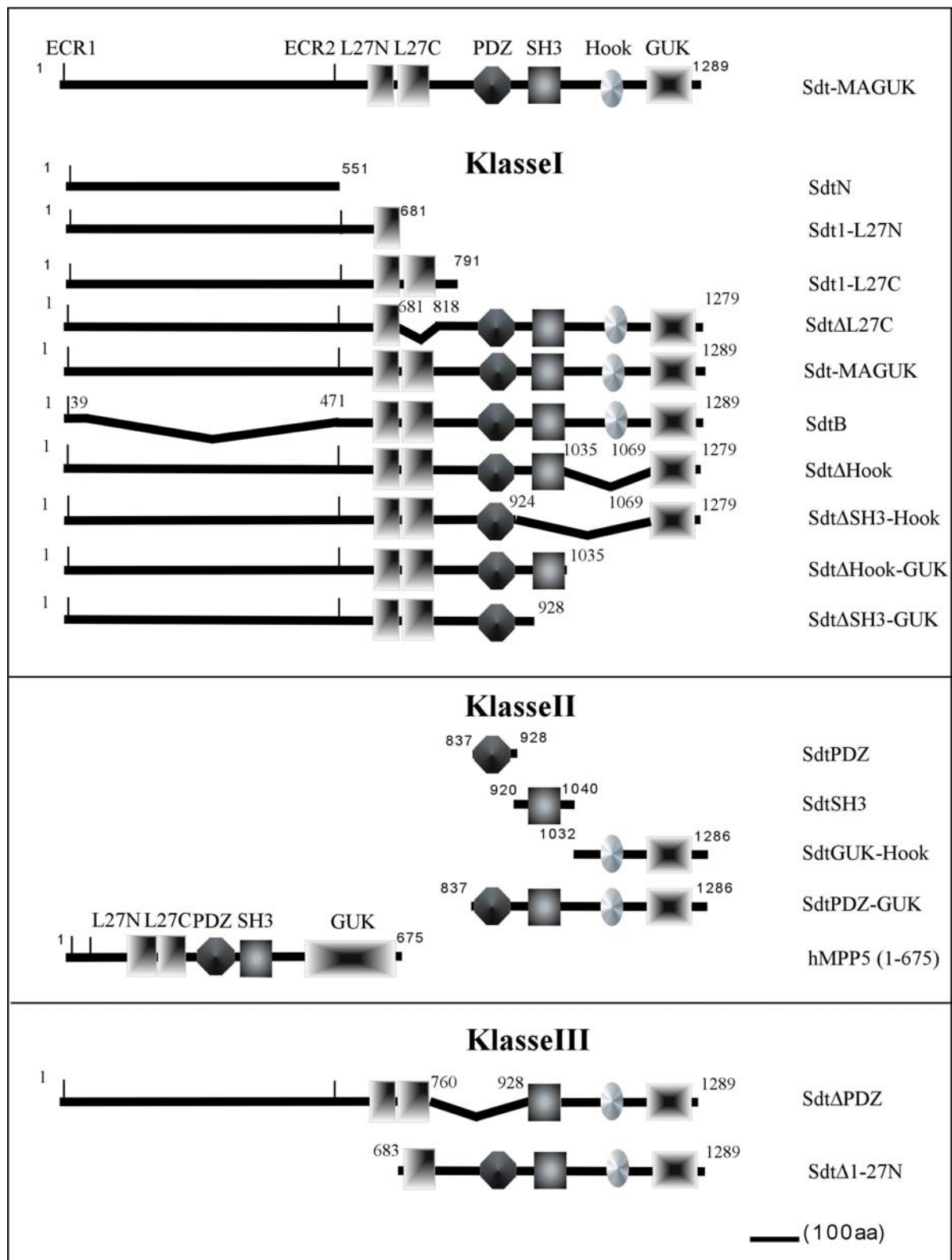


Abb. 3.22: Zusammenfassung der Lokalisationsanalysen der transgen-kodierten Sdt sowie hMPP5 Proteine

Sdt Proteine der Klasse I lokalisieren an die Membran, Klasse II im Zytoplasma, Klasse III schwach an der Membran und im Zytoplasma (Einzelheiten s. Text).

3.3.5 Die Überexpression von Stardust führt zu einer Umverteilung von *DPATJ*, jedoch nicht zu einer Fehlverteilung von *Crb*, *DmPar-6* oder endogenem Sdt

Wie in Abschnitt 3.2.7 bereits erwähnt, führt die Überexpression der Sdt-MAGUK Isoform (Bachmann et al., 2001) mit Hilfe des Aktivators *Gal4^{en}* zu keiner Umverteilung von bekannten oder putativen Interaktionspartnern von *Crb*, *DPATJ* und *DmPar-6* in embryonalen Epithelien. Um herauszufinden, ob verkürzte Proteine der Sdt-MAGUK Isoform sowie die Sdt-B Isoform in der Lage sind, die Lokalisation von Bindungspartnern zu verändern, wurden die Sdt Proteine mit *Gal4^{en}* exprimiert und im Hinblick auf eine Fehlverteilung der Interaktionspartner untersucht.

Diese Analysen ergaben, dass einige Sdt Konstrukte nach Überexpression (Abb. 3.18) in der Lage sind, *DPATJ* im Embryo umzuverteilen (Abb. 3.23, B und Abb. 3.30). Das gilt für die Konstrukte Sdt1-L27N, Sdt1-L27C sowie für die Sdt-B Isoform, SdtΔSH3-Hook und SdtΔSH3-GUK. Ebenfalls zeigte die von N. Bulgakova hergestellte neue transgene Linie, die die Sdt-MAGUK Isoform (Sdt-MAGUK(2)) enthält, nach Überexpression im Embryo eine Umverteilung von *DPATJ*, was vermutlich auf eine erhöhte Expression in dieser transgenen Linie zurückzuführen ist. Die Überexpression der Sdt-Konstrukte mit dem verwendeten Aktivator *Gal4^{en}* führte weder zu einer Umverteilung von *Crb* (Abb. 3.21 B, H und Zusammenfassung Abb. 3.30) noch von *DmPar-6* (Abb. 3.21 E und Abb. 3.30) noch von endogenem Sdt (Abb. 3.21 H, K und Abb. 3.30).

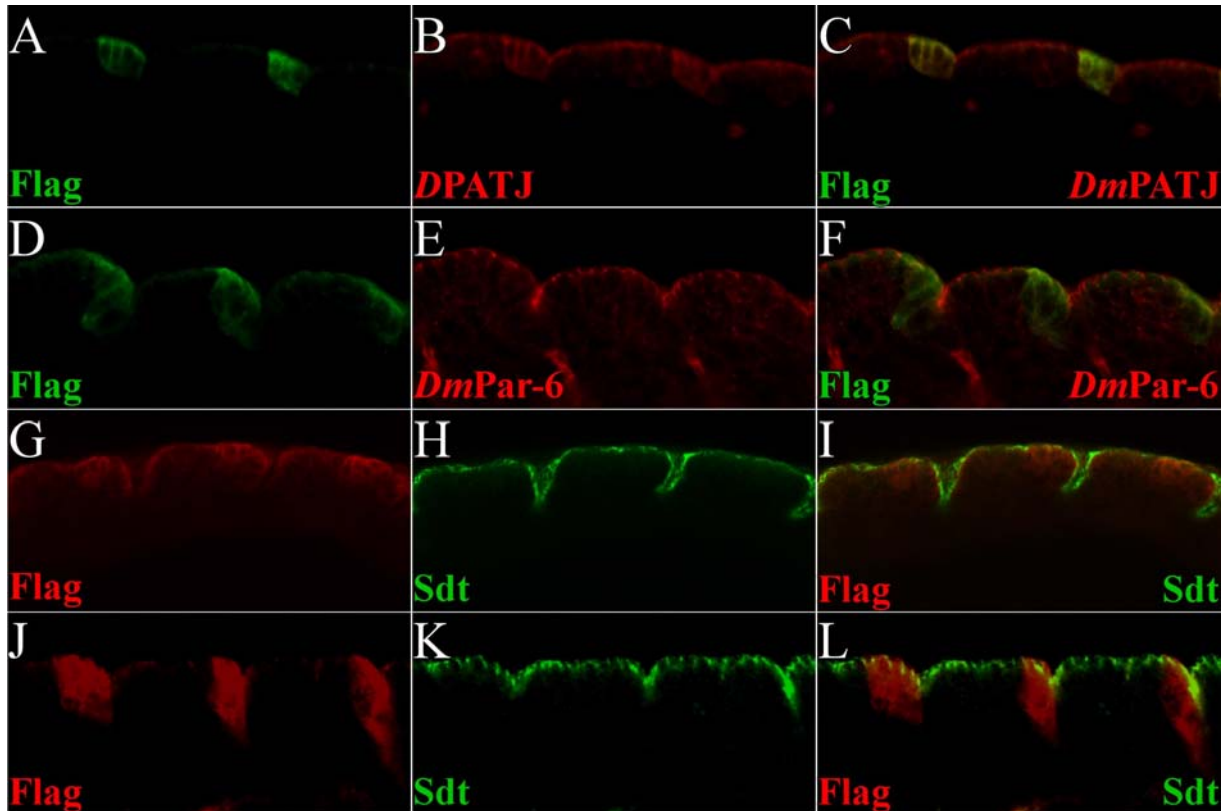


Abb.3.23: Die Überexpression von Stardust verteilt DPATJ um, aber nicht DmPar-6 und Sdt

A-F: Vergrößerung der Epidermis von Embryonen im optischen Sagittalschnitt. Alle Embryonen befinden sich im Stadium 12 und überexprimieren Sdt Proteine mit dem Gal4^{en} Treiber in 14 Streifen in jedem posterioren Kompartiment eines Segmentes. Alle überexprimierten Sdt Proteine liegen als Fusionsprotein mit einem Flag-Tag vor und können durch einen anti Flag Antikörper detektiert werden. Sdt1-L27N (A) verteilt DPATJ (B) um. C: Überlagerung der Einzelfärbungen von A und B. Die Überexpression von SdtN(1-551)(D) verteilt nicht DmPar-6 (E) um. F: Überlagerung der Einzelfärbungen von D und E. Die Überexpression von SdtASH3-Hook, (G) verändert nicht die Lokalisation von endogenem Sdt Protein (H). I: Überlagerung der Einzelfärbungen von G und H. Im Zytoplasma lokalisiertes Sdt-GUK-Hook (J) verteilt nicht das endogene Sdt Protein um. L: Überlagerung der Einzelfärbungen von K und L.

3.3.6 Der *sdt*^{EH681} mutante embryonale Phänotyp wird teilweise durch die Überexpression von Sdt abgeschwächt

In Embryonen, die mutant für *sdt*^{EH681} sind, treten starke Defekte im Kutikulamuster während der späten Embryogenese auf. Das äußert sich in einem Kutikula-Phänotyp, in dem nur noch Krümel (*crumbs*) von Kutikula vorhanden sind, die auch an „Sternstaub“ (*stardust*) erinnern (Jürgens et al., 1984; Wieschaus et al., 1984). Nur Überreste der Filzkörper und des Vorderdarms sind als mehr oder weniger zusammenhängende Strukturen erkennbar (Tepass und Knust, 1993).

Hier knüpft eine Fragestellung dieser Arbeit an, ob eine bestimmte Region von Stardust zu einer Abschwächung des *sdt* mutanten embryonalen Phänotyps führen kann. Um diese Frage zu beantworten, wurden die transgen-kodierten Sdt Proteine (Abb. 3.18) im *sdt* mutanten Hintergrund überexprimiert und die Kutikula dieser Embryonen untersucht. Zusätzlich wurde

untersucht, ob das menschliche Homolog von Sdt, hMPP5, in der Lage ist, die Funktion von Sdt hinsichtlich der Abschwächung des mutanten Phänotyps zu substituieren. In diesen Untersuchungen wurde das hypomorphe Allel *sdt^{EH681}* verwendet, das zu einem Stop-Codon in der N-terminalen Region der Sdt-MAGUK und Sdt-GUK Isoform führt (Abb. 1.4). Die Sdt-B Isoform ist von dieser Mutation nicht betroffen. Für diese Analyse wurden Fliegen nach folgendem Schema gekreuzt:

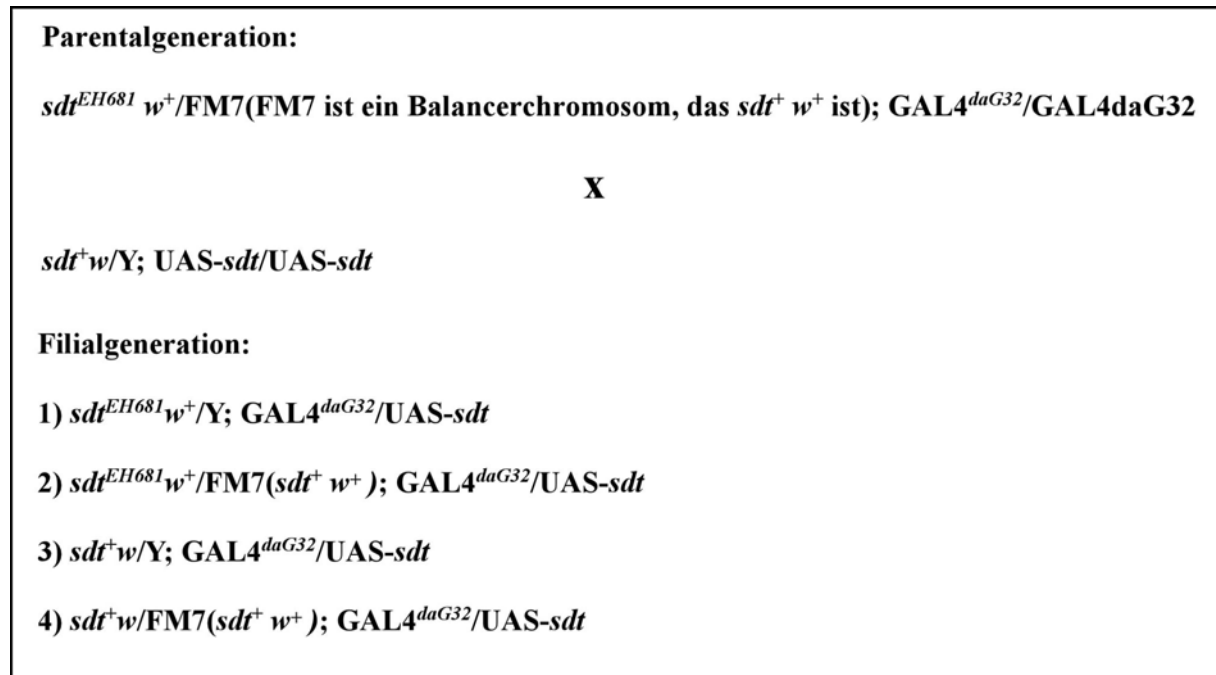


Abb. 3.24: Kreuzungsschema für die Rettungsexperimente mit den Sdt-Effektorkonstrukten
(Beschreibung s. Text)

Zwar ist eine Unterscheidung der Genotypen in den Kutikulapräparaten nicht möglich, doch lässt sich indirekt ableiten, ob durch die Überexpression der transgen-kodierten Stardust Proteine eine Abschwächung des *sdt* mutanten Phänotyp möglich ist.

Wichtig für diese Aussage sind die für *sdt* hemizygoten Embryonen der Klasse 1) (Abb. 3.24). Deren Kutikula zeigt die für *sdt* charakteristischen „Krümel“, wenn die Sdt Proteine den *sdt* mutanten Phänotyp nicht abschwächen und sehen identisch aus mit den für *sdt* hemizygoten Nachkommen des Ausgangstammes *sdt^{EH681}/FM7 (sdt⁺ w⁺)*; *Gal4^{daG32}/Gal4^{daG32}* (Abb. 3.25 B). In anderen Worten weist das Fehlen des *sdt* mutanten Kutikula-Phänotypen in den untersuchten Kutikulapräparaten daraufhin, dass das untersuchte Sdt Protein in der Lage ist, den mutanten embryonalen Phänotypen abzuschwächen. Embryonen der Klasse 3 und 4 sollten dominante Phänotypen zeigen, vergleichbar mit denjenigen aus 3.3.3, da diese Nachkommen wildtypisch für *sdt* sind. Die Kutikula-Phänotypen der Nachkommen aus

Klasse 2 können entweder eine Verstärkung des dominanten Phänotyps oder eine Abschwächung des *sdt* mutanten Phänotyps zeigen.

Die Analyse der Rettungsexperimente ergab, dass der *sdt* mutante embryonale Phänotyp partiell abgeschwächt wird, wenn die Sdt-B und Sdt-MAGUK Isoformen, Sdt Δ L27C und Sdt Δ 1-L27N überexprimiert werden (Abb. 3.21. D-F). Die Embryonen weisen neben Kutikula-, „Krümel“ zusammenhängende laterale Schilde auf. Die Überexpression von Sdt Δ Hook hingegen zeigt eine etwas geringere Abschwächung (Abb. 3.21. H-I). Die zusammenhängenden Bereiche der Kutikula sind viel kleiner als die oben erwähnten Kutikulaschilde. Als zusätzliche Kontrolle wurde die Sdt-MAGUK Isoform Bachmann, et al., 2001) verwendet. Die Expression dieses Proteins ergab ebenfalls eine Abschwächung des *sdt* mutanten embryonalen Phänotypen (Abb. 3.25 G) mit einer zusammenhängenden Kutikula, die laterale Schilde bilden, wie es bereits für die Sdt-B Isoform sowie Sdt Δ 1-L27N und Sdt Δ L27C beschrieben wurde.

Neben diesen beobachteten abgeschwächten Kutikula-Phänotypen treten die dominanten Phänotypen nach Überexpression von Sdt auf (3.3.3), z.B. dorsaler Schluss-Defekt (Abb. 3.21. C), Kopfdefekte und nicht komplett ausgefüllte Eihüllen (nicht gezeigt).

Die Überexpression von Deletionsvarianten, denen die PDZ, GUK oder SH3 Domäne fehlt, schwächt nicht den *sdt* mutanten Phänotypen ab. Die Überexpression der Domänen PDZ, SH3, Hook-GUK, 1-L27, 1-L27C, PDZ-GUK reichen ebenfalls nicht aus, um den *sdt* mutanten Phänotypen partiell abzuschwächen. Auch hMPP5 zeigt keine Abschwächung des *sdt* mutanten Phänotypen (Zusammenfassung s. Abb. 3.26).

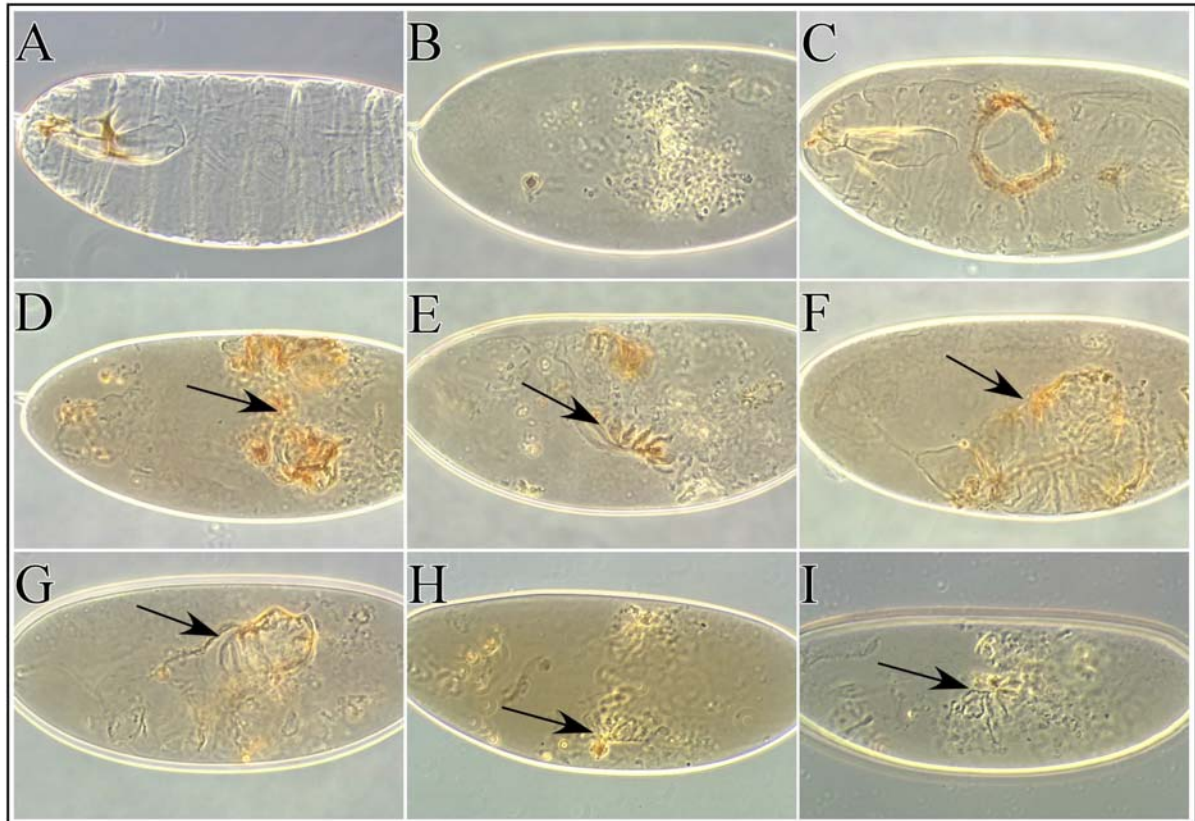


Abb. 3.25: Der sdt^{EH681} mutante Kutikula-Phänotyp wird durch die Überexpression von Sdt abgeschwächt
A: WT-Embryo, B: sdt^{EH681} mutanter Embryo, nur noch Reste von Kutikula sind erhalten, C: dominanter Phänotyp mit dorsalem Schluss-Defekt nach Sdt-Überexpression im wildtypischen Hintergrund, D-H: Abgeschwächte sdt^{EH681} mutante Phänotypen durch Überexpression von: D: Sdt-B Isoform, E: Sdt Δ L27C, F: Sdt Δ 1-L27N, G: Sdt-MAGUK, H-I: Sdt Δ Hook, D-G: die Abschwächung des sdt^{EH681} mutantern Phänotyps mit diesen Proteinen führt zur Bildung lateraler Schilde (Pfeile). In H und I ist die Rettung etwas schwächer, im Vergleich zu D-F, hier zeigen sich weniger zusammenhängende Bereiche. Die Aktivatorlinie Gal4^{daG32} wurde für die Überexpression von Sdt und hMPP5 verwendet. Anterior ist links, posterior rechts, dorsal oben und ventral unten.

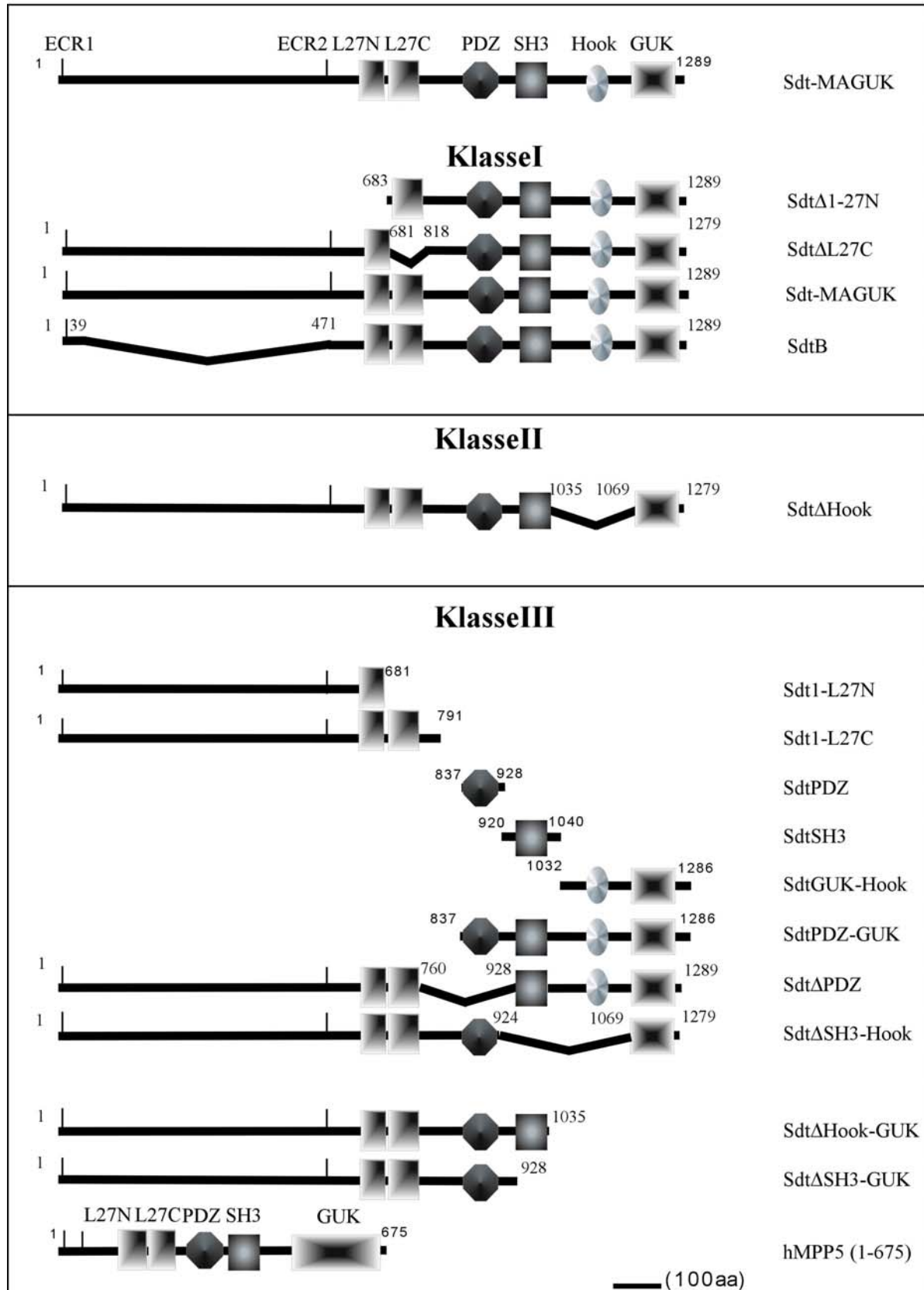


Abb. 3.26: Die transgen-kodierten Sdt und hMPP5 Proteine lassen sich in drei Klassen bezügl. ihrer Funktion im *sdt* mutanten Hintergrund einteilen

Proteine der Klasse I schwächen den *sdt* mutanten embryonalen Phänotyp partiell ab mit zusammenhängenden lateralen Kutikulaschilden. Proteine der Klasse II schwächen ihn geringer ab; es sind weniger zusammenhängende Bereiche von Kutikula zu erkennen. Proteine der Klasse III schwächen den mutanten Phänotypen gar nicht ab, so dass nur Kutikula-„Krümel“ zu sehen sind.

3.3.7 Bestimmung der embryonalen Letalitätsrate nach Überexpression von Sdt im *sdt^{EH681}* mutanten Hintergrund

In 3.3.5 wurde die mögliche Rettung von transgen-kodierten Sdt Proteinen sowie hMPP5 im *sdt* mutanten Hintergrund untersucht. Dabei wurde nur die Kutikula der gestorbenen Embryonen untersucht. Sollten Embryonen nach der Überexpression der transgen-kodierten Sdt Proteine tatsächlich schlüpfen, dann würden sie nicht in den Kutikula-Präparaten auftauchen. Um herauszufinden, ob einige Sdt-Varianten in der Lage sind, nach Überexpression die durch den Verlust des *sdt* Genproduktes hervorgerufene Letalität aufzuheben, wurde die Sterberate der Embryonen bestimmt, die im *sdt* mutanten Hintergrund verschiedene Sdt-Transgene überexprimieren (Abb. 3.27). Der Ausgangsstamm *sdt^{EH681}w⁺/FM7 (sdt⁺w⁺); Gal4^{daG32}/ Gal4^{daG32}* weist eine Letalität von 25% auf, die darauf zurückzuführen ist, dass *sdt* ein x-chromosomales rezessives Gen ist und somit 1/4 der Nachkommen (Embryonen, die hemizygot für *sdt* sind: *sdt^{EH681}w⁺/Y*) sterben.

Ziel dieser Untersuchung ist es, herauszufinden, ob sich die Sterberate des Stammes von 25% deutlich verringert. Dazu wurde die gleiche Kreuzung (Abb. 3.24) angesetzt und dabei die Letalitätsrate der Embryonen bestimmt. Die Überexpression der Sdt-Transgene führte in keinem Falle zu einer Erniedrigung der embryonalen Letalität um mehr als 3 %, was einer normalen Abweichung der Letalität des Ausgangsstammes entspricht (Abb. 3.27).

Eine Sterberate mit Werten zwischen 23 bis 30 %, die ebenfalls nur der normalen Abweichung des Ausgangsstammes entsprach, zeigte die Überexpression von SdtPDZ, SdtHook-GUK und SdtSH3, sowie SdtPDZ-GUK, SdtMAGUK(1), SdtΔL7C, SdtΔPDZ(1), SdtΔHook(1), SdtΔHook-GUK(2) und Sdt-B-Isoform (1). Eine starke Erhöhung der Sterberate auf 68 bzw. 69 % wurde mit der Überexpression von Sdt1-L27N(2) bzw. SdtΔHook(2) erzielt, was auf eine erhöhte Expression der Proteine oder eine besondere Konformation des Proteins deuten kann. Die Letalitätsraten der anderen überexprimierten transgen-kodierten Sdt Proteine lagen zwischen 32 und 55 %, (Abb. 3.27 und Zusammenfassung Abb. 3.29).

Ein Problem dieser Aufgabenstellung liegt darin, dass unter den gegebenen Bedingungen keine Aussage darüber getroffen werden kann, welche Nachkommen sterben.

Es könnte also sein, dass die Sterberate der für *sdt* hemizygoten Embryonen (*sdt^{EH681}/Y*; Gal4^{daG32}/ UAS-*sdt*) zwar verringert, aber die Sterberate durch die anderen Genotypen (*sdt^{EH681}/w*; Gal4^{daG32}/ UAS-*sdt*. FM7/Y; Gal4^{daG32}/ UAS-*sdt*. FM7/Y; Gal4^{daG32}/ UAS-*sdt*) erhöht wird.

Um diese Problematik zu umgehen, wurden die geschlüpften Tiere hinsichtlich ihrer Phänotypen analysiert. Sollten Männchen folgenden Genotyps (sdt^{EH681}/Y ; $Gal4^{daG32}/UAS-sdt$) schlüpfen würde das bedeuten, dass die Überexpression von Sdt die Lebensfähigkeit von für *sdt* hemizygoten Männchen, die in der Embryonalentwicklung sterben, ermöglichen würde. In der Nachkommenschaft fanden sich jedoch keine Männchen dieses Genotyps. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass die Überexpression von Sdt-Proteinen im *sdt* mutanten Hintergrund unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht zu einer Verringerung der Sterberate für *sdt* mutante Tiere führt.

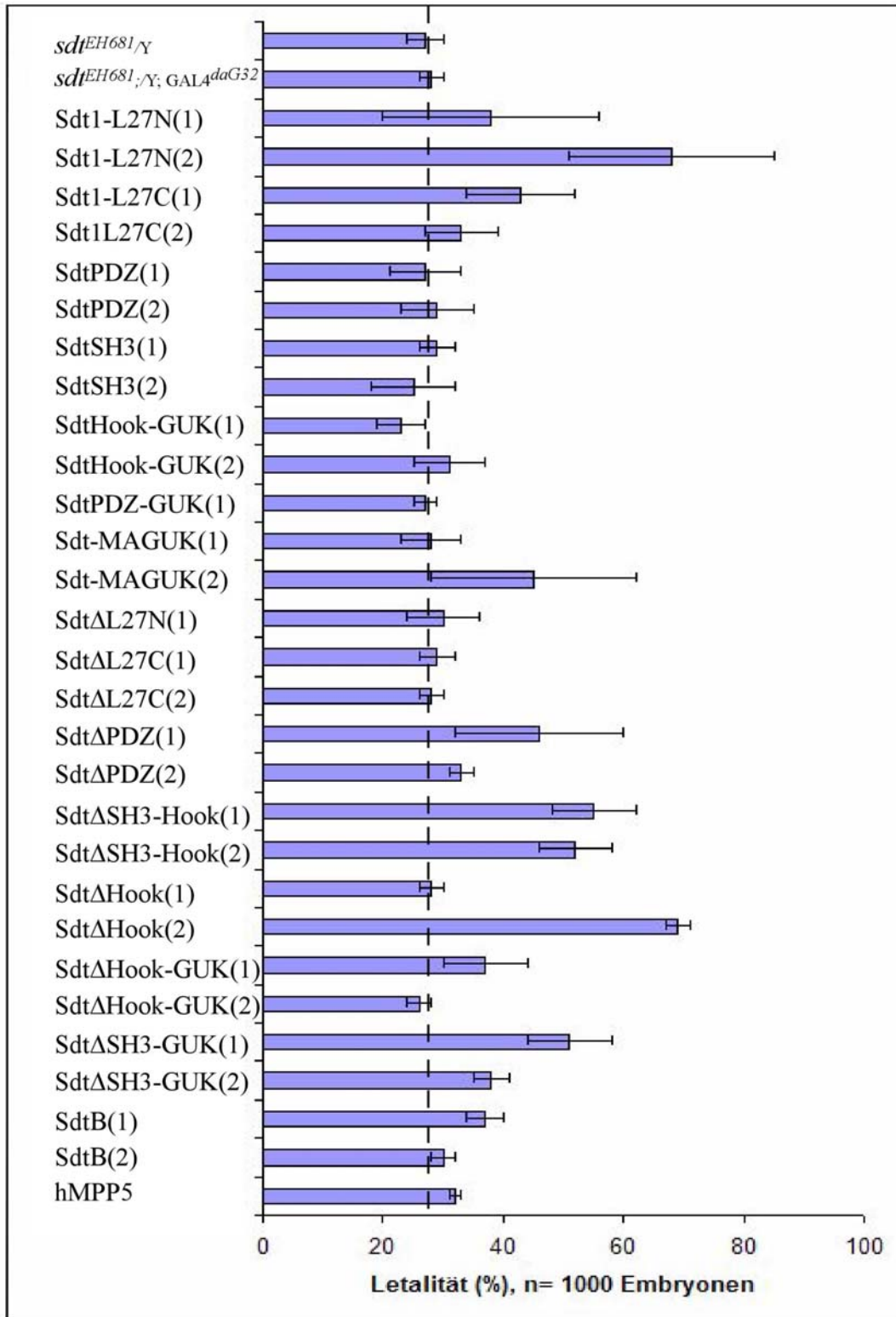


Abb. 3.27: Embryonale Letalitätsrate der Sdt-Überexpression im *sdt^{EH681}* mutanten Hintergrund

Die für *sdt* hemizygoten Embryonen des Stammes *sdt^{EH681}/Y; Gal4^{daG32}/Gal4^{daG32}* sterben zu 25 % (gestrichelte Linie). Diese Sterberate wurde durch die Überexpression der Sdt-Varianten nicht verringert. Die Überexpression der kleineren Sdt-Proteine wie SdtPDZ, SdtSH3 oder SdtPDZ-GUK sowie SdtMaguk(1), SdtΔL27C, SdtΔPDZ(1), SdtΔHook(1), SdtΔHook-GUK(2) und Sdt-B-Isoform(1) hat keinen Einfluss auf die 25 %-ige Letalität. Im Gegensatz dazu wurde eine starke Erhöhung der Sterberate durch die Überexpression von Sdt1-L27N(2) bzw. SdtΔHook(2) 68 bzw. 69 % beobachtet. Die anderen Letalitätsraten lagen zwischen 32 und 55 %. Für die Bestimmung der Letalitätsraten wurden ca. 1000 abgelegte Embryonen in mind. 3 unabhängigen Versuchen ausgewertet und daraus der Mittelwert gebildet.

3.3.8 Welche Auswirkung haben die verschiedenen Sdt- Varianten nach Überexpression?

Die Beteiligung eines Gens an einem bestimmten Prozess wird dann sichtbar, wenn die Funktion dieses Gens ausfällt, also eine Mutation in diesem Gen vorliegt. Dabei kann eine Mutation zu einem Verlust der normalen Genfunktion (*loss of function*) oder zu einem Zugewinn der normalen Genfunktion führen (*gain of function*).

Ebenfalls können Hinweise auf die Funktion eines Gens gewonnen werden, wenn durch Überexpression des von ihm kodierten Proteins dominante Phänotypen auftreten.

Wie in den vorherigen Kapiteln bereits erwähnt, führt die Überexpression einiger Sdt-Varianten zu embryonaler Letalität mit dominanten Phänotypen, wie Löchern in der anterioren und dorsalen Kutikula und Embryonen, die nicht die ganze Eihülle ausfüllen (Zusammenfassung Abb. 3.29). Dabei ist nicht klar, ob das Auftreten der dominanten Phänotypen durch dominant aktive oder dominant negative Effekte zu erklären ist. Ein dominant aktiver Effekt würde zu einer hyperaktiven Form des überexprimierten Proteins führen, das der Auswirkung einer Zugewinn-Mutation ähneln würde. Im Gegensatz dazu steht ein dominant negativer Effekt, der sich wie eine Verlustmutation verhält.

Einige *sdt* hypomorphe Allelen wie *sdt*⁶⁴⁶³, *sdt*^{Q292}, *sdt*^{XNO5} und *sdt*⁶⁴⁶³ zeigen Defekte im dorsalen Schluß (Berger, 2005), wie es für die Überexpression einiger transgen-kodierten Sdt Proteine in 3.3.3 beschrieben wurde. Dies deutet darauf hin, dass diese Phänotypen durch dominant negative Effekte entstehen.

Um diese Frage zu beantworten, wurde in diesem Ergebnisteil untersucht, ob es sich bei der Überexpression der Sdt-Varianten um dominant negative oder aktive Auswirkungen handelt. Hierzu wurde die Sdt-Überexpression im *sdt* mutanten Hintergrund untersucht (Abb. 3.24). Anders als im Abschnitt 3.3.5 wurden dabei nicht die für *sdt* hemizygoten Nachkommen sondern die heterozygoten Weibchen analysiert. Die weiblichen Nachkommen, die nur eine intakte Kopie von *sdt* besitzen und Sdt überexprimieren (Abb. 3.24, Klasse 2):

sdt^{EH681} *w*⁺/FM7; Gal4^{daG32}/UAS-*sdt*, wurden mit den Weibchen ins Verhältnis gesetzt,

die 2 Kopien des *sdt* Gens enthalten (Abb. 3.24, Klasse 4):

sdt⁺ *w*/FM7 (*sdt*⁺ *w*⁺); Gal4^{daG32}/UAS-*sdt*.

Hat der Verlust einer Kopie von *sdt* keinen Einfluss auf die Sterberate, die durch Überexpression von Sdt hervorgerufen wird, so ist der Quotient gleich 1. Ist der Quotient aus *sdt*^{EH681}*w*⁺/FM7; Gal4^{daG32}/UAS-*sdt* : *sdt*⁺*w*⁺/FM7 (*sdt*⁺*w*⁺); Gal4^{daG32}/UAS-*sdt* kleiner als 1, schlüpfen weniger Weibchen, denen eine Kopie von *sdt* fehlt. Die Sdt-Überexpression verstärkt die durch den Verlust einer Kopie von *sdt* hervorgerufene Letalität. In anderen Worten heisst dies, dass die Sdt Varianten nach Überexpression in Gegenwart nur einer intakten Kopie von *sdt* dominant negative Effekte ausüben. Ist der Quotient grösser 1, schlüpfen mehr Weibchen, die heterozygot für *sdt* sind und Sdt überexprimieren. Das Fehlen einer Kopie von *sdt* vermindert hier die durch Sdt-Überexpression bewirkte Letalität. Diese Sdt Varianten sind dominant aktiv. Die Messwerte zeigen Fehlerabweichungen um bis zu 0,2. Deshalb wurden Quotienten kleiner 0,8 als dominant-negativ, Quotienten über 1,2 als dominant aktiv festgesetzt. SdtΔ1-L27N(2) führt zusammen mit SdtΔSH3-Hook(2) sowie SdtΔSH3-GUK(1,2) zu dominant negativen Effekten, da ihr Quotient unterhalb von 0,8 liegt (Abb. 3. 25). SdtHook-GUK(1,2), Sdt-MAGUK(1) sowie SdtΔ1-L27N, SdtΔ1-L27C(2), SdtΔPDZ(2) und SdtΔHook(1) weisen Quotienten über 1.3 auf und stellen somit dominant aktive Varianten dar. Die restlichen untersuchten Sdt-Varianten weisen einen Quotienten um 1 auf.

Zusammenfassung:

Die Überexpression von Sdt Proteinen führt zu dominant negativen und aktiven Effekten im Hinblick auf die Lebensfähigkeit von Fliegen, die nur eine intakte Kopie von *sdt* besitzen. Die Deletionsvarianten, SdtΔSH3-Hook(2) zusammen mit SdtΔSH3-GUK(1,2) und SdtΔ1-L27N(2) führen dabei vermutlich zu dominant negativen Effekten. Die Überexpression dieser Proteine verhalten sich wie eine Verlust-Mutation von *sdt*. Im Gegensatz dazu zeigen Sdt-GUK(1,2), Sdt-MAGUK(2) sowie SdtΔ1-L27N, SdtΔ1-L27C(2), SdtΔPDZ(2) und SdtΔHook(1) vermutlich dominant aktive Auswirkungen. Das heisst, sie verhalten sich wie Funktionsgewinn-Mutationen.

Bezugnehmend auf die dominanten embryonalen Phänotypen gibt es keinen Unterschied, ob die überexprimierten Sdt Proteine zu dominant aktiven oder negativen Auswirkungen führen. Beide Effekte führen zu denselben Phänotypen.

Überexpression der transgen-kodierten Sdt (hMPP5) Proteine	Verhältnis zwischen $sdt^{EH681}w^+/FM7$; Gal4 ^{daG32} /UAS-sdt : $sdt^+w^+/FM7$ (sdt^+w^+); Gal4 ^{daG32} /UAS-sdt	Auftreten dominanter Effekte in Abwesenheit einer Kopie von <i>sdt</i>
SdtΔSH3-Hook (1)	kaum adulte Fliegen	dominant negativ
SdtΔSH3-Hook (2)	0,1	dominant negativ
SdtΔSH3-GUK (1)	0,2	dominant negativ
SdtΔSH3-GUK (2)	0,6	dominant negativ
Sdt1-L27N(2)	0,6	dominant negativ
Sdt1-L27N(1)	0,7	dominant negativ
Sdt1-L27C(1)	0,8	keine
Sdt1-L27C(2)	0,9	keine
SdtPDZ-GUK	0,9	keine
SdtΔGUK-Hook (1)	0,9	keine
SdtΔL27C (1)	1	keine
SdtMpp5	1	keine
Sdt-MAGUK(1)	1,1	keine
sdt^{EH681} ; Gal4 ^{daG32} (Kontrolle)	1	keine
SdtPDZ (1)	1,1	keine
SdtSH3 (2)	1,1	keine
SdtSH3 (1)	1,2	keine
SdtΔPDZ (1)	1,2	keine
SdtHook-GUK (2)	1,3	dominant aktiv
SdtΔ1-L27N	1,3	dominant aktiv
SdtΔHook (1)	1,3	dominant aktiv
SdtHook-GUK (1)	1,4	dominant aktiv
SdtΔL27C (2)	1,4	dominant aktiv
SdtΔPDZ (2)	1,4	dominant aktiv
Sdt-MAGUK(2)	1,9	dominant aktiv

Abb. 3.28: Zusammenfassung der Auswirkungen nach Sdt Überexpression im *sdt* mutanten Hintergrund
(Beschreibung der Genotypen s. Text)

Die Quotienten von Weibchen, die die transgen-kodierten Sdt Proteine: SdtΔ1-L27N(2), SdtΔSH3-Hook(2) und SdtΔSH3-GUK(1,2) überexprimieren, liegen unterhalb von 0,8 und stellen somit vermutlich dominant negative Zustandsformen dar. SdtHook-GUK(1,2), Sdt-Maguk(1) sowie SdtΔ1-L27N, SdtΔ1-L27C(2), SdtΔPDZ(2) und SdtΔHook(1) überexprimierende Weibchen weisen Quotienten größer 1,3 auf und stellen somit vermutlich dominant aktive Varianten dar. Die Weibchen, die die anderen Sdt Proteine überexprimieren, weisen einen Quotienten um 1 auf. Die Fehlerabweichung lag bei 0,2. Für die Analysen wurden mindestens 100 Weibchen ausgewertet, bis auf Tiere, die SdtΔSH3-Hook(1) überexprimierten, da hier kaum adulte Fliegen schlüpften.

Ergebnisse

Überexpression der Stardust Konstrukte	Lokalisation der Sdt-Proteine in WT Embryonen	Letalität in WT Embryonen (%)	Defekte in der Kutikula	Letalität in <i>sdt</i> ^{EH} mutanten Embryonen (%)	Rettung von <i>sdt</i> ^{EH} mutanten Embryonen
Sdt-N(1)	Membran	7	keine	n.d.	n.d.
Sdt-N(2)	Membran	9	keine	n.d.	n.d.
Sdt1-L27N(1)	Membran	52	a.L.; E.u.	38	nein
Sdt1-L27N(2)	Membran	41	a.L.; E.u.	68	nein
Sdt1-L27C(1)	Membran	74	a. + d. L., E.u.	43	nein
Sdt1-L27C(2)	Membran	49	a. + d. L., E.u.	33	nein
Sdt-PDZ (1)	zytoplasmatisch	10	keine	27	nein
Sdt-PDZ (2)	zytoplasmatisch	10	keine	33	nein
Sdt-SH3(1)	zytoplasmatisch	11	keine	29	nein
Sdt-SH3(2)	n.d.	9	keine	25	nein
Sdt-GUK(1)	zytoplasmatisch	15	keine	31	nein
Sdt-GUK(2)	n.d.	12	keine	23	nein
Sdt-PDZ-GUK (1)	zytoplasmatisch	8	keine	n.d.	n.d.
Sdt-PDZ-GUK (2)	zytoplasmatisch	12	keine	27	nein
Sdt-MAGUK(1)	Membran, apikal	24	a. + d. L., E.u.	30	ja
Sdt-MAGUK(2)	Membran	41	a. + d. L., E.u.	45	ja
SdtΔ1-L27N	diffus, Membran	28	a. + d. L., E.u.	34	ja
SdtΔL27C(1)	Membran	22	a. + d. L., E.u.	29	ja
SdtΔL27C(2)	n.d.	16	a. + d. L., E.u.	28	ja
SdtΔPDZ (1)	diffus, Membran	56	a. + d. L., E.u.	46	nein
SdtΔPDZ (2)	diffus, Membran	13	a. + d. L., E.u.	34	nein
SdtΔSH3-Hook(1)	Membran	61	a. + d. L., E.u.	55	nein
SdtΔSH3-Hook(2)	n.d.	47	a. + d. L., E.u.	52	nein
SdtΔHook(1)	Membran	16	a. + d. L., E.u.	28	ja
SdtΔHook(2)	n.d.	24	a. + d. L., E.u.	69	ja
SdtΔGUK-Hook	Membran	35	a. + d. L., E.u.	37	nein
SdtΔGUK-Hook	n.d.	33	a. + d. L., E.u.	26	nein
SdtΔSH3-GUK(1)	Membran	51	a. + d. L., E.u.	51	nein
SdtΔSH3-GUK(2)	n.d.	40	a. + d. L., E.u.	38	nein
Sdt-B(1)	Membran	52	a. + d. L., E.u.	37	ja
Sdt-B(2)	n.d.	30	a. + d. L., E.u.	30	ja
hMPP5	zytoplasmatisch	12	keine	32	nein

Abb. 3.29: Zusammenfassung der Überexpressions-Analysen von Sdt und hMPP5

In dieser Abbildung sind die Untersuchungen der Sdt Konstrukte zusammengefasst. Aufgelistet ist die Lokalisation der verschiedenen Domänen im Wt, die Bestimmung der Letalitätsrate im Wt, die Defekte in der Kutikula und die Letalitätsrate im *sdt* mutanten Hintergrund. Des Weiteren ist zu sehen, ob die Überexpression der Konstrukte dazu in der Lage ist, den *sdt* mutanten Phänotypen zu retten. a. : anteriore, d. : dorsale, L. : Löcher, E.u: Eihülle unvollständig ausgefüllt, n.d.: nicht durchgeführt

Überexpression der Stardust Konstrukte	Lokalisation von DPATJ	Lokalisation von Nrt	Lokalisation von DmPar-6	Lokalisation von Crb	Lokalisation von Sdt
SdtN(1)	n.d.	wt	wt	wt	n.d.
SdtN(2)	n.d.	wt	wt	wt	n.d.
Sdt1-L27N(1)	Mislokalisierung	wt	wt	wt	wt
Sdt1-L27N(2)	Mislokalisierung	wt	wt	wt	n.d.
Sdt1-L27C(1)	Mislokalisierung	wt	wt	wt	n.d.
Sdt1-L27C(2)	Mislokalisierung	wt	wt	wt	n.d.
SdtPDZ (1)	n.d.	wt	n.d.	wt	n.d.
SdtPDZ (2)	n.d.	n.d.	n.d.	wt	n.d.
SdtSH3(1)	n.d.	wt	n.d.	wt	n.d.
SdtSH3(2)	n.d.	wt	n.d.	n.d.	n.d.
Sdt-GUK(1)	n.d.	wt	wt	wt	wt
Sdt-GUK(2)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SdtPDZ-GUK (1)	n.d.	wt	wt	wt	n.d.
SdtPDZ-GUK (2)	n.d.	wt	wt	wt	n.d.
Sdt-MAGUK(1)	wt	wt	wt	wt	n.d.
Sdt-MAGUK(2)	Mislokalisierung	wt	wt	wt	wt
SdtΔ1-L27N	Mislokalisierung	wt	n.d.	wt	n.d.
SdtΔL27C(1)	n.d.	wt	n.d.	wt	n.d.
SdtΔL27C(2)	n.d.	wt	n.d.	wt	n.d.
SdtΔPDZ (1)	n.d.	wt	n.d.	wt	n.d.
SdtΔPDZ (2)	n.d.	n.d.	n.d.	wt	n.d.
SdtΔSH3-Hook(1)	Mislokalisierung	wt	wt	wt	wt
SdtΔSH3-Hook(2)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SdtΔHook(1)	n.d.	wt	n.d.	wt	n.d.
SdtΔHook(2)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SdtΔGUK-Hook	n.d.	wt	n.d.	wt	wt
SdtΔGUK-Hook	n.d.	wt	n.d.	wt	n.d.
SdtΔSH3-GUK(1)	Mislokalisierung	wt	n.d.	wt	n.d.
SdtΔSH3-GUK(2)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sdt-B-Isoform(1)	Mislokalisierung	wt	wt	wt	n.d.
Sdt-B-Isoform(2)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
hMPP5	n.d.	wt	wt	wt	n.d.

Abb. 3.30: Zusammenfassung der Mislokalisations-Analysen von DPATJ, Crb, DmPar-6, Nrt und endogenem Sdt, nach Überexpression von Sdt-Proteinen und hMPP5 im Wt-Hintergrund

In dieser Abbildung ist die Analyse der Lokalisation von DPATJ, Nrt, DmPar-6 und Crb nach der Überexpression der verschiedenen Domänen und Deletionsvarianten von Sdt zu sehen. Die Überexpression der Sdt-Maguk Isoform, sowie der Sdt-B Isoform und den Deletionsvarianten SdtΔSH3-Hook(1), SdtΔHook-GUK, SdtΔSH3-GUK führen zur Mislokalisierung von DPATJ. Die Überexpression der aufgelisteten Konstrukte führt weder zu einer Umverteilung von DmPar-6, Crb, Nrt noch endogenem Sdt. wt: wildtypische Lokalisation, n.d. nicht durchgeführt

4 Diskussion

4.1 Die Mitglieder des Baz (PAR-3) und Crb (CRB) Komplexes und ihre molekularen Wechselwirkungen sind konserviert

Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass das Zusammenspiel der Komponenten des Baz (PAR-3) und Crb (CRB) Komplexes für die Etablierung und Aufrechterhaltung der apiko-basalen Polarität von Epithelzellen wichtig ist. Die molekularen Wechselwirkungen der beiden Multiproteinkomplexe sind von *Drosophila* bis zu Vertebraten konserviert.

Durch verschiedene *in vitro* und *in vivo* Versuche im Rahmen dieser Arbeit wurde die Interaktion zwischen *DmPar-6*, einem Mitglied des Baz Komplexes, und zweier Komponenten des Crb Komplexes, Crb sowie Sdt, identifiziert (Abb. 4.1). Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen unterstützen ebenfalls Wechselwirkungen zwischen beiden Komplexen. Einerseits bestätigen sie die in dieser Arbeit gefundenen Interaktionen, andererseits unterscheiden sich die Ergebnisse hinsichtlich der Proteine, die diese Verbindung vermitteln. In dieser Arbeit wurde in Hefe-Zwei-Hybrid und GST-Pulldown Versuchen eine Interaktion zwischen dem N-Terminus von Sdt und der PDZ Domäne von *DmPar-6* identifiziert. Diese Bindung wurde ebenfalls in GST-Pulldown Experimenten für Sdt und *DmPar-6* sowie für PALS1 und PAR6 bestätigt, in welche die beiden ECR Domänen von Sdt und PALS1 und die CRIB-PDZ Domänen von *DmPar-6* und PAR6 involviert sind (Wang et al., 2004; Hurd et al., 2003).

Die in dieser Arbeit durch verschiedene *in vitro* und *in vivo* Analysen verifizierte Bindung zwischen *DmPar-6* und Crb ist ebenfalls in Vertebraten konserviert. In MDCK Zellen und im Hefe-Zwei-Hybrid System interagiert CRB3 mit PAR-6 (Lemmers et al., 2004). Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Überexpression von Crb in der Epidermis eine Fehllokalisation von *DmPar-6* zur Folge hat. Dieses Ergebnis wird durch Versuche in Hela Zellen mit CRB3 bestätigt, das ebenfalls in der Lage ist PAR-6 fehlzuverteilen (Hurd et al., 2003). Der reziproke Versuch, in dem *DmPar-6* überexprimiert wird, zeigt hingegen keine Veränderung der Crb Lokalisation.

Dies könnte darauf hindeuten, dass *DmPar-6* in der Signalkette unterhalb von Crb wirkt, da eine ektopische Anreicherung von *DmPar-6* Protein in Epithelien nicht notwendigerweise zu einer Umverteilung von Crb führt. Diese Erklärung ist jedoch nicht wahrscheinlich, da *DmPar-6* zeitlich früher als Crb exprimiert wird (Petronczki und Knoblich, 2001) und die Vermutung besteht, dass es in der Wirkungskette oberhalb von Crb funktioniert. Des

Weiteren könnte es sein, dass die durch das Gal4/UAS-System bedingte, verzögerte Expression ab Stadium 9 von *DmPar-6* keinen Einfluss mehr auf die Verteilung von Crb und weiteren Bindungspartnern hat.

Allerdings weisen Ergebnisse aus MDCK Zellen von Vertebraten darauf hin, dass die Mitglieder des PAR-3, PAR-6 und PKC ζ Komplexes unterhalb von PALS1 wirken. Denn durch eine Reduktion von PALS1 wird die Assoziation von Par-6 und PKC ζ mit dem Crb Komplex gestört. Die Verteilung dieser beiden Proteine ist stärker betroffen als PAR-3 (Straight et al., 2004). Eine andere Erklärung dafür, warum Crb nicht durch die ektopische *DmPar-6* Expression fehlverteilt wird, könnte sein, dass die endogenen Bindungen von *DmPar-6* Bindungspartnern gesättigt sind, so dass ein „Mehr“ an *DmPar-6* zu keiner Umverteilung der Interaktionspartner führt. Diese Annahme wird durch die Überexpression von *DmPar-6* in Epithelien bestätigt. In diesen werden weder Crb noch Sdt noch andere Bindungspartner wie Baz oder DaPKC fehlverteilt.

Drei alternative Möglichkeiten den Crb und Baz Komplex zu verbinden, wurden durch die Interaktionen des N-Terminus von *DmPar-6* mit der dritten PDZ Domäne von DPATJ (Nam und Choi, 2003) sowie durch die Bindung von DaPKC an DPATJ (Sotillos et al., 2004) beschrieben.

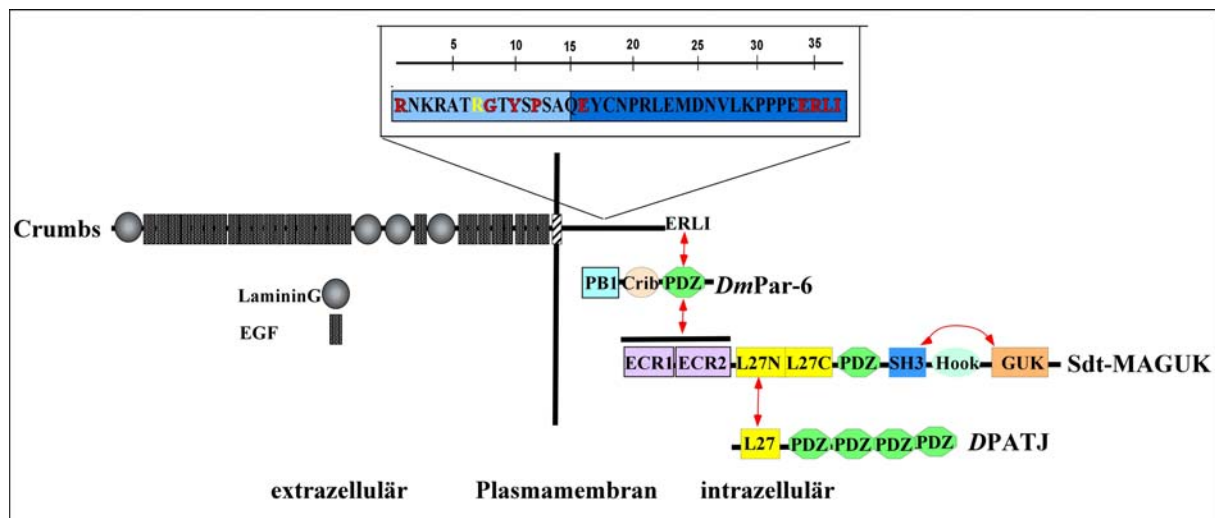


Abb. 4.1 Schematische Übersicht der identifizierten Interaktionen in dieser Arbeit

DmPar-6 bindet über seine PDZ Domäne an das ERLI Motiv von Crb und den N-Terminus von Sdt, der beide ECR Domänen enthält. Des Weiteren bindet die L27 Domäne von Sdt an die L27 Domäne von DPATJ. Eine intermolekulare Bindung findet statt zwischen der SH3 und den Hook-GUK Domänen von Sdt. Die Domänen sind nicht masstabsgetreu wiedergegeben. Die intrazelluläre Region von Crb ist in der Übersicht nur mit den letzten vier Aminosäuren ERLI angedeutet. Die genaue Sequenz der intrazellulären Domäne von Crb befindet sich über der Zeichnung.

Außerdem konnte der C-Terminus von Crb als Substrat und Bindungspartner für DaPKC im GST-Pulldown isoliert werden (Sotillos et al., 2004). Eine direkte Bindung der beiden Proteine konnte mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid Systems in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Dies könnte daran liegen, dass die Konformation dieser Proteine durch die Fusion der Gal4p-Bindungs- oder Aktivierungs-Domäne verändert wird, so dass eine Interaktion nicht stattfindet. Das Fehlen von weiteren Bindungspartnern, um diese Bindung zu ermöglichen, wäre eine weitere Erklärung. Jedoch unterstützen weitere experimentelle Ansätze eine Interaktion zwischen DaPKC und Crb. Nach Überexpression von Crb wird DaPKC ebenso wie DmPar-6 in embryonalen Epithelien fehlverteilt (diese Arbeit). Zum anderen unterstützen Kolokalisations-Analysen und Ko-Immunopräzipitationen in S2-Zellen von *Drosophila* die Interaktion von Crb und DaPKC (Medina, unveröffentlichte Daten).

Eine direkte Bindung zwischen Baz und Mitgliedern des Crb Komplexes konnte in dieser Arbeit nicht identifiziert werden. Anders als DmPar-6 und DaPKC wird Baz nicht nach Überexpression von Crb fehlverteilt. Eine mögliche Erklärung dafür könnte darin liegen, dass DmPar-6 und DaPKC unabhängig von Baz mit Mitgliedern des Crb Komplexes interagieren können. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass DmPar-6 und DaPKC unabhängig von Baz funktionieren können. So interagiert der PAR-6/aPKC Komplex selektiv entweder mit mLgl oder mit PAR-3 unter der Kontrolle der aPKC Aktivität, um Zellpolarität in Epithelzellen zu regulieren (Yamanaka et al., 2003). Während der Zellpolarisierung kolokalisiert mLgl anfangs mit dem PAR-6/aPKC Komplex an Zell-Zell-Kontakt Regionen und wird durch aPKC phosphoryliert. Dies führt zu seiner Umverteilung vom apikal lokalisierenden PAR-6/aPKC Komplex zur basolateralen Membran, nachdem die Zellen polarisiert sind. mLgl kompetiert dabei mit PAR-3 um die Bildung eines Komplexes mit PAR-6 und aPKC bei der Bildung von *tight junctions* (Yamanaka et al., 2003).

In *Drosophila* ist die Bildung dieses Baz unabhängigen Komplexes zwischen Lgl, DmPar-6 und DaPKC bei der Ausbildung der Polarität in Neuroblasten ebenfalls konserviert (Betschinger et al., 2003).

Ein weiteres Beispiel ist die Bindung von PAR-1 an Baz. PAR-1 phosphoryliert Baz an zwei konservierten Serin-Resten und bildet so 14-3-3 Bindestellen aus. Diese Phosphorylierung hat zur Folge, dass Baz von der lateralen Membran ausgeschlossen wird und apikal lokalisiert. Ebenso inhibiert die Phosphorylierung von Baz durch PAR-1 die Bildung des Bazooka/ DmPar-6/ DaPKC Komplexes, indem die Oligomerisierung von Baz und seine Bindung zu DaPKC gehemmt werden. Lateraler Ausschluss von Baz durch den PAR-1/14-3-3 Komplex

kooperiert mit seiner apikalen Verankerung durch Crb und Sdt. Der Ausfall beider Signalwege führt zu einem Verlust von epithelialer Polarität (Benton und Johnston, 2003).

Eine andere Erklärung, warum Baz nicht nach Überexpression von Crb fehlverteilt wird, könnte darin begründet sein, dass Baz epistatisch zu Crb ist (Bilder et al., 2003, Tanentzapf und Tepass, 2003). Die Annahme, dass neben *DmPar-6* und *DaPKC* auch Baz im Crb Komplex anwesend sein könnte, wird durch Ergebnisse aus epithelialen Zellen von Vertebraten unterstützt. In diesen wird PAR-3 in MDCK und HEK293 Zellen mit PALS1 in Abhängigkeit von PAR-6 ko-immunopräzipitiert (Hurd et al., 2003). Diese Annahme sollte zukünftig durch Ko-Immunopräzipitation in *Drosophila* überprüft werden.

Es ist noch nicht geklärt, ob diese Bindungen zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung oder in verschiedenen Geweben stattfinden können. Während der Embryonalentwicklung sind *DmPar-6* und Baz in die asymmetrische Teilung der Neuroblasten involviert (Petronczki und Knoblich, 2001). Im Gegensatz dazu scheinen die beiden Proteine nicht in die Entstehung der Polarität in Photorezeptorzellen von *Drosophila* involviert zu sein. In diesen lokalisieren *DmPar-6* und *DaPKC* zusammen mit den Mitgliedern des Crb Komplexes im Rhabdomerstiell. Baz hingegen ist an den *adherens junctions* lokalisiert, was auf eine unabhängige Funktion von *DmPar-6*, *DaPKC* und Baz hin deutet (Nam und Choi, 2003). Es ist auch denkbar, dass verschiedene Isoformen eines Proteins an unterschiedliche Partner binden können. So konnte für PAR-6 gezeigt werden, dass PAR-6B in MDCK Zellen und Cos-7 Zellen im Zytoplasma lokalisiert und an PALS1 bindet. PAR-6A hingegen enthält eine Region im N-Terminus, die eine Bindung zu PALS1 inhibiert, aber eine Bindung zu ZO-1 zulässt (Gao et al., 2004).

Des Weiteren ist noch nicht verstanden, ob eine der bisher beschriebenen Bindungen unter bestimmten Bedingungen bevorzugt ausgebildet wird. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die mit Hilfe von quantitativen ONPG-Versuchen in der Hefe ermittelte Bindungsaffinität zwischen *DmPar-6* und Crb mit 3 MU (Miller Units) etwas stärker ist als diejenige zwischen Sdt und Crb mit 2,5 MU. In Zusammenarbeit mit Gregorio Fernandez-Ballester und Luis Serrano wurde dieses Ergebnis mit theoretischen berechneten Bindungsenergien verifiziert. Sie geben an, dass die Bindungsenergie zwischen Crb und *DmPar-6* mit -11,49 kcal/mol etwas höher liegt als die Bindung zwischen Crb und Sdt mit -9,1 kcal/mol. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass die Bindung zwischen *DmPar-6* und Crb *in vivo* bevorzugt stattfinden könnte. Des Weiteren bleibt die Frage offen, ob die Interaktionen gleichzeitig oder dynamisch stattfinden oder miteinander kompetieren können. In MDCK Zellen konnte im Rahmen von GST-Pulldown Versuchen gezeigt werden, dass die

Bindung zwischen PALS1 und PATJ schwächer wird, wenn die Dosis von PAR-6 erhöht wird, was auf eine kompetitive Bindung hindeutet (Wang et al., 2004).

Diese Ergebnisse zeigen, dass molekulare Wechselwirkungen zwischen *DmPar-6* und *DaPKC* mit verschiedenen Proteinen des Crb Komplexes in mehreren Spezies konserviert sind und die Ausbildung und den Erhalt apiko-basaler Polarität in Epithelien kontrollieren.

4.1.1 Modell der Funktion der Baz und Crb Komplexe in embryonalen Epithelien von *Drosophila*

Baz ist für seine anfängliche Rolle in der Etablierung der apikalen Identität während der Zellularisierung beschrieben worden (Harris und Peifer, 2004), (Abb. 4.2). Ein Verlust des Genproduktes von *baz* führt zu einer Fehlverteilung von *DmPar-6* (Petronczki und Knoblich, 2001), Crb (Bilder und Perrimon et al., 2003) und *DaPKC* (Wodarz et al., 2000), was seine Rolle als Schlüsselprotein in diesem Prozess unterstreicht. Kurz nach Ende der Zellularisierung, ab Stadium 5 der Embryonalentwicklung, lokalisiert *DmPar-6* in Abhängigkeit von *DCdc-42*, *Lgl* und *DaPKC* an die Plasmamembran. Dabei phosphoryliert *DaPKC* *Lgl*, das daraufhin apikal inaktiviert und nach basolateral dirigiert wird. Dort ist *Lgl* aktiv und verhindert, dass *DmPar-6* basolateral lokalisiert (Hutterer et al., 2004). Während der Gastrulation ab Stadium 7 beginnt die Expression von Crb und Sdt (Tepass et al., 1990; Bachmann et al., 2001). Analysen in *crb* und *DmPar-6* mutanten Embryonen in dieser Arbeit konnten zeigen, dass die Expression und Lokalisation von Crb und *DmPar-6* in ektodermalen Epithelien voneinander abhängen. Ebenfalls ist *DmPar-6* für die richtige Lokalisation von Sdt im Embryo notwendig. In Embryonen, denen sowohl maternales sowie zygotisches Genprodukt von *DmPar-6* fehlen, sind neben Crb auch Baz und *DaPKC* sowie Armadillo, ein Marker der ZA, nicht richtig lokalisiert (Petronczki und Knoblich, 2001; Hutterer et al., 2004). Die Ergebnisse aus dieser Arbeit und anderen Arbeitsgruppen (Hurd et al., 2003; Lemmers et al., 2004; Wang et al., 2004) unterstützen die Annahme, dass *DaPKC* und *DmPar-6* dazu in der Lage sind, Crb sowie Sdt an die Plasmamembran zu rekrutieren und dort zu stabilisieren. Des Weiteren deuten die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse daraufhin, dass Crb an der Stabilisierung dieser beiden Proteine beteiligt sein könnte. Diese Annahme wurde für zwei weitere Mitglieder des CRB Komplexes, PALS1 und PATJ, bestätigt, deren Verlust zu einer Dissoziation von PKC ζ , PAR-6, PAR-3 mit CRB3 in MDCK Zellen führt (Straight et al., 2004). Die stabilisierende Funktion des Crb Komplexes könnte darin liegen, dass Crb durch sein FERM-Binde Motiv an *D-Moesin* bindet und so eine Verbindung zum

Spektrin-Aktin-Membranskelett herstellt (Medina et al., 2002a, b). Des Weiteren ist Sdt als MAGUK Protein in der Lage, ein Multiprotein-Netzwerk zu bilden, indem es mit seiner PDZ Domäne an Crb und der L27C Domäne an *DLin-7* bindet (Bachmann et al., 2001; Bachmann et al., 2004, Berger, unveröffentlichte Daten). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine weniger konservierte N-terminale L27 Domäne von Sdt in der Lage ist, *DPATJ* in Hefe-Zwei-Hybrid Analysen zu binden. Diese Bindung ist ebenfalls in Vertebraten konserviert (Roh et al., 2002). Des Weiteren wurde eine intermolekulare Interaktion zwischen der SH3 Domäne und einer Region von Sdt, die sowohl die GUK als auch die Hook Domäne enthält, beobachtet. Das Ergebnis, dass zwei Sdt Proteine (PDZ-GUK), die sowohl die SH3, Hook und GUK Domänen enthalten, nicht miteinander interagieren, deutet darauf hin, dass es auch eine intramolekulare Bindung zwischen SH3 und GUK Domäne gibt. Die intramolekulare Bindung scheint dabei bevorzugt ausgebildet zu werden, da das Protein PDZ-GUK schwächer an Sdt GUK-Hook bindet als die SH3 Domäne. Die inter- und intramolekulare Bindungen zwischen SH3 und GUK Domäne sind in hMPP5 konserviert (Kantardzhieva, et al., 2005).

In Kristallstruktur-Analysen konnte gezeigt werden, dass SH3 und die GUK Domänen von PSD-95 zusammen mit flankierenden Regionen eine integrierte strukturelle Einheit bilden. Anhand von strukturellen und biochemischen Studien wurde ein Modell für die SH3-GUK Interaktion vorgeschlagen. So entstehen die SH3-GUK Bindungen durch einen als dreidimensionales *swapping* bezeichneten Mechanismus, in dem komplementäre Strukturen verschiedener Polypeptidketten kreuzreagieren, um Dimere oder Oligomere zu bilden. Das Modell schliesst einen Mechanismus ein, in dem Ligandenbindung die Bildung von MAGUK Signalnetzwerken reguliert (McGee et al., 2001). Ob die inter- und intra-molekularen Bindungen zwischen Sdt auch *in vivo* stattfinden ist noch nicht geklärt und sollte in zukünftigen Experimenten näher analysiert werden. Diese Ergebnisse lassen die Annahme zu, dass Sdt in der Bildung eines Multiprotein-Netzwerks involviert sein könnte.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Regulation von Crb und *DaPKC* an der Plasmamembran durch *Avl* (Avalanche), ein Protein der Syntaxin-Familie, erfolgt. Bei einem Verlust von *avl* können einige Proteine der apikalen Plasmamembran nicht in Endosomen gelangen und zu einer Degradation in Lysosomen transportiert werden. Apikale Proteine wie Crb, *DaPKC* und Notch reichern sich an der Membran an und werden nach basolateral verteilt (Lu und Bilder, 2005), vergleichbar mit der Überexpression von Crb (Wodarz et al., 1993). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Crb in der apikalen Region durch *Avl* internalisiert wird, um eine balancierte apiko-basale Polarität zu erhalten (Lu und Bilder, 2005).

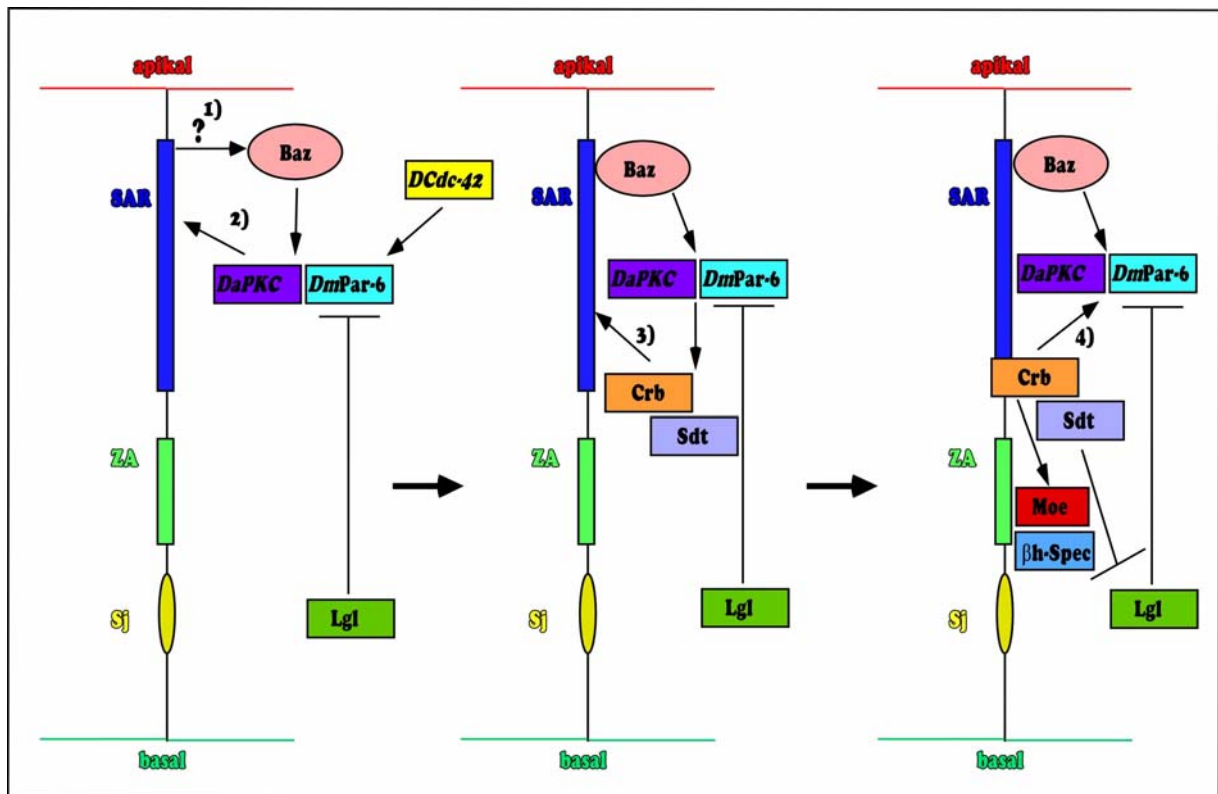


Abb. 4.2 Modell der Interaktionen der Crb und Baz Komplexe

1) Durch ein bisher unbekanntes Signal wird Baz während der Zellularisierung an die Plasmamembran rekrutiert. 2) Kurz nach der Gastrulation erfolgt die Lokalisation von DaPKC und DmPar-6 in der subapikalen Region in Abhängigkeit von der Aktivierung durch DCdc-42 und der inhibierenden Wirkung von Lgl. 3) Die Lokalisation von Crb und Sdt an der Membran ist abhängig von DmPar-6 und DaPKC. 4) Nach der Rekrutierung an der Plasmamembran sind Sdt und Crb für die Stabilität von DaPKC und DmPar-6 notwendig, indem sie über D-Moe und β -H-Spektrin die Verbindung zum Spektrin-Aktin-Membranskelett herstellen.

4.2 Struktur-Funktions-Analyse von Stardust

Während der Embryogenese sind sowohl Sdt als auch Crb für die Aufrechterhaltung apiko-basaler Polarität und die Bildung der ZA in ektodermalen Epithelien notwendig (Tepass und Knust, 1993; Bachmann et al., 2001; Bilder et al., 2003, Tanentzapf und Tepass, 2003). Während der Augen-Entwicklung sind sie essentiell für die Morphogenese der Photorezeptorzellen (Hong et al., 2003; Berger, 2005; Nam und Choi, 2003). Beide Proteine sind in Prozesse involviert, welche die lichtabhängige retinale Degeneration verhindern (Johnson et al., 2002; Berger, 2005).

Um ein tieferes Verständnis für die Funktion von Sdt während der Epithelentwicklung in der Embryogenese von *Drosophila* zu erhalten, wurde eine Struktur-Funktions-Analyse von verschiedenen Regionen des Sdt Proteins durchgeführt (Abb. 3.18). Das Ziel dieser

Untersuchungen war es, herauszufinden, ob die Überexpression von verkürzten Sdt Proteinen, der Sdt-MAGUK Isoform, der Sdt-B Isoform sowie von hMPP5 zu embryonaler Letalität und dominanten Phänotypen führt, wie es für einen seiner Bindungspartner, Crb und dessen humanes Homolog, hCRB1, beschrieben wurde (Wodarz et al., 1995; Klebes und Knust, 2000). Außerdem sollte die Region von Sdt-MAGUK isoliert werden, die für seine subapikale Lokalisation in embryonalen Epithelien verantwortlich ist. Des Weiteren wurde untersucht, welche Region von Sdt für eine Abschwächung/ partielle Rettung des *sdt* mutanten embryonalen Phänotyps verantwortlich ist und ob hMPP5 in der Lage ist, im *sdt* mutanten Embryo die Funktion des Sdt Proteins zu ersetzen.

4.2.1 Die Lokalisation von Sdt an der Plasmamembran ist abhängig von seinem N-Terminus oder der L27C Domäne

Sdt lokalisiert als ein Mitglied des Crb Komplexes in der subapikalen Region der Plasmamembran von ektodermalen Epithelien.

In immunohistochemischen Färbungen an Embryonen wurde die subzelluläre Verteilung der überexprimierten transgen-kodierten Sdt Proteine oder von hMPP5 verfolgt. Eine ausschließlich subapikale Lokalisation in der Epidermis konnte mit keinem der untersuchten Sdt Proteine oder von hMPP5 beobachtet werden. Einige Sdt Varianten konnten zwar an der Membran nachgewiesen werden, jedoch waren sie entlang der gesamten Plasmamembran verteilt. Dieses Ergebnis lässt sich dadurch erklären, dass aufgrund der Überexpression von Sdt zuviel Protein in der Zelle vorlag, welches daher nicht mehr korrekt lokalisiert werden konnte. Wird Crb z.B. mit einem schwachen Aktivator überexprimiert, lokalisiert das Protein subapikal. Bei der Verwendung eines stärkeren Aktivators verteilt sich Crb entlang der gesamten Plasmamembran (Wodarz, 1993). Daher sollten zukünftig für eine genauere subzelluläre Verteilung der transgen-kodierten Sdt Proteine zusätzliche Aktivator-Linien verwendet werden. Dennoch konnten durch die immunohistochemischen Analysen der Sdt Varianten Aussagen über eine Lokalisation an der Plasmamembran gemacht werden.

Dabei zeigte sich, dass für die Lokalisation an der Plasmamembran von Sdt zwei alternative Mechanismen existieren. Sowohl der N-Terminus mit der ECR1 Domäne als auch eine Region, der die ECR1 Domäne fehlt, die dafür aber die L27C besitzt, können diese transgen-kodierten Sdt Proteine an die Plasmamembran rekrutieren. Da die verkürzte Sdt Variante PDZ-GUK nicht an der Plasmamembran lokalisiert, deuten diese Analysen darauf hin, dass neben dem N-Terminus die L27C in eine Lokalisation von Sdt an der Membran involviert ist

(Abb. 4.3). Die ECR1 Domäne kann an *DmPar-6* binden (Wang et al., 2004) und die L27C Domäne an *DLin-7* (Bachmann et al., 2004). Allerdings ist die Lokalisation von Sdt in Embryonen, die mutant für *DLin-7* sind, nicht betroffen (Bachmann, mündliche Mitteilung), was vermuten lässt, dass ein anderes Protein, das an die L27C Domäne bindet, für die Lokalisation von Sdt verantwortlich ist. Ob *DmPar-6* für die Lokalisation von Sdt erforderlich ist, sollte in zukünftigen Experimenten durch Analyse von Sdt in Keimbahnklon-Embryonen untersucht werden.

Struktur-Funktionsanalysen von Sdt Varianten in Photorezeptorzellen im adulten Auge konnten zeigen, dass für eine Membranlokalisation die L27C Domäne von Sdt ebenfalls essentiell ist (Bulgakova, unveröffentlichte Daten). Allerdings reicht die N-terminale Region in den Photorezeptorzellen nicht aus, um Sdt an der Membran zu lokalisieren. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass alternative Mechanismen existieren, um Sdt in unterschiedlichen Geweben zu lokalisieren. PALS1 wird im Gegensatz zu Sdt über die L27 Domäne, die eine Bindestelle für PATJ darstellt, an die Plasmamembran rekrutiert (Roh et al., 2002).

Neben den transgen-kodierten Sdt Proteinen PDZ-GUK lokalisieren auch die kleineren Domänen wie PDZ, SH3, GUK-Hook ebenfalls nicht an der Membran, sondern sind im Zytoplasma verteilt. Daraus ergibt sich, dass das PDZ- Bindemotiv, das eine Bindestelle für Crb darstellt, für die Rekrutierung von Sdt an der Plasmamembran embryonaler Epithelien nicht ausreichend ist. Außerdem scheinen die Sdt Varianten SH3 und GUK-Hook, die in Hefe-Zwei-Hybrid Analysen eine sehr hohe Bindungsaffinität zeigten, nicht an das endogene Sdt Protein zu binden, da diese transgen-kodierten Sdt Proteine sonst an der Membran lokalisieren würden. Allerdings darf nicht vergessen werden, dass bei diesen Lokalisationsanalysen das endogene Sdt vorhanden ist. Es ist also nicht auszuschließen, dass das endogen vorhandene Sdt durch die Bindung an Crb an die Plasmamembran gelangt oder durch intra- und intermolekulare Bindungen mit endogenen Sdt Molekülen gesättigt ist. Um diese Möglichkeit auszuschließen, sollten die Lokalisationsanalysen im *sdt^{EH681}* mutanten Hintergrund wiederholt werden.

Die Annahme, dass die Verteilung von Sdt an die Plasmamembran unabhängig von Crb erfolgt, wird durch ein Ergebnis aus Lokalisationsanalysen von PALS1 in MDCK Zellen bestätigt. Ein transgen-kodiertes PALS1 Protein, das die Regionen PDZ-GUK umfasst und mit der PDZ Domäne das Bindemotiv für CRB-1 enthält, ist ebenfalls nicht in der Lage, PALS1 an die Membran zu rekrutieren. Für die Lokalisation von PALS1 an die Membran ist die L27N Domäne erforderlich (Roh et al., 2002). Für die beiden MAGUK Proteine der DLG-

Familie PSD-95 und SAP97 konnte ebenfalls gezeigt werden, dass ihr N-Terminus für die Lokalisierung in Zell-Kontakt-Strukturen von Epithelien notwendig ist (Wu et al., 1998; Craven et al., 1999; Kim et al., 1996; Topinka et al., 1998). In *Drosophila* hingegen lokalisiert Dlg über seine Hook Domäne an die Plasmamembran von Imaginalscheiben. Die Beschränkung an die *septate junctions* wird durch seine zweite PDZ Domäne gewährleistet (Hough et al., 1997). Isoformen von Dlg, die einen SAP97- ähnlichen N-Terminus (Dlg-S97) aufweisen, sind an den neuromuskulären Verbindungsstrukturen in Imaginalscheiben exprimiert aber nicht in Epithelien (Mendoza et al., 2003). Die Lokalisation von Dlg-S97 erfolgt ebenfalls über seinen N-Terminus an die Synapsen von neuromuskulären Verbindungsstrukturen (Thomas et al., 2000).

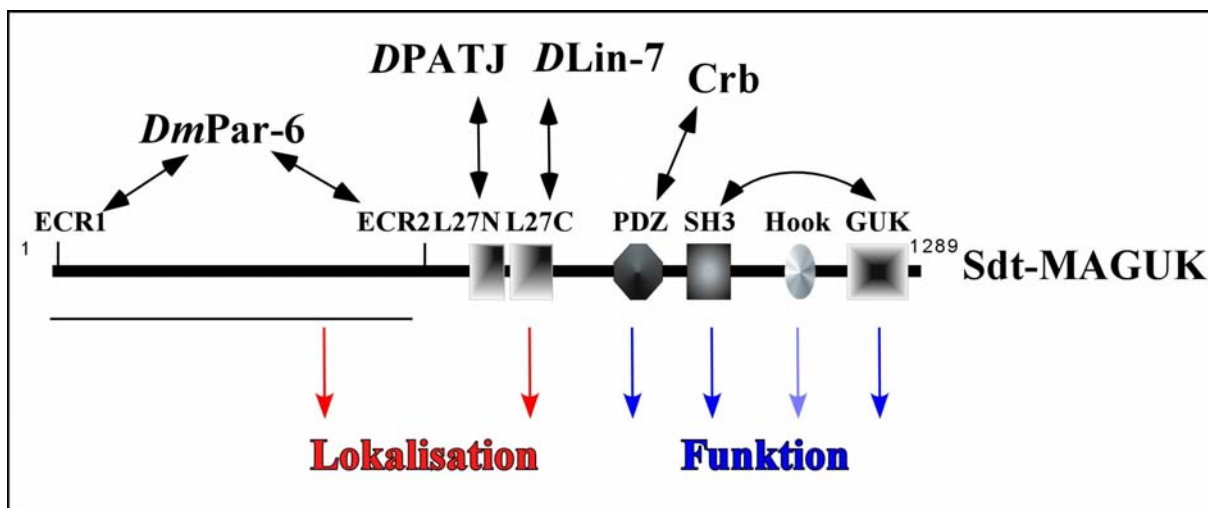


Abb. 4.3 Die Domänen von Sdt, die für seine Lokalisation und Funktion in Bezug auf Zellpolarität wichtig sind

Der N-Terminus von Sdt, der die ECR1 Domäne enthält und die L27C Domäne sind für die Lokalisation von Sdt an der Plasmamembran verantwortlich. Für die Funktion in Bezug auf die Wiederherstellung der Zellpolarität in Rettungsexperimenten sind die PDZ, SH3 und GUK Domäne essentiell, da ein Verlust dieser Domänen den *sdt* mutanten embryonalen Phänotyp nicht abschwächt. Die Hook Domäne ist ebenfalls wichtig für die Sdt Funktion, schwächt den *sdt* mutanten embryonalen Phänotyp hingegen in geringem Masse ab. Mögliche Interaktionen zwischen DmPar-6, DPATJ, Dlin-7 und Crb sowie Sdt mit den jeweiligen Domänen von Sdt sind mit Doppelpfeilen gekennzeichnet.

4.2.2 Für die Aufrechterhaltung der Zellpolarität sind die PDZ, SH3 und GUK Domänen von Sdt essentiell

Die Rettungsexperimente in *sdt^{EH681}* mutanten Embryonen durch die Überexpression verschiedener Sdt Varianten und hMPP5 konnten zeigen, dass einige Domänen von Sdt wichtig sind, um den *sdt^{EH681}* mutanten embryonalen Phänotyp abzuschwächen.

So führt der Einzelverlust der PDZ, SH3 oder GUK Domäne zu keiner Abschwächung des mutanten Phänotyps. Im Gegensatz dazu führt die Überexpression der Sdt-MAGUK und Sdt-B Isoform sowie den verkürzten Proteinen Sdt Δ L27C und Sdt Δ 1-L27N jeweils zu einer partiellen Wiederherstellung der Zellpolarität in ektodermalen Epithelien, was an einer zusammenhängenden Kutikula zu erkennen ist. Der Verlust der Hook Region führt zu einer weniger ausgeprägten Abschwächung, es sind nur sehr wenige Bereiche zusammenhängender Kutikula-Schilde zu sehen.

Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass die PDZ, SH3 und GUK Domänen essentiell für die Aufrechterhaltung der Zellpolarität in embryonalen Epithelien sind. Allerdings reicht die Überexpression des transgen-kodierten Sdt Proteins PDZ-GUK nicht aus, um die Zellpolarität in ektodermalen Epithelien wiederherzustellen. Dieses Ergebnis kann dadurch begründet werden, dass die Abschwächung des *sdt* mutanten Phänotyps mit einer Membranlokalisation der untersuchten Sdt Proteine korreliert. Sdt Varianten, die neben den PDZ-GUK Domänen entweder die L27C Domäne (Sdt Δ 1-L27N) oder den N-Terminus (Sdt Δ L27C) enthalten, lokalisieren an der Membran und sind in der Lage, den *sdt* mutanten Phänotyp teilweise abzuschwächen. Die Hook Region von Sdt scheint eine unterstützende Funktion in Bezug auf die Aufrechterhaltung der Zellpolarität zu haben. Die Sdt-B Isoform führt ebenfalls zu einer Abschwächung des *sdt*^{EH681} mutanten embryonalen Phänotyps. Dies stellt eine besondere Situation dar, da in diesen mutanten Embryonen die Sdt-B Isoform nicht betroffen ist (Abb. 1.4). Scheinbar kann eine Überexpression dieser Isoform die fehlende Funktion der Sdt-MAGUK Isoform ersetzen.

Für Dlg konnte gezeigt werden, dass die (zweite und dritte) PDZ sowie die SH3 und Hook Domänen ebenfalls funktionell wichtig sind. Sie sind für Regulation des Größenwachstums in Imaginalscheiben notwendig (Hough et al., 1997).

4.2.3 Die Überexpression von Sdt führt zu dominanten Effekten

Während der Embryogenese führt die Überexpression von verschiedenen Sdt Varianten in unterschiedlicher Penetranz zu embryonaler Letalität (Zusammenfassung s. Abb. 3.29). Die variable Penetranz könnte dadurch erklärt werden, dass einige transgene Linien verschiedene Mengen an Sdt exprimieren. Eine andere Erklärung wäre, dass durch die Deletion einiger Domänen ein Protein entstehen könnte, das einen stärkeren dominanten Effekt ausübt. In zukünftigen Versuchen sollten anhand von Westernblots die exprimierten Proteinmengen verglichen werden. Alle transgen-kodierten Sdt Proteine, die zu embryonaler Letalität führen,

haben bis auf das Sdt1-L27N Defekte während des dorsalen Schlusses und der Kopfinvolution. Des Weiteren tritt ein Phänotyp auf, in dem der Embryo die Eihülle nicht vollständig ausfüllt, was auf Defekte während des Keimstreifrückzugs oder vermehrte Apoptose hindeutet. Durch Markierung der apoptotischen Zellen mit dem Farbstoff *Acridin Orange* und einem Vergleich zwischen überexprimierenden Embryonen und Wildtyp sollte zukünftig überprüft werden, ob in überexprimierenden Embryonen vermehrt Zelltod stattfindet.

Eine Ausnahme bildet die Region Sdt1-L27N, deren Überexpression bis auf den dorsalen Schluss-Phänotyp ebenfalls zu den bereits beschriebenen Effekten führt. Aufgrund der durchgeführten Analysen kann geschlossen werden, dass Sdt1-L27C ausreicht, um alle drei Phänotyp-Gruppen auszuprägen. Alle transgen-kodierten Sdt Proteine, die dominante embryonale Phänotypen hervorrufen, haben zwei gemeinsame Eigenschaften. Erstens lokalisieren sie an der Membran und zweitens sind sie in der Lage DPATJ fehlzuverteilen. Dies zeigt, dass DPATJ eine mögliche Rolle bei der Entstehung der dominanten Phänotypen ausübt. Interessanterweise ist die Sdt Variante Sdt Δ 1-L27N auch in der Lage DPATJ fehlzuverteilen, obwohl in diesem Protein die L27N Domäne, die Binderegion für DPATJ, deletiert ist. Dies kann dadurch erklärt werden, dass dieses verkürzte Protein über einen anderen Partner an DPATJ bindet. Z.B. könnte die Deletion der L27N Domäne eine Konformationsänderung des restlichen Proteins bewirken, welches in der Lage wäre, das endogene Sdt Protein fehlzuverteilen, das wiederum an DPATJ binden könnte. Mit den im Embryo funktionierenden Antikörpern war es nicht möglich, die Lokalisation des transgen-kodierten Proteins von dem endogen exprimierten Sdt Protein zu unterscheiden.

Ähnliche Phänotypen mit dorsalen Schluss- und Kopfdefekten werden durch die Überexpression von Crb in Embryonen erhalten (Wodarz, 1993). Die Defekte im dorsalen Schluss können als Folge der Überexpression von Crb und Sdt in der Amnioserosa erklärt werden. Die Amnioserosa ist ein Gewebe, das empfindlich auf die Überexpression von Crb und Sdt reagiert. Sie unterscheidet sich von anderen ektodermalen Epithelien darin, dass sie etwa im Stadium 15 - 16 ihre Epithelstruktur verliert und anschließend in einzelne Zellen zerfällt. Diese Zellen werden daraufhin internalisiert und sind vermutlich an der Bildung des Dorsalgefäßes beteiligt (Campos-Ortega und Hartenstein, 1985). In Wildtyp Embryonen endet die Expression von Crb und Sdt in diesem Stadium. Es ist daher denkbar, dass das Ende der Crb und Sdt Expression eine Voraussetzung dafür ist, dass die Amnioserosa ihre Epithelstruktur verliert und anschließend internalisiert werden kann. In diesem Fall würde durch die weiter andauernde Expression von Crb sowie Sdt der Zerfall des Epithelverbandes

verhindert und die Amnioserosa als Epithel erhalten bleiben. Dies hätte zur Folge, dass die nach dorsal wandernden Regionen der Epidermis nicht miteinander in Kontakt kämen, wodurch der dorsale Schluss verhindert würde. Schon eine schwache Expression von Crb führt zu Effekten in der Amnioserosa, was durch die Aufrechterhaltung der Crb Expression zu erklären wäre (Wodarz, 1993). Eine schwache Expression von Sdt mit Hilfe des Aktivators Gal4^{pan} in der Amnioserosa führt hingegen zu keinen Effekten.

Ein weiterer grundlegender Unterschied zwischen den Effekten der Crb und Sdt/hMPP5 Überexpression ist, dass Crb mit der Aktivatorlinie Gal4^{daG32} zu grundlegenden Veränderungen der Zellform und einer Desorganisation der epithelialen Gewebestruktur (Wodarz, 1993) führt. Dies hat zur Folge, dass das Epithel mehrschichtig wird und apikale Proteine umverteilt werden (Wodarz et al., 1995; Klebes und Knust, 2000).

Diese starken Defekte wurden durch die Überexpression von transgen-kodierten Sdt Proteinen mit dem Gal4^{daG32} Aktivator nicht erzielt. Mit Hilfe einer maternalen Aktivatorlinie Gal4^{mat15; mat16} treten zwar stärkere Defekte in der Kutikula auf, es sind größere Löcher in der dorsalen Kutikula zu sehen, jedoch ist die epitheliale Gewebestruktur der Epithelien nicht betroffen. Die Überexpression einiger Sdt Varianten führt aufgrund der beobachteten dominanten Phänotypen zu einer erhöhten embryonalen Sterberate (Zusammenfassung Abb. 3.29). Die höchsten Sterberaten werden mit Sdt1-L27C und SdtASH3-Hook mit dem Aktivator Gal4^{daG32} mit einer Penetranz zwischen 61 und 74 % erzielt.

Im Gegensatz dazu führt die Überexpression von Crb (Effektorlinie Crb^{30.2.e}, Wodarz, 1993) mit derselben Aktivatorlinie zu einer 100 %-igen Letalität in Embryonen (Wodarz, 1993). Die Überexpressions-Phänotypen von Sdt sind somit deutlich schwächer als die für Crb beschriebenen. Dies kann auf eine andere funktionelle Bedeutung aber auch auf eine differentielle Regulation des Proteins hin deuten.

Eine weitere Erklärung wäre, dass wenig Sdt Protein ausreicht, um die Bindungsstellen von Crb zu sättigen, und eine höhere Protein-Konzentration von Sdt zu keinen Defekten in der Zellpolarität führt. Das würde bedeuten, dass Sdt ein in geringen Konzentrationen wirkendes Molekül darstellt. Für PALS1 konnte diese Annahme anhand von siRNA Experimenten in MDCK Zellen bestätigt werden, da geringe Mengen an PALS1 nach einem Ca²⁺-switch für die Organisation der *tight junctions* ausreichen (Straight et al., 2004).

4.2.4 Die Überexpression von Sdt führt zu dominant aktiven und negativen Effekten während der Ontogenese von *Drosophila*

In Überexpressionsanalysen von Sdt treten dominante embryonale Phänotypen auf. Jedoch konnten im Embryo keine Aussagen darüber getroffen werden, ob diese durch dominant aktive oder negative Auswirkungen zustande kommen. Um diese Frage zu klären, wurde untersucht, ob die Überexpression von Sdt Einfluss auf die Lebensfähigkeit von Fliegen hat, die nur eine intakte Kopie von *sdt* besitzen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass die Deletionsvarianten Sdt Δ SH3-Hook(2), Sdt Δ SH3-GUK(1,2) und Sdt Δ 1-L27N(2) vermutlich zu dominant negativen Effekten führen. Das bedeutet, dass die Überexpression eines dieser Proteine wie eine Verlust-Mutation von *sdt* wirkt.

Im Gegensatz dazu lassen die Ergebnisse dieser Arbeit vermuten, dass Sdt-GUK(1,2), Sdt-MAGUK(2), Sdt Δ 1-L27N, Sdt Δ 1-L27C(2), Sdt Δ PDZ(2) und Sdt Δ Hook(1) nach Überexpression dominant aktiv wirken. Das heisst, sie verhalten sich wie Funktionsgewinn-Mutationen. Dieser Effekt kann durch eine Überfunktion des Proteins erklärt werden, die entweder durch eine aktivere Form oder eine erhöhte Menge des Proteins zustande kommt. Anhand der erhaltenen Ergebnisse ist anzunehmen, dass durch die Überexpression von Sdt sowohl dominant negative als auch dominant aktive Auswirkungen im Hintergrund des Verlustes einer Kopie von *sdt* stattfinden können. Die transgen-kodierten Sdt Varianten, die dominant aktive und negative Effekte während der Ontogenese zeigen, zeigen alle dieselben embryonalen Phänotypen.

Die Überexpression von Sdt Δ SH3-Hook(1) führt zu einer drastischen Reduzierung lebensfähiger Fliegen. Die Ursachen für die erhöhte Sterberate der adulten Tiere sind noch nicht verstanden und sollten zukünftig in weiteren Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten der Ontogenese analysiert werden.

4.2.5 hMPP5 rettet den *sdt* mutanten Phänotypen nicht

Mutationen hCRB1 Gen führen zu schweren retinalen Dystrophien, die von Retinitis Pigmentosa (RP12) bis zur Leberschen kongenitale Amaurose reichen (den Hollander et al., 2001). Retinitis pigmentosa (RP) ist das bekannteste und häufigste Krankheitsbild der hereditären Netzhaut-Aderhautdystrophien. Unter diesem Namen ist eine heterogene Gruppe von Erkrankungen mit verschiedenen Erbgängen und multiplen zugrundeliegenden Genmutationen in verschiedenen Genen zusammengefasst. Die Lebersche kongenitale

Amaurose umfasst eine heterogene Gruppe von Netzhaut-Aderhautdystrophien, bei denen bereits im ersten Lebensjahr eine schwere Sehbeeinträchtigung vorliegt (den Hollander et al., 2001).

CRB1 und *Drosophila* Crb sind bezüglich ihrer zytoplasmatischen Domäne zu 71 % ähnlich. Innerhalb dieser Region gibt es sehr hoch konservierte Bereiche, wie z. B. das PDZ Bindemotiv ERLI oder die FERM-Bindestelle, die für die Funktion von Crb notwendig sind. Rettungs- und Überexpressionsanalysen konnten zeigen, dass die zytoplasmatische Region der beiden Homologe funktionell verwandt ist (den Hollander, et al., 2001). Ebenfalls konnte eine Funktion von Crumbs, Sdt und auch DPATJ in der Prävention lichtabhängiger retinaler Degeneration gezeigt werden (Johnson et al., 2002, Berger, 2005; Richard et al., 2005). In Mutanten von *nagie oko* des *sdt* Homologen im Zebrabaerbling wurden ebenfalls schwere Defekte in der Organisation der retinalen Zellschichten beobachtet (Wei et al., 2002). Im *Drosophila* Auge zeigt der Verlust von *sdt* einen Augenphänotyp, der zu einem verkürzten Rhabdomerstiel und einer veränderten Morphologie der Rhabdomere führt, und dem *crb* mutanten Augen-Phänotyp ähnelt (Izadost et al, 2002; Pellika et al., 2002; Hong et al, 2003; Berger, 2005).

Sdt besitzt ebenfalls ein humanes Homolog (hMPP5). Das MAGUK Protein hMPP5 ist eines der sieben *membrane palmitoylated protein* (MPP) Proteine in Säugern. Der Konservierungsgrad zwischen Sdt und hMPP5, bezogen auf die gesamte Proteinsequenz, beträgt 23 %, jedoch sind die MAGUK Domänen viel stärker konserviert und ähneln sich zu 73-67 % (Abb. 1.5), (Kantardzhieva et al., 2005).

Um herauszufinden, ob beide Proteine funktionell verwandt sind, wurden Überexpressions- und Rettungsexperimente mit hMPP5 im *Drosophila* Embryo durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von hMPP5 weder zu einer erhöhten Letalität noch zu dominanten Phänotypen führt. Ebenfalls war hMPP5 nicht in der Lage, an der Plasmamembran von ektodermalen Epithelien von *Drosophila* zu lokalisieren. Außerdem konnte der *sdt* mutante Phänotyp mit hMPP5 nicht abgeschwächt werden.

Somit ist anzunehmen, dass hMPP5 und Sdt während der Embryogenese nicht funktionell verwandt sind. Durch die Struktur-Funktions-Analyse von Sdt wurde gezeigt, dass die partielle Abschwächung des *sdt* mutanten embryonalen Phänotyps nur bei Proteinen möglich war, die an der Membran lokalisierten. Die L27N Domäne von PALS1, die eine Bindestelle für PATJ darstellt, ist für eine Membranlokalisation essentiell (Roh et al., 2002). Diese Bindung ist zwar in *Drosophila* ebenfalls konserviert, jedoch kann Sdt nicht an PATJ und PALS1 nicht an DPATJ binden. Die fehlende Lokalisation von hMPP5 an der Membran in

Drosophila Epithelien kann daran liegen, dass seine Rekrutierung über PATJ notwendig ist und nicht durch DPATJ zu erreichen ist.

4.3 Ausblick

Um ein besseres Verständnis von der Bedeutung der Wechselwirkungen zwischen den Baz und Crb Komplexen im Hinblick auf die Etablierung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität in Epithelien zu erhalten, wäre es sinnvoll, die in dieser Arbeit gefundenen Interaktionen durch Ko-Immunoprecipitationen zu ergänzen. Dabei wäre es interessant zu erfahren, ob die Wechselwirkungen zu verschiedenen Zeitpunkten der *Drosophila* Entwicklung (z.B. in Embryonen, Larven und adulte Tieren) stattfinden können.

Die Struktur-Funktions-Analysen von Sdt sollte durch Quantifizierung der Proteinmengen der exprimierten transgen-kodierten Sdt Varianten vervollständigt werden, um herauszufinden, ob die dominanten embryonalen Phänotypen durch eine erhöhte Proteinexpression entstehen. Da die Proteine unter den verwendeten Bedingungen nicht im Westernblot nachzuweisen waren, könnte es sich als hilfreich erweisen, die Sdt Proteine über Flag-Säulen bzw. HA-Säulen aufzureinigen.

Des Weiteren sollte unter Verwendung anderer Aktivatorlinien eine genauere Lokalisationsanalyse von Sdt durchgeführt werden, um herauszufinden, welche Region für seine Rekrutierung an die subapikale Region der Plasmamembran verantwortlich ist. Ebenfalls sollte die Lokalisationsanalyse auch im *sdt* mutanten Hintergrund durchgeführt werden, damit eine mögliche Einflußnahme des endogenen Sdt Proteins ausgeschlossen werden kann. Die in Hefe-Zwei-Hybrid Analysen gefundene Interaktion zwischen den SH3 und GUK-Hook Regionen von Sdt konnten durch Überexpressionsversuche im Embryo nicht verifiziert werden. Allerdings könnte es sein, dass diese Interaktion in anderen Geweben stattfindet, deshalb sollte diese Bindung auch in larvalen oder adulten Stadien untersucht werden. Die Überexpression von Sdt Δ SH3-Hook(1) resultiert in einer reduzierten Anzahl von Nachkommen. Deshalb sollte zu verschiedenen Zeitpunkten der Ontogenese analysiert werden, welche Entwicklungsprozesse gestört sind.

5 Zusammenfassung:

Der Crumbs und der Bazooka Komplex sind für die apiko-basale Polarität in ektodermalen Epithelien während der Embryogenese von *Drosophila melanogaster* von essentieller Bedeutung. Genetische Wechselwirkungen und ihre Kolokalisation in der subapikalen Region von Epithelien liessen vermuten, dass Bestandteile beider Komplexe auch in direkte Interaktionen involviert sein könnten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher analysiert, ob molekulare Wechselwirkungen zwischen Komponenten beider Komplexe stattfinden. Dafür wurden die Komponenten des Bazooka Komplexes, Bazooka, *DmPar-6* und *DaPKC*, zunächst mit Mitgliedern des Crumbs Komplexes, Crumbs, Stardust und *DPATJ*, im Hefe-Zwei-Hybrid System auf Interaktion hin untersucht. Es ließen sich direkte Interaktionen zwischen Crumbs und *DmPar-6* sowie zwischen Stardust und *DmPar-6* nachweisen und durch GST-Pulldown Experimente verifizieren. Überexpressionsstudien und die Analysen von Mutanten ergaben schließlich, dass die Lokalisation von Crumbs und *DmPar-6* jeweils voneinander abhängt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Funktion von *DmPar-6* für die anfängliche subapikale Lokalisation von Crumbs an der Plasmamembran wichtig ist und dass Stardust und Crumbs später in der Stabilisierung von *DmPar-6* wirken können.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand in einer Struktur-Funktions-Analyse von Stardust, das zu der Familie der MAGUK (Membrane Associated Guanylate Kinase) Proteine gehört, deren Mitglieder Multiproteinkomplexe aus Signal- und Zytoskelettmolekülen an Zell-Zell-Kontakten bilden können. Hierbei galt es, den einzelnen Domänen Funktionen bezüglich der Lokalisierung an der Plasmamembran und Aufrechterhaltung der Zellpolarität in embryonalen Epithelien von *Drosophila* zuzuordnen. Transgen-kodierte Stardust Protein-Varianten, denen einzelne oder mehrere Protein-Protein-Interaktionsdomänen fehlen, wurden hierzu im wildtypischen und *sdt* mutanten Hintergrund im *Drosophila* Embryo überexprimiert. Die Überexpressionsanalysen dieser modifizierten Stardust Proteine ergaben, dass der N-Terminus mit der ECR1 (Evolutionary Conserved Region) Domäne sowie die C-terminale L27 (Lin-2/Lin7 Binding Motif) Domäne unabhängig voneinander in der Lage sind, Sdt an der Plasmamembran zu lokalisieren. Rettungsexperimente in *sdt*^{EH681} mutanten Embryonen konnten weiterhin zeigen, dass das menschliche Homolog von Sdt (hMPP5) die Funktion von Stardust nicht ersetzen kann und dass die PDZ, die SH3 und die GUK Domäne jeweils für die Aufrechterhaltung der Zellpolarität wichtig ist. Eine Lokalisierung an der Plasmamembran von Sdt scheint dabei eine Voraussetzung für die Funktion von Sdt in der Zellpolarität zu sein.

6 Literatur

Aberle, H., Schwartz, H., Kemler, R. (1996) Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J. Cell. Biochem.* 61, 514-23.

Alloisio, N., Venezia, N.D., Rana, A., Andrabi, K., Texier, P., Gilsanz, F., Cartron, J-P., Delaunay, J., Chishti, A.H. (1993). Evidence that red blood cell protein: p55 may participate in the skeleton-membrane linkage that involves protein 4.1 and glycophorin C. *Blood* 82, 1323-13237.

Ashburner, M. (1989) *Drosophila*, A laboratory handbook. Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York.

Bachmann, A. (2000). Die Kontrolle von Morphogenese und Zellpolarität in Epithelien von *Drosophila melanogaster*. In "Institut für Genetik". Heinrich Heine Universität. Inaugural-Dissertation. Düsseldorf.

Bachmann, A., Schneider, M., Theilenberg, E., Knust, E. (2001) *Drosophila* Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity. *Nature* 414, 638-643.

Bachmann A., Timmer M., Sierralta J., Pietrini G., Gundelfinger ED., Knust E., Thomas U. (2004). Cell type-specific recruitment of *Drosophila* Lin-7 to distinct MAGUK-based protein complexes defines novel roles for Sdt and Dlg-S97. *J. Cell. Sci.* 15, 1899-909.

Bennet, V. (1989) The spectrin-actin junction of erythrocyte membrane skeletons. *Bioch. Bioph. Acta* 988, 107-121.

Bennett V, Baines AJ. (2001). Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev.* 81, 1353-92.

Benton, R. and Johnston, D. S. (2003). A conserved oligomerization domain in drosophila Bazooka/PAR-3 is important for apical localization and epithelial polarity. *Curr Biol* 13, 1330-4.

- Berger, S. (2005). Charakterisierung der Funktion von Stardust im Komplex mit von *Drosophila melanogaster*. In "Institut für Genetik". Heinrich Heine Universität. Inaugural-Dissertation. Düsseldorf.
- Betschinger J., Mechtler K., Knoblich J.A. (2003). The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl. *Nature* 402, 326-30.
- Bezprozvanny, I., Maximov, A. (2002). Classification of PDZ domains. *FEBS Lett* 509, 457-62.
- Bhat, M.A., Izaddoost, S., Lu, Y., Cho, K-O., Choi, K-W., Bellen, H.J. (1999). Discs Lost, a Novel Multi-PDZ Domain Protein, Establishes and Maintains Epithelial Polarity. *Cell* 96, 833-845.
- Bilder, D. and Perrimon, N. (2000). The localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ Protein scribble. *Nature* 403, 676-680.
- Bilder, D., Li, M. und Perrimon, N. (2000). Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science*. 289, 113-116.
- Bilder D., Schober M., Perrimon N.(2003). Integrated activity of PDZ protein complexes regulates epithelial polarity. *Nat Cell Biol*. 2003 5, 53-8.
- Bloom, G.S. and Goldstein, L.S.B. (1998). Cruising along microtubule highways: how membranes move through the secretory pathway. *J Cell Biol* 140, 1277-1280.
- 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.
- Brent, R., Russel, L.(1997). Understanding gene and allele function with two-hybrid methods. *Annu.Rev.Genet.* 31, 663-704.
- Bryant, P.J. (1997). Junction Genetics. *Developmental Genetics* 20, 75-90.

Campos-Ortega, J.A. und Hartenstein, V.(1985). The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Springer, Berlin.

Campos-Ortega, J. A. and Hartenstein, V. (1997). The embryonic Development of *Drosophila melanogaster*. Second Edition. BerlinHeidelberg: Springer-Verlag.

Cereijido M., Contreras R.G., Shoshani L.(2004) Cell adhesion, polarity, and epithelia in the dawn of metazoans. *Physiol Rev* 84, 1229-62.

Chishti, A. H., Kim, A. C., Marfatia, S. M., Lutchman, M., Hanspal, M., Jindal, H., Liu, S. C., Low, P. S., Rouleau, G. A., Mohandas, N., Chasis, J. A., Conboy, J. G., Gascard, P., Takakuwa, Y., Huang, S. C., Benz, E. J., Jr., Bretscher, A., Fehon, R. G., Gusella, J. F., Ramesh, V., Solomon, F., Marchesi, V. T., Tsukita, S., Hoover, K. B. und et al. (1998). The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends Biochem Sci* 23, 281-2.

Chou, T.-B. und Perrimon, N. (1992). Use of Yeast site-specific recombinase to produce female germline chimera in *Drosophila*. *Genetics* 131:643-653.

Chou, T.-B. und Perrimon, N. (1996). The Autosomal FLP-DFS Technique for generating Germline Mosaics in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 144: 1673-1679.

Cohen, A.R., Woods, D.F., Marfatia, M.S., Walther, Z., Chishti, A.H. and Anderson, J.M. (1998). Human CASK/LIN-2 Binds Syndecan-2 and Protein 4.1 and localizes to the Basolateral Membrane of Epithelial Cells. *The Journal of Cell Biology* 142 (1), 129-138.

Cohen, B.C., Ren, R., Baltimore, D.(1995). Modular Binding Domains in Signal Transduction Proteins. *Cell* 80, 237-248.

Cole, N.B., Sciaky, N., Marota, A., Song, J. Lippin-Cott-Schwartz, J. (1996). Golgi dispersal during microtubule disruption: regeneration of Golgi stacks at peripheral endoplasmic reticulum exit sites. *Mol Biol Cell* 7, 631-650.

Craven, S.E., El-Husseini A.E., Bredt D.S.(1999) Synaptic targeting of the postsynaptic density protein PSD-95 mediated by lipid and protein motifs. *Neuron* 22, 497-509.

den Hollander, A.I., Johnson, K., de Kok. Y.J., Klebes, A., Brunner, H.G., Knust, E. und Cremers, F.P. (2001). CRB1 has a cytoplasmic domain that is functionally conserved between human and *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 10, 2767-2773.

Dimitratos, D.S., Woods, D.F., Stathakis, D.G. and Bryant, J. P. (1999). Signaling pathways are focused at specialized regions of the plasma membrane by scaffolding proteins of the Maguk family. *Bio Essays* 21, 912-921.

Doe, C.Q. (2001) Cell polarity: the PARty expands. *Nat Cell Biol* 3, 43-49.

Doerks T., Bork P., Kamberov E., Makarova O., Muecke S., and Margolis, B. (2000) L27, a novel heterodimerization domain in receptor targeting proteins Lin-2 and Lin-7. *TIBS* 317-318.

Eaton, S. and Simons, K. (1995). Apical, Basal and Lateral Cues for Ephelial Polarization. *Cell* 82, 5-8.

Egger-Adam, 2005. Identifikation neuer Interaktionspartner des Bazooka Proteins in *Drosophila melanogaster*. In "Institut für Genetik". Heinrich Heine Universität. Inaugural-Dissertation. Düsseldorf.

Engelbert, M. (1997). Genetische Untersuchung zur Kontrolle epithelialer Zellpolarität und funktionelle Analyse der extrazellulären Domäne des Proteins CRUMBS aus *Drosophila melanogaster*. In „Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät“. Universität zu Köln.

Etienne-Manneville S., Hall A. (2001). Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell* 106, 489-98.

Evan G.I, Lewis G.K., Ramsay G., Bishop J.M.(1985). *Mol Cell Biol* 5, 3610-6.

Fanning A.S., Jameson B.J., Jesaitis L.A., Anderson J.M.(1998). The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 273, 29745-53.

Faivre-Sarrailh C., Banerjee S., Li J., Hortsch M., Laval M., Bhat M.A.(2004). *Drosophila* contactin, a homolog of vertebrate contactin, is required for septate junction organization and paracellular barrier function. *Development* 131,4931-42.

Feng, S., Chen, J.K., Yu, H., Simon, A.J., Schreiber, S.L. (1994). Two Binding Orientations for Peptides to the Src SH3 Domain: Development of a general model for SH3-Ligand interactions. *Science* 266, 1241-1247.

Foe, V.E., Odell, G.M., Edgar, B.A.(1993). Mitosis and morphogenesis in the *Drosophila* embryo. In *The development of Drosophila melanogaster*.eds. Bate, M. and Martinez-Arias, A. (Cold Harbor Laboratory Press, 149-300).

Funke L., Dakoji S., Brecht D.S. (2005). Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions. *Annu Rev Biochem* 74, 219-45.

Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S. and Tsukita, S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol.* 123 (6 Pt 2), 1777-88.

Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K. and Tsukita, S. (1998). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol.* 141(7), 1539-50.

Furuse, T., Blizard, D.A., Moriwaki, K., Miura, Y., Yagasaki, K., Shiroishi, T., Koide, T. (2002). Genetic diversity underlying capsaicin intake in the Mishima battery of mouse strains. *Brain Res Bull.* 57(1), 49-55.

Gao, L., Joberty, G. and Macara, I. G. (2002). Assembly of epithelial tight junctions is negatively regulated by Par6. *Curr Biol* 12, 221-5.

- Garcia E.P., Mehta, S., Blair, L.A., Wells, D.G., Shang, J., Fukushima, T., Fallon, J.R.
Garner, C.C., Marshall, J. (1998). SAP90 bins and clusters kainate receptors causing incomplete desensitization. *Neuron* 21, 727-739.
- Garrod, D.R. and Collins, J.E. (1992) Intercellular junctions and cell adhesion in epithelial cells In *Epithelial organization and development* (T.P., ed), 1-52, Chapman & Hall, London.
- Geiger B., Ayalon O. (1992). Cadherins. *Annu Rev Cell Biol* 8, 307-332.
- Golemis, E.A. und Khazak, X. (1994) Alternative yeast two-hybrid system: The interaction trap and interaction mating. *Methods in Molecular Biology*, Kapitel 60
- Golic K.G., Lindquist S.(1989).The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome.59,499-509.
- Grawe, F., Wodarz, A., Lee, B., Knust, E. and Skaer, H. (1996).The *Drosophila* genes crumbs and stardust are involved in the biogenesis of adherens junctions. *Development* 122, 951-959.
- Gumbiner, B.M. (1992). Epithelial Morphogenesis.(1992). *Cell* 69, 385-387.
- Gumbiner, B.M. (1996). Cell Adhesion: The Molecular Basis of Tissue Architecture and Morphogenesis. *Cell* 84, 345-357.
- Han K., Manley J.L.(1993) Functional domains of the *Drosophila* Engrailed protein. *EMBO J* 12, 2723-33.
- Hanahan, D., Jessee, J. und Bloom, F.R. (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol.* 204, 63-113.
- Harris, B.Z. and Lim, W.A. (2001) Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *Journal of Cell Science* 114, 3219-3231.

Harris, T. J. and Peifer, M. (2004). Adherens junction-dependent and -independent steps in the establishment of epithelial cell polarity in *Drosophila*. *J Cell Biol* 167, 135-47.

Hartsch, M., Ratel, N. H., Bieber, A. J., Tarquina, Z. R. und Goodman, C. S. (1990). *Drosophila* neurotactin, a surface glycoprotein with homology to serine esterases, is dynamically expressed during embryogenesis. *Development* 110:1327-1340.

Henrique D., Schweisguth F. (2003) Cell polarity: the ups and downs of the Par6/aPKC complex. *Curr Opin Genet Dev* 13, 341-50.

Hong, Y., Stronach, B., Perrimon, N., Jan, L.Y., Jan, Y.N. (2001) *Drosophila* Stardust interacts with Crumbs to control polarity of epithelia but not neuroblasts. *Nature* 414, 634-638.

Hong, Y., Ackerman, L., Jan, L. Y. und Jan, Y. N. (2003). Distinct roles of Bazooka and Stardust in the specification of *Drosophila* photoreceptor membrane architecture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12712-7.

Hough, C.D., Woods, D.F., Park, S. and Bryant, J.P. (1997). Organizing a functional junctional complex requires specific domains of the *Drosophila* MAGUK Discs large. *Genes & Development* 11, 3242-3253.

Hsueh, Y.P., Wang, T.F., Yang, F.C., Sheng, M. (2000). Nuclear translocation and transcription regulation by the membrane-associated guanylate kinase CASK/LIN-2. *Nature* 298-302.

Hurd, T. W., Gao, L., Roh, M. H., Macara, I. G. und Margolis, B. (2003). Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. *Nat Cell Biol* 5, 137-142.

Hutterer, A., Betschinger, J., Petronczki, M. and Knoblich, J. A. (2004). Sequential roles of Cdc42, Par-6, aPKC, and Lgl in the establishment of epithelial polarity during *Drosophila* embryogenesis. *Dev Cell* 6, 845-54.

Hynes, R. O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11-25.

Itoh M, Furuse M, Morita K, et al. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol.* 1999;147:1351–1363.

Izaddoost, S., Nam, S.-C. Bhat, M.A., Bellen, H.J. und Choi, K.W. (2002). *Drosophila* Crumbs is a positional cue in photoreceptor adherens junctions and rhabdomers. *Nature.* 416, 178-183.

James, P., Halladay, J. und Craig, E.A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient Two-Hybrid selection in yeast. *Genetics* 144: 1425-36

Joberty, G., Petersen, C., Gao, L. und Macara, I. G. (2000). The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat Cell Biol* 2, 531-9.

Johnson, M.H. et al. (1986) The role of cell adhesion in the synchronization and orientation of polarization in 8-cell mouse blastomeres. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 93, 239–255.

Johnson, K., Grawe, F., Grzeschik, N. und Knust, E. (2002). *Drosophila* crumbs is required to inhibit light-induced photoreceptor degeneration. *Curr Biol* 12, 1675.

Johnson K., Wodarz A. (2003) A genetic hierarchy controlling cell polarity. *Nat Cell Biol* 5, 12-4.

Jürgens, G., Wieschaus, E., Nüsslein-Vollhard, C., Kluding H. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. II Zygotic loci on the third chromosome. *Wilhelm Roux's Arch* 193, 283-295.

Kantardzhieva A., Gosens I., Alexeeva S., Punte I.M., Versteeg I., Krieger E., Neefjes-Mol C.A., den Hollander A.I., Letteboer S.J., Klooster J., Cremers F.P., Roepman R., Wijnholds J. (2005). MPP5 recruits MPP4 to the CRB1 complex in photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46, 2192-201.

Kemphues, K.J. et al. (1988) Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell* 52, 311–320

Kilinc, Ö. (2002) Isolierung und Charakterisierung von Interaktionspartnern des *Drosophila*-Proteins Stardust. Diplomarbeit. Düsseldorf.

Kim E, Cho KO, Rothschild A, Sheng M: Heteromultimerization and NMDA receptor-clustering activity of Chapsyn-110, a member of the PSD-95 family of proteins. *Neuron* 1996, 17:103-113.

Kim, E., Naisbitt, S., Hsueh, Y-P., Rao, A., Rothschild, A., Craig, A.M. (1997) GKAP a Novel Synaptic Protein That Interacts with the Guanylate Kinase-like Domain of PSD-95/SAP90 Family of Channel Clustering Molecules. *J Cell Biol*, 136 (3), 669-678.

Klebes, A. (1999). Funktionsanalyse der zytoplasmatischen Domäne des *Drosophila* Crumbs-Proteins. In "Institut für Genetik". Heinrich Heine Universität. Inaugural-Dissertation. Düsseldorf.

Klebes, A. and Knust, E. (2000) A conserved motif in Crumbs is required for E-cadherin localisation and zonula adherens formation in *Drosophila*. *Current Biology* 10, 76-85.

Knust, E. (1994). Kontrolle der Zellpolarität in Epithelien von *Drosophila* *Bioscope* 6, 10-18.

Knust, E. (2000). Control of epithelial cell shape and polarity. *Current Opinion in Genetics & Development*, 10 471-475.

Kreis, T.E. (1990) Role of microtubules in the organisation of the Golgi apparatus. *Cell Motil Cytoskeleton* 15, 67-70

Kuchinke, U., Grawe, F., Knust, E. (1998). Control of spindle orientation in *Drosophila* by the Par-3 related PDZ domain protein Bazooka. *Curr Biol*. 8, 17-31.

Laski, F.A., Rio, D.C. und Rubin, G.M. (1986). Tissue specificity of *Drosophila* P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing. *Cell*. 44, 7-19.

Lebivic A. (2005). E-cadherin-mediated adhesion is not the founding event of epithelial cell polarity in *Drosophila*. Trends Cell Biol. 15, 237-40.

Lemmers, C., Michel, D., Lane-Guermonprez, L., Delgrossi, M. H., Medina, E., Arsanto, J.,P. und Le Bivic, A. (2004). CRB3 binds directly to Par6 and regulates the morphogenesis of the tight junctions in mammalian epithelial cells. Mol Biol Cell. 1, 1324-33.

Lin, D., Edwards, A. S., Fawcett, J. P., Mbamalu, G., Scott, J. D. and Pawson, T. (2000). A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. Nat Cell Biol 2, 540-7.

Lu H., und Bilder D. (2005). Endocytic control of epithelial polarity and proliferation in *Drosophila*. Nat Cell Biol. 2005, 30; [Epub ahead of print]

Macara, I. G. (2004a). Par proteins: partners in polarization. Curr Biol 14, R160-2.

Macara, I. G. (2004b). Parsing the polarity code. Nat Rev Mol Cell Biol 5, 220-31.

Masuko N, Makino K, Kuwahara H, Fukunaga K, Sudo T, Araki N,et al.: Interaction of NE-dlg/SAP102, a neuronal and endocrine tissue-specific membrane-associated guanylate kinase protein,with calmodulin and PSD-95/SAP90. A possible regulatory role in molecular clustering at synaptic sites. J Biol Chem 1999,274:5782-5790.

Marfatia S.M., Lue R.A., Branton D., Chishti A.H.(1994) In vitro binding studies suggest a membrane-associated complex between erythroid p55, protein 4.1, and glycophorin C. J Biol Chem 25, 8631-4.

Marfatia, S.M., Chishti, A.H. (1995). Human erythroid p55 is a catalytically active guanylate kinase. Mol Biol Cell 6, 56a.

Marfatia, S.M., Lue, R.A., Branton, D., Chishti, A.H. (1995). Identification of the protein 4.1 binding interface on glycophorin C and p55, a homologue of the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. J Biol Chem 270, 715-719.

Mazumdar A., Mazumdar M.(2002) How one becomes many: blastoderm cellularization in *Drosophila melanogaster*. *Bioessays* 24, 1012-22.

McGee, A.W. und Brecht, D.S.(1999). Identification of an Intramolecular Interaction between the SH3 and Guanylate Kinase Domains of PSD-95. *The Journal of Biological Chemistry* 274 (25), 17431-17436.

McGee, A.W., Dakoji, S.R., Olsen, O., Brecht, D.S., Lim, W.A. (2001). Structure of the SH3-Guanylate Kinase Module from PSD-95 Suggests a Mechanism for Regulated Assembly of MAGUK Scaffolding Proteins. *Molecular Cell* 8, 1291-1301.

McNeill, H. et al. (1990) Novel function of the cell adhesion molecule uvomorulin as an inducer of cell surface polarity. *Cell* 62, 309–316.

Medina, E., Lemmers, C., Lane-Guermonprez, L. und Le Bivic A. (2002a). Role of the Crumbs complex in the regulation of junction formation in *Drosophila* and mammalian epithelial cells. *Biol Cell* 94, 305-313.

Medina, E., Williams, J., Klipfell, E., Zarnescu, D., Thomas, G. und Le Bivic, A. (2002b). Crumbs interacts with moesin and beta (Heavy)-spectrin in the apical membrane skeleton of *Drosophila*. *J Cell Biol* 158, 941-951.

Miller, J. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1, 1-11

Mullis, K.B. und Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335-350.

Müller, H.A., Wieschaus, E. 1996. armadillo, bazooka and stardust are critical for early stages in formation of the zonula adherens and maintenance of the polarized blastoderm epithelium in *Drosophila*. *J Cell Biol* 134, 149-163.

Müller, H.A.J. (2000). Genetic control of epithelial cell polarity: lessons from *Drosophila*. Dev Dyn. 218, 52-67.

Müller, H.-A. J. and Bossinger, O. (2003). Molecular networks controlling epithelial cell polarity in development. Mech Dev 120, 1231-1256.

Nam, S.-C. and Choi, K.-W. (2003). Interaction of Par-6 and Crumbs complexes is essential for photoreceptor morphogenesis in *Drosophila*. Development 130, 4363-4372.

Nelson, W. J. (1992). Regulation of cell surface polarity from bacteria to mammals. Science 258, 948-955.

Nelson, W.J. (2003) Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. Nature 422, 766-774.

Nix, L.S, Chishti, A.H., Anderson, J.M. and Walther, Z.(2000). hCASK and hDlg Associate in Epithelia, and Their Src Homology 3 and Guanylate Kinase Domains Participate in Both Intramolecular and Intermolecular Interactions. The Journal of Biological Chemistry 275 (52), 41192-41200.

Petronczki, M. and Knoblich, J. A. (2001). *Dm*PAR-6 directs epithelial polarity and asymmetric cell division of neuroblasts in *Drosophila*. Nat Cell Biol 3, 43-49.

Pellikka, M., Tanentzapf, G., Pinto, M., Smith, C., McGlade, C. J., Ready, D. F. und Tepass, U. (2002). Crumbs, the *Drosophila* homologue of human CRB1/RP12, is essential for photoreceptor morphogenesis. Nature 416, 143-9.

Pielage, J., Stork, T., Bunse, I. und Klamt, 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.

Ramrath, A. (2002). Isolierung und Charakterisierung von Bindungspartnern der PDZ-Domänen-Proteins BAZOOKA aus *Drosophila melanogaster*. In "Institut für Genetik". Heinrich Heine Universität. Inaugural-Dissertation. Düsseldorf.

Rodriguez-Boulan, E. and Nelson, W.J. (1989). Morphogenesis of the Polarized Epithelial Cell Phenotype. *Science* 245, 718-725.

Richard M., Grawe F., Knust E.(2005)DPATJ plays a role in retinal morphogenesis and protects against light-dependent degeneration of photoreceptor cells in the *Drosophila* eye.Dev Dyn 21,[Epub ahead of print]

Riggleman, B., P. Schedl, and E. Wieschaus. 1990. Spatial expression of the *Drosophila* segment polarity gene armadillo is posttranscriptionally regulated by wingless. *Cell* 63:549-560.

Roh, M. H., Makarova, O., Liu, C. J., Shin, K., Lee, S., Laurinec, S., Goyal, M., Wiggins, R. und Margolis, B. (2002). The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost. *J Cell Biol* 157, 161-72.

Schneider, M. (1996). Molekulare und genetische Charakterisierung des Gens stardust von *Drosophila melanogaster*. In "Institut für Entwicklungsbiologie". Universität zu Köln. Inaugural-Dissertation. Köln.

Shin, H., Hsueh, Y.P., Yang, F.C., Kim, E. and Sheng, M. (2000). An intramolecular interaction between Src homology 3 domain and guanylate kinase-like domain required for channel clustering by postsynaptic density-95/SAP90. *J Neurosci.* 20(10), 3580-7.

Smith, D. B. und Johnson, K. S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67, 31-40.

Sotillos, S., Díaz-Meco, M. T., Caminero, E., Moscat, J. and Campuzano, S. (2004). DaPKC-dependent phosphorylation of Crumbs is required for epithelial cell polarity in *Drosophila*. *J Cell Biol* 166, 549-557.

Speicher, S. A., Thomas, U., Hinz, U. and Knust, E. (1994). The Serrate locus of *Drosophila* and its role in morphogenesis of wing imaginal discs: Control of cell proliferation. *Development* 120, 535-544.

Spradling, A. C. (1986). P element mediated transformation. In: *Drosophila*, a practical approach. (ed) Roberts, D. B. (Oxford, IRL press 175-197).

Straight, S. W., Shin, K., Fogg, V. C., Fan, S., Liu, C. J., Roh, M. H., and Margolis, B. (2004) Mol. Biol. Cell 15, 1981–1990

Tanentzapf, G. and Tepass, U. (2003). Intereactions between Crumbs, Lethal giant larvae and Bazooka pathways in epithelial polarization. Nat Cell Biol 5, 46-52.

Tepass, U., Theres, C. and Knust, E. (1990). crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of *Drosophila* epithelial cells and required for organization of epithelia. Cell 61, 787-99.

Tepass, U. und Knust E. (1993) crumbs and stardust act in a genetic pathway that controls the organization of epithelia in *Drosophila melanogaster*. Developmental Biology 152, 311-326.

Tepass, U. und Hartenstein, V. (1994). The development of cellular junctions in the *Drosophila* embryo. Dev Biol 161, 563-596.

Tepass, U. (1997). Epithelial differentiation in *Drosophila*. BioEssays 19 (8), 673-681.

Tepass, U. (1999) Genetic analysis of cadherin function in animal morphogenesis. Curr Opin Cell Biol 11, 540-548.

Tepass, U. (2002). Adherens junctions: new insight into assembly, modulation and function. Bioessays 24, 690-5.

Thomas, U., Ebitsch, S., Gorzcyca, M., Koh, Y.-H., Hough, C. D., Woods, D., Gundelfinger, E. D. and Budnik, V. (2000). Synaptic targeting and localization of Discs-large is a stepwise process controlled by different domains of the protein. Curr. Biol. 10, 1108-1117.

Topinka JR, Bredt DS: N-terminal palmitoylation of PSD-95 regulates association with cell membranes and interaction with K⁺ channel Kv1.4. Neuron 1998, 20:125-134.

Wang, Q., Hurd, T. W. und Margolis, B. (2004). Tight junction protein Par6 interacts with an evolutionarily conserved region in the amino terminus of PALS1/stardust. *J Biol Chem* 279, 30715-21.

Wasserscheidt, I. (2005). Die Funktion des *Drosophila* Gens bazooka bei der Morphogenese epithelialer Gewebe. In "Institut für Genetik". Heinrich Heine Universität. Inaugural-Dissertation. Düsseldorf.

Wei X., Malicki J. (2002). *nagie oko*, encoding a MAGUK-family protein, is essential for cellular patterning of the retina. *Nat Genet* 31,150-7.

Wieschaus, E., Nüsslein-Vollhard, C., Jürgens, G. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. III Zygotic loci on the X-chromosome and fourth chromosome. *Wilhelm Roux's Arch* 193, 296-307.

Wodarz, A. (1993). Untersuchung zur Funktion des Gens crumbs bei der Entwicklung von Epithelien in *Drosophila melanogaster*. In Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät Universität zu Köln.

Wodarz, A., Grawe, F. und Knust, E. (1993). CRUMBS is involved in the control of apical protein targeting during *Drosophila* epithelial development. *Mech Dev.* 44, 175-87.

Wodarz, A., Hinz, U., Engelbert, M. and Knust, E. (1995). Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *Drosophila*. *Cell* 82, 67-76.

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

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.

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, 451-464.

Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Sugiyama, Y., Ishiyama, C., Suzuki, A., Hirose, T., Iwamatsu, A., Shinohara, A., and Ohno, S. (2003). Mammalian Lgl forms a protein complex with PAR-6 and aPKC independently of PAR-3 to regulate epithelial cell polarity. *Curr. Biol.* 13, 734-743.

Yeaman, C., Grindstaff, K., Nelson, W.J. (1999). New Perspectives on Mechanisms Involved in Generating Epithelial Cell Polarity. *Physiological Reviews* 79 (1), 73-98.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

α -...	anti-...
Abb.	Abbildung
ähn.	Ähnlich
anschl.	anschließend
Anz.	Anzahl
Bal.	Balancer
bp	Basenpaare
ca.	circa
C1	<i>protein kinase C conserved region 1</i>
CRIB	<i>Cdc42/Rac interactive binding</i>
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ECR	evolutionary conserved region
EGF	epidermal growth factor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
Evtl.	eventuell
g	Gramm
Genom.	Genomisch
°C	Grad Celsius
GUK	Guanylat-Kinase Homolog
HRP	Meerrettich Peroxidase
L27	<i>Lin-2/Lin-7</i> Binde motiv
LRR	<i>leucine-rich repeats</i>
LSD	<i>leucine-rich repeat, SDS22-like</i>
Lsg	Lösung
m...	milli...(10 ⁻³)
M	Molarität (mol/l)
min	Minuten
MU	Miller Units
μ ...	mikro...(10 ⁻⁶)
PB1	Phox/Bem1-Bindemotiv
PDZ	<i>postsynaptic density 95/ discs large/ zonula occludens1</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SH3	<i>Src- homology 3</i>
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
WD40	Trp-Asp W-D oder <i>beta-transducin repeats</i>
WT	Wildtyp
z. T.	zum Teil
z. Z.	zur Zeit

7.2 Hergestellte UAS-*sdt*-Effektorlinien

Stämme	Chromosom	kodierende Region (in As)	Referenz
UAS- <i>sdt</i> ^{1.2.34.1}	I	SdtN , ECRI (1-551As)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{1.2.53.1}	I	SdtN, ECRI (1-551As)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{2.7.18.5}	II	Sdt1-L27N (1-681As)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{2.7.18.6}	II	Sdt1-L27N (1-681As)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{2.7.21.2}	III	Sdt1-L27N (1-681As)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{2.7.21.4}	III	Sdt1-L27N (1-681As)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{2.7.90}	III	Sdt1-L27N (1-681As)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{2.7.101}	III	Sdt1-L27N (1-681As)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{3.5.23.1}	I	Sdt1-L27C (1-791As)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{3.5.23.2}	II	Sdt1-L27C (1-791As)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{3.5.23.3}	I	Sdt1-L27C (1-791As)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{3.5.52.1}	III	Sdt1-L27C (1-791As)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{3.5.52.2}	III	Sdt1-L27C (1-791As)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{3.5.68.2}	II	Sdt1-L27C (1-791As)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{3.5.68.3}	II	Sdt1-L27C (1-791As)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{4.1.6.1}	III	SdtPDZ (837-928As)*	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{4.1.26.3}	III	SdtPDZ (837-928As)*	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{4.1.26.4}	III	SdtPDZ (837-928As)*	diese Arbeit

Tab. 7.1: Beschreibung s. nächste Seite

Stämme	Chromosom	kodierende Region (in As)	Referenz
UAS- <i>sdt</i> ^{4.1.48.1}	II	SdtPDZ (837-928As)*	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{5.1.35.1}	III	SdtSH3 (920-1040As)*	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{5.1.35.2}	III	SdtSH3 (920-1040As)*	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{5.1.35.4}	III	SdtSH3 (920-1040As)*	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{6a.3.1}	II	SdtGUK-Hook* (1031-1286As)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{6a.23.1}	III	SdtGUK-Hook * (1031-1286As)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{6a.40}	I	SdtGUK-Hook* (1031-1286As)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{6a.45.2}	II	SdtGUK-Hook * (1031-1286As)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{6a.45.3}	II	SdtGUK-Hook * (1031-1286As)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{6a.27.1}	II	SdtGUK-Hook * (1031-1286As)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{6b.5.2}	II	SdtGUK-Hook (1031-1286As)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{6b.5.3}	III	SdtGUK-Hook (1031-1286As)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{6b.10.1}	III	SdtGUK-Hook (1031-1286As)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{6b.39.1}	III	SdtGUK-Hook (1031-1286As)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{6b.5.2}	II	SdtGUK-Hook (1031-1286As)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{6b.26.2}	II	SdtGUK-Hook (1031-1286As)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{6b.26.4}	II	SdtGUK-Hook (1031-1286As)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{7.1.48.1}	I	SdtPDZ-GUK (837-1286As)	diese Arbeit
UAS- <i>sdt</i> ^{7.1.49.1}	II	SdtPDZ-GUK (837-1286As)	diese Arbeit
UAS- <i>hMPP5</i> ^{8.11.40.1}	III	hMPP5 (1-675As)	diese Arbeit
UAS- <i>hMPP5</i> ^{8.11.40.2}	III	hMPP5 (1-675As)	diese Arbeit

Tab.7.1: Hergestellte UAS-*sdt*-Effektorstämme

*: mit 3xHA-Tag, die restlichen sind mit 8xMyc und Flag Tags versehen, in Klammern sind die As bezogen auf die Sdt-MAGUK Isoform bzw. hMPP5 angegeben.

7.3 Verwendete Plasmid-Konstrukte

Name des Konstrukts (kodierende Region in As & Vektor)	enthaltende Domänen	Referenz
Baz (1-1464) pGBT9	vollständiges Protein (3PDZ, DaPKC- Binderegion)	Ramrath, 2002
Crb intra (1-37) pGEX	intrazelluläre Domäne	Klebes, 1999
Crb intra (1-33) pGEX	intrazelluläre Domäne ohne ERLI Motiv	Klebes, 1999
Crb intra (1-37) pGBT9	intrazelluläre Domäne	Bachmann, et al., 2001
Crb intra (1-33) pGBT9	intrazelluläre Domäne ohne ERLI Motiv	Bachmann, et al., 2001
Crb intra (1-37 aa) pGBKT7	intrazelluläre Domäne	diese Arbeit
Crb intra (1-37 aa) pACT2	intrazelluläre Domäne	Berger, unveröffentlichte Daten
DaPKC (6-528) pACT2		Ramrath, 2002
DmPar-6 (1-351) pACT2	full-length, Crib PDZ	Ramrath, 2002
DmPar-6 (114-267 aa) pACT2 (D.E.)	Crib PDZ	Egger-Adam, 2004
DmPar-6 (114-267 aa) pGBT9 (D.E.)	Crib PDZ	Egger-Adam, 2004
DmPar-6 (1-133) pAS2	N-Terminus	Ramrath, 2002
DmPar-6 (156-261)) pACT2	PDZ	diese Arbeit
DPATJ (71-411) pACT2	PDZ 1-2	Kilinc, 2002
DPATJ (552-871) pACT2	PDZ 3-4	Kilinc, 2002
DPATJ (1-87) pACT2	L27	Kilinc, 2002
DPATJ (1-87) pGEX- 4T	L27	Kilinc, 2002
DPATJ (71-871) pGEX- 4T	PDZ1-4	Kilinc, 2002
DPATJ (71-871) pACT2	PDZ 1-4	Ramrath, 2002
hMpp5 (1-675aa) pUAST-8xMyc	vollständiges Protein mit: L27N, L27C, PDZ, SH3, Hook, GUK	diese Arbeit
SdtN (1-551) pUAST-8xMyc	ECR1	diese Arbeit

Tab. 7.2: Beschreibung s. nächste Seite

Name des Konstrukts (kodierende Region in As & Vektor)	enthaltende Domänen	Referenz
SdtN (1-566) pGEX-4T2	ECR1, ECR2	Bulgakova, unveröffentlichte Daten
SdtN (1-566) pGBKT7	ECR1, ECR2	diese Arbeit
Sdt (1-681) pGEX-4T2	ECR1, ECR2, L27 N	Bulgakova, unveröffentlichte Daten
Sdt (1-681) PCRII-Topo	ECR1, ECR2, L27 N	diese Arbeit
Sdt (566-681 aa) pGBKT7	ECR2, L27 N	diese Arbeit
Sdt (1-659) pGBKT7	ECR1, ECR2, 1-34 aa der L27 N	diese Arbeit
Sdt (640-760) pGBKT7	ab aa 16 der L27 N, L27C	diese Arbeit
Sdt (639-834) pACT2	ab 17. aa der L27 N, L27C	Bachmann et al., 2004
Sdt (1-681) pUAST-8xMyc	ECR1, ECR2, L27 N	diese Arbeit
Sdt (1-791) pUAST-8xMyc	ECR1, ECR2, L27 N, L27C	diese Arbeit
Sdt (1-834) PCRII-Topo	ECR1, ECR2, L27 N, L27C	diese Arbeit
Sdt (837-928) pUAST- 3xHA	PDZ	diese Arbeit
Sdt-PDZ (837-1286) pUAST-3xHA	PDZ-GUK	diese Arbeit
Sdt-PDZ (832-916) pACT2	PDZ	Berger, unveröffentlichte Daten
Sdt-PDZ (837-924) pGBKT7	PDZ	Berger, unveröffentlichte Daten
Sdt (1043-1289) pACT2	GUK-Hook	Kilinc, 2002
Sdt (1030-1289) pGBKT7	GUK-Hook	diese Arbeit
Sdt (1030-1289) pGBT9	GUK-Hook	diese Arbeit
Sdt (1031-1286) pUAST-3xHA	GUK-Hook	diese Arbeit
Sdt (913-1039 aa) pACT2	SH3	Kilinc, 2002
Sdt (913-1039 aa) pGEX-4T2	Sdt SH3 pGEX-4T2	Kilinc, 2002
Sdt (920-1040 aa) pUAST-3xHA	SH3	diese Arbeit

Tab.7.2: Verwendete Plasmid-Konstrukte

In Klammern sind die As der jeweiligen Proteinsequenz bezogen auf den ORF angegeben

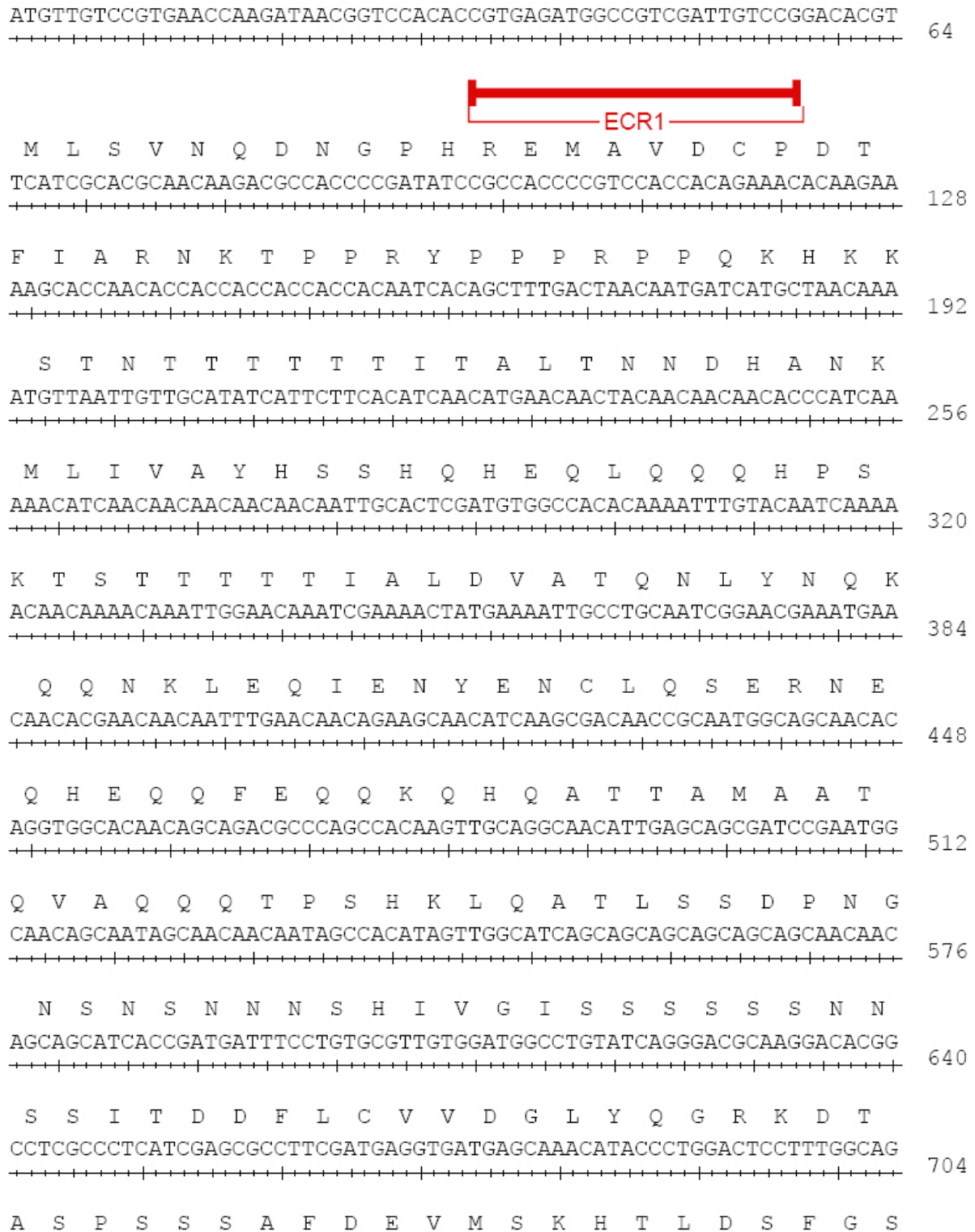


Abb. 7.1a: DNA (1-704 bp) - und Protein Sequenz der Sdt-MAGUK Isoform
Eingezeichnet ist die ECR (evolutionary conserved region) Domäne.

CATCGCCTATCGTCACCTGCACCAGCAGCATCAGGCGACGAGCAATGGCAACAGCAGCAGCAAC +++++	768
I A Y R H L H Q Q H Q A T S N G N S S S N ACGAGCAATACCAACAGCAACACCAACAGCAACACCAACAGCAACACCAATGGCAACA +++++	832
T S N T N S N T N S N T N S N S N T N G N CGAGCAACAACACAGCTGTTTCAACCAAACGGCAACGGTGACCAAACAGGCGTGAGCAGCAG +++++	896
T S N N T A V S T K T A T V T K T G V S S S CAACAGCAACAGCAACTCGCTGAACAGCAGCAACAGCTCGATGCACACGAGCAGCAGCAGCAGC +++++	960
N S N S N S L N S S N S S M H T S S S S S GGTCACAGCAGCAACATAGCCAGTGCCACATCATCATCCGCCACCAGCAGCTCAACGGTGC +++++	1024
G H S S N I A S A T S S S S A T S S S T V CCGATGATCTGAGCCTGGCGCCACCCGGCTACGAGGTGAGCCAGCAGCAGCAGCAACAACATTT +++++	1088
P D D L S L A P P G Y E V S Q Q Q Q Q Q H L GGTTGCAACGCCCGTGACCATGTTGCTGCCACCGATGGCCAAGCATCGCGAGCTGCCC GTTGAC +++++	1152
V A T P V T M L L P P M A K H R E L P V D GTACCGGACAGCTTTATCGAGATGGTCAAGACCACGCCAAGATATCCGCCACCAGCTCATCTCT +++++	1216
V P D S F I E M V K T T P R Y P P P A H L CCTCACGCGGATCGCTATTGTGCGAACGGCAGCGCCTCCACCGCCCACACCAGCTCTCCTCGAT +++++	1280
S S R G S L L S N G S A S T A H T T L S S M GGGCGTGCGCCTTCGCCTGTCACTGCAACAGCAGCAGCAGCAGCATCAGCATCAGCAGCATGT +++++	1344
G V A P S P V T A T A A A A A S A S A A C GCAACCACTGCGGTTGCTGCTGCTGCGGTTTCTGGTGTGCTGACGGCGATGCGAGGCGGGTGG +++++	1408
A T T A V A A A A V S G V A D G D A R R V CCGATGAGCTCAATGGGAATGCGAAGCCCGTACCGCCGCCACGTGATCATCTGCGGGTGGAGAA +++++	1472
A D E L N G N A K P V P P P R D H L R V E K	

Abb. 7.1b: DNA (705-1472 bp) - und Protein Sequenz der Sdt-MAGUK Isoform

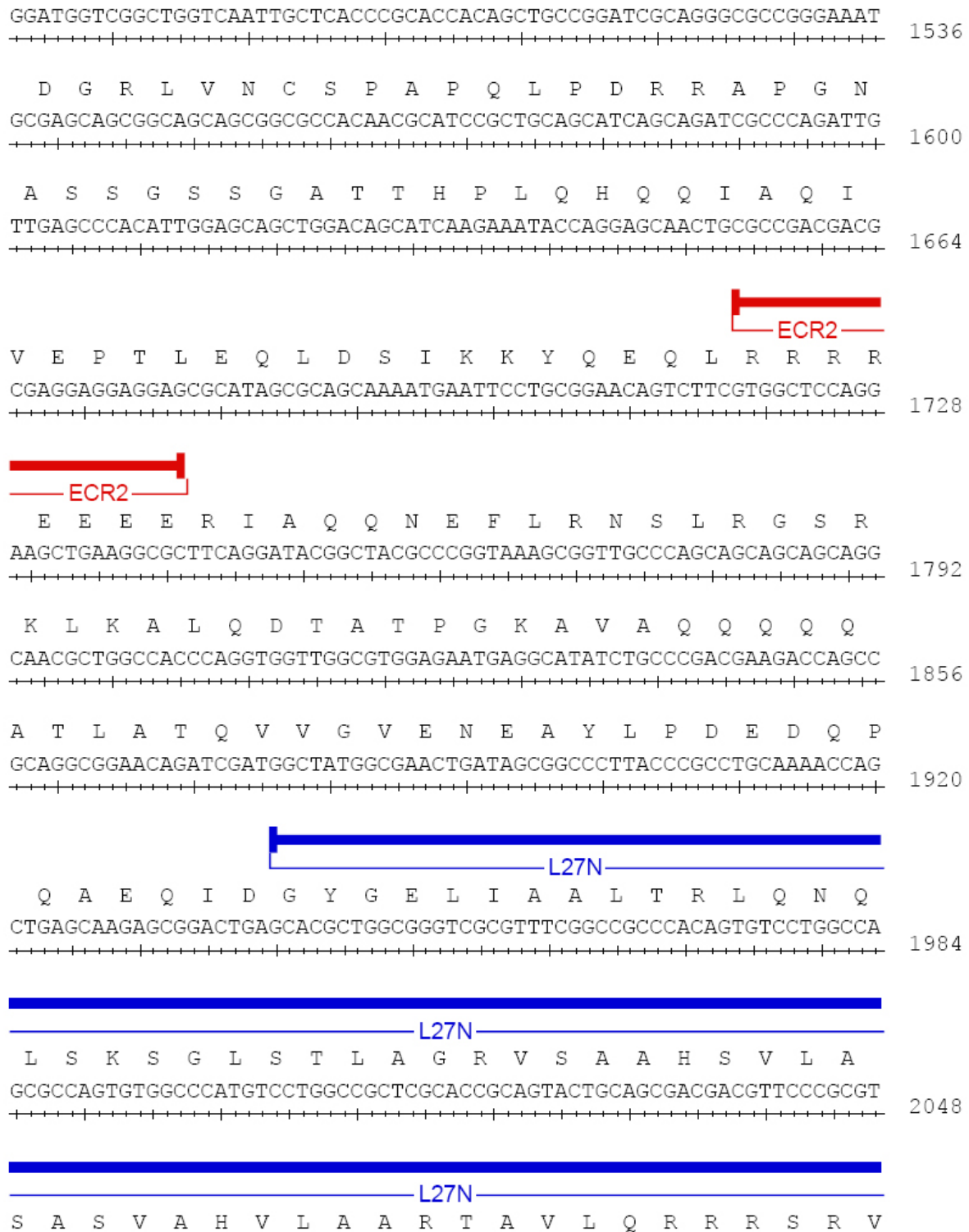


Abb. 7.1c: DNA (1473-2048 bp) - und Protein Sequenz der Sdt-MAGUK Isoform
 Eingezeichnet sind die ECR 2 (evolutionary conserved region) und L27N (Lin2/Lin7 Bindedomäne) Regionen.

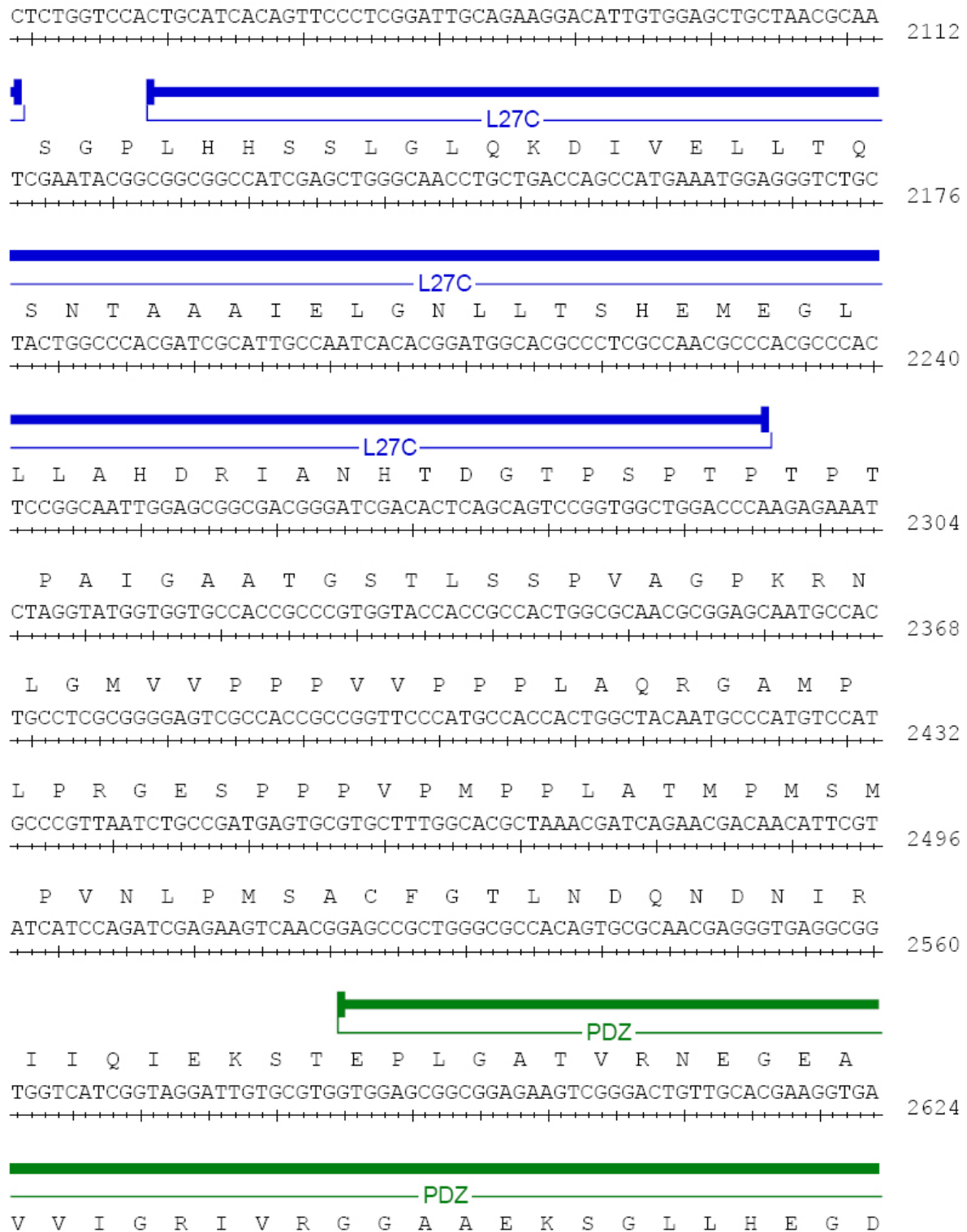


Abb. 7.1 d: DNA (2049-2624bp) - und Protein Sequenz der Sdt-MAGUK Isoform

Eingezeichnet sind die L27C (Lin2/Lin7 Bindedomäne) und ein Teil der PDZ (postsynaptic density 95/ discs large/ zonula occludens1) Domänen.

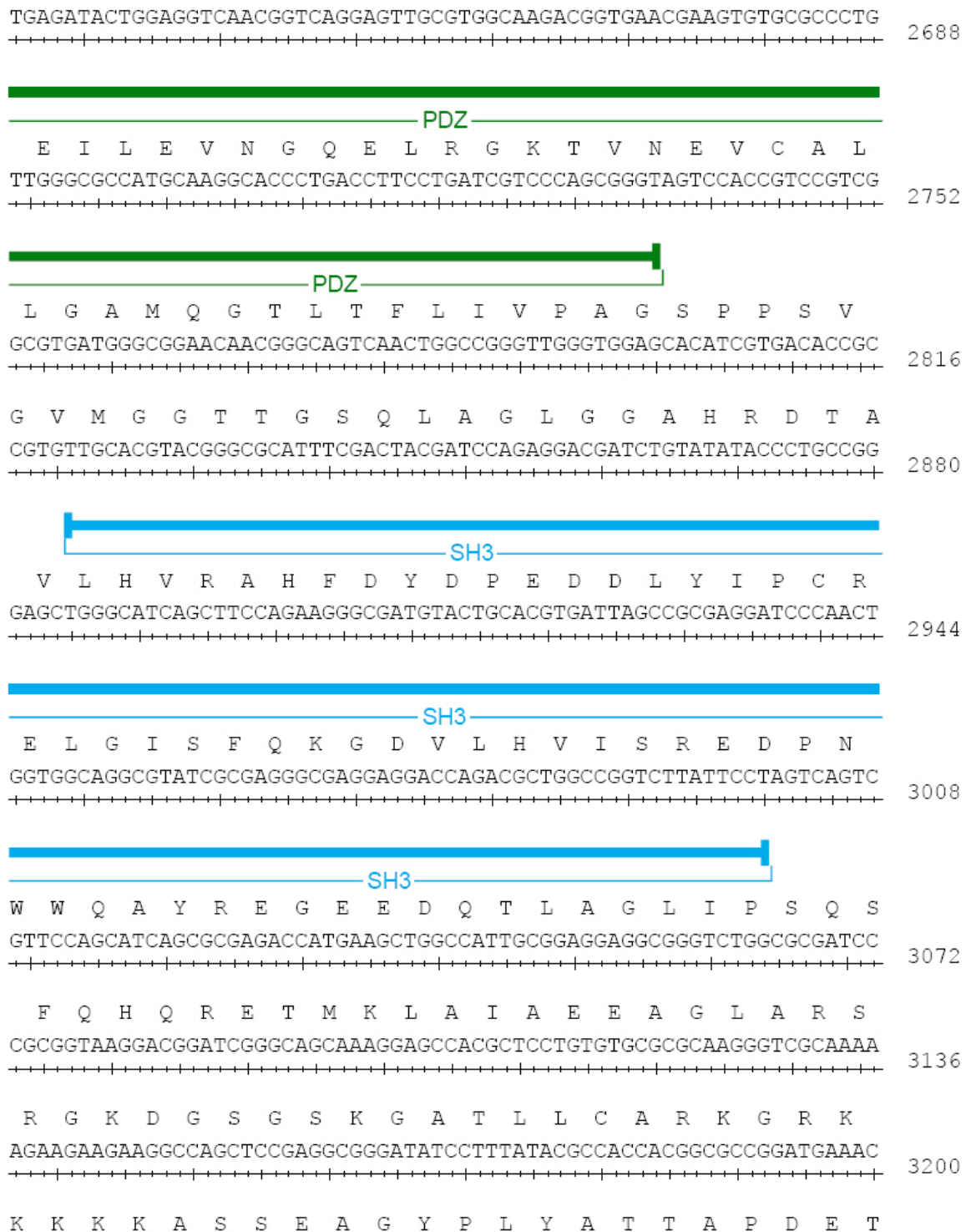


Abb. 7.1 e: DNA (2625-3200bp) - und Protein Sequenz der Sdt-MAGUK Isoform
 Eingezeichnet sind ein Teil der PDZ (postsynaptic density 95/ discs large/ zonula occludens1) und der SH3 (Src-homology 3) Domänen.

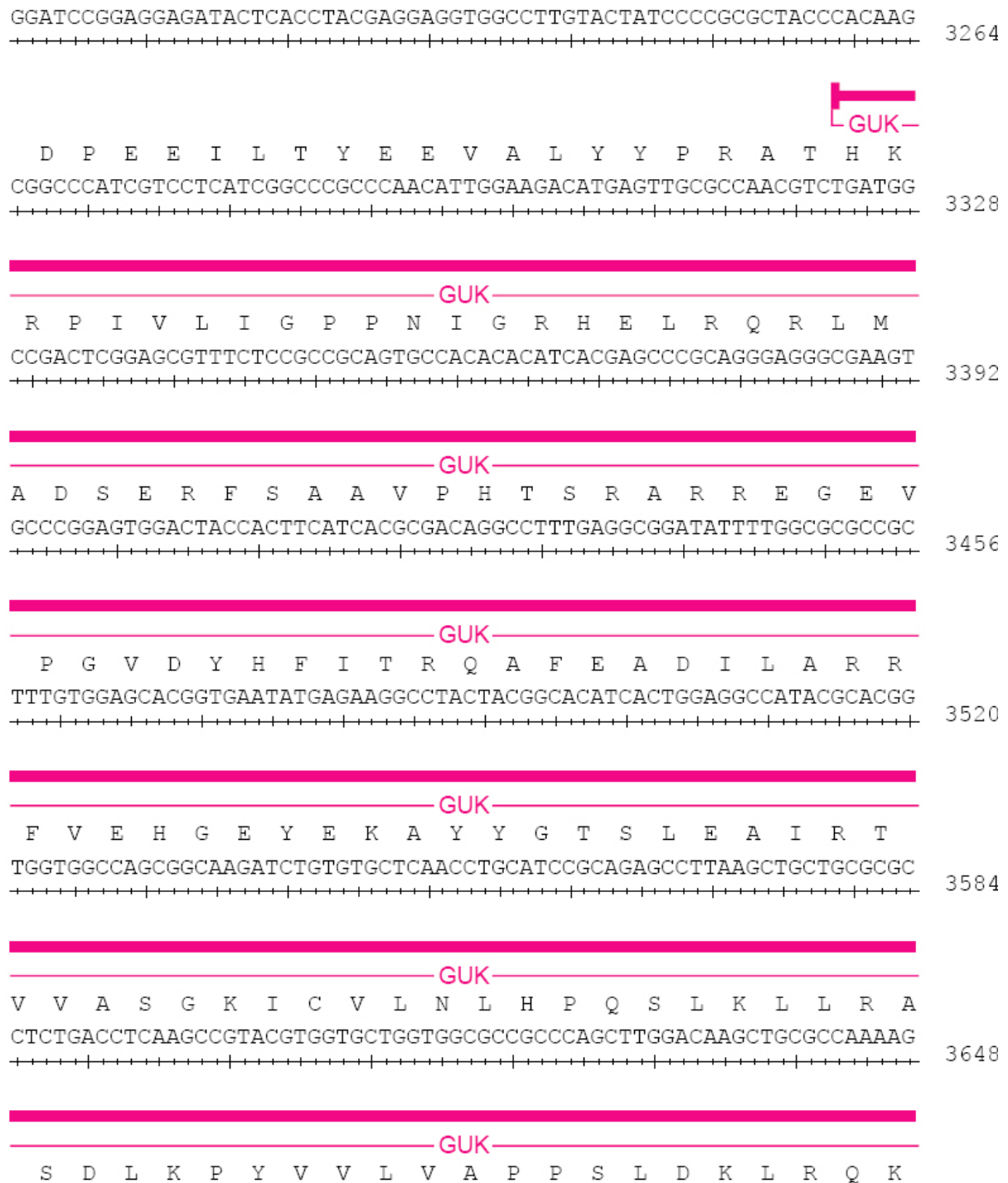


Abb. 7.1 f: DNA (3201-3684bp) - und Protein Sequenz der Sdt-MAGUK Isoform
Eingezeichnet ist ein Teil der GUK (Guanylatkinase-Homolog) Domäne.



Abb. 7.1 g: DNA (3684-3840bp) - und Protein Sequenz der Sdt-MAGUK Isoform
 Eingezeichnet ist ein Teil der GUK (Guanylatkinase-Homolog) Domäne.

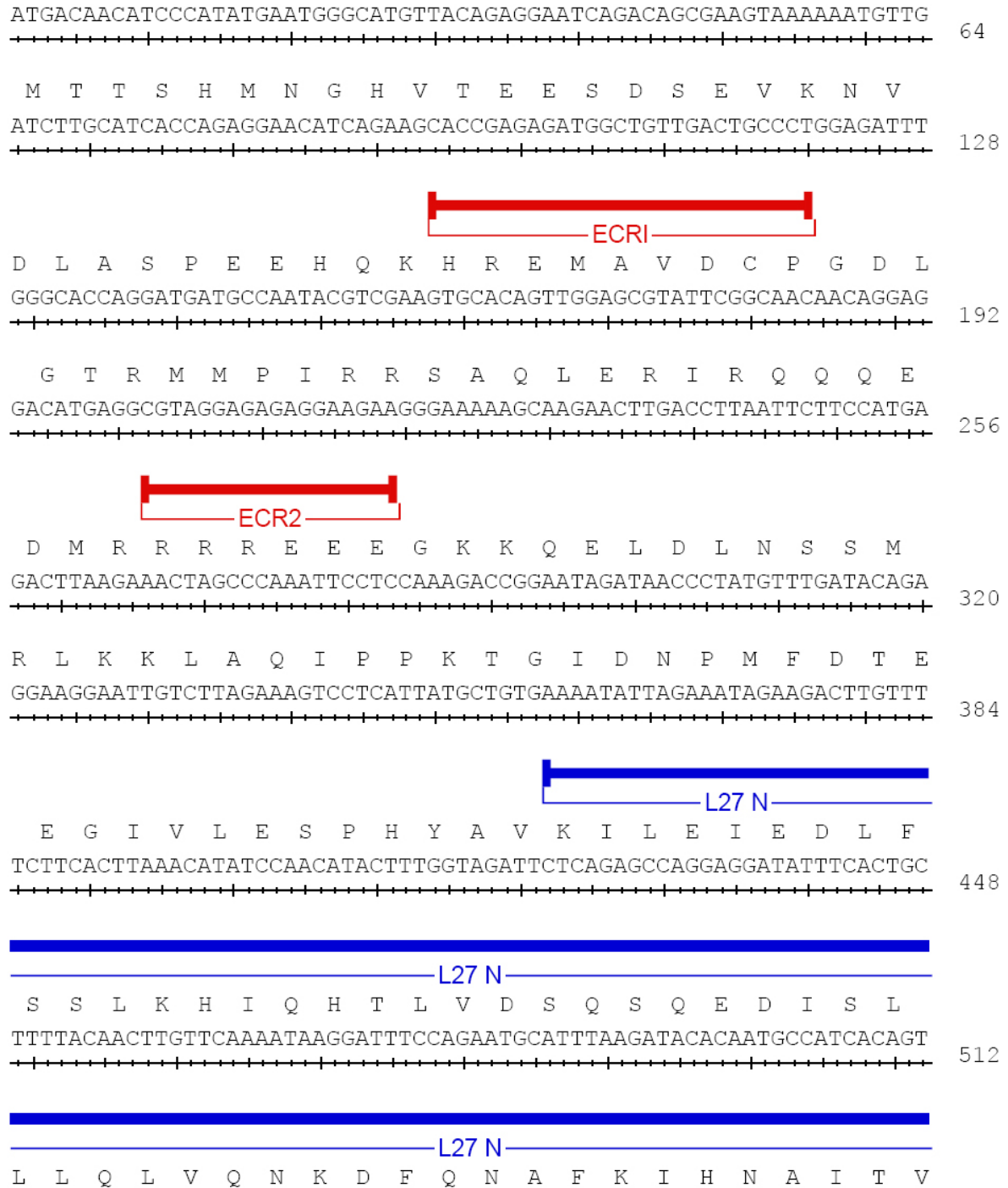


Abb. 7.2 a: DNA-(1-512bp) und Protein Sequenz von hMPP5
 eingezeichnet sind die ECR 1 und 2 (evolutionary conserved region) und L27N (Lin2/Lin7 Bindedomäne) Regionen

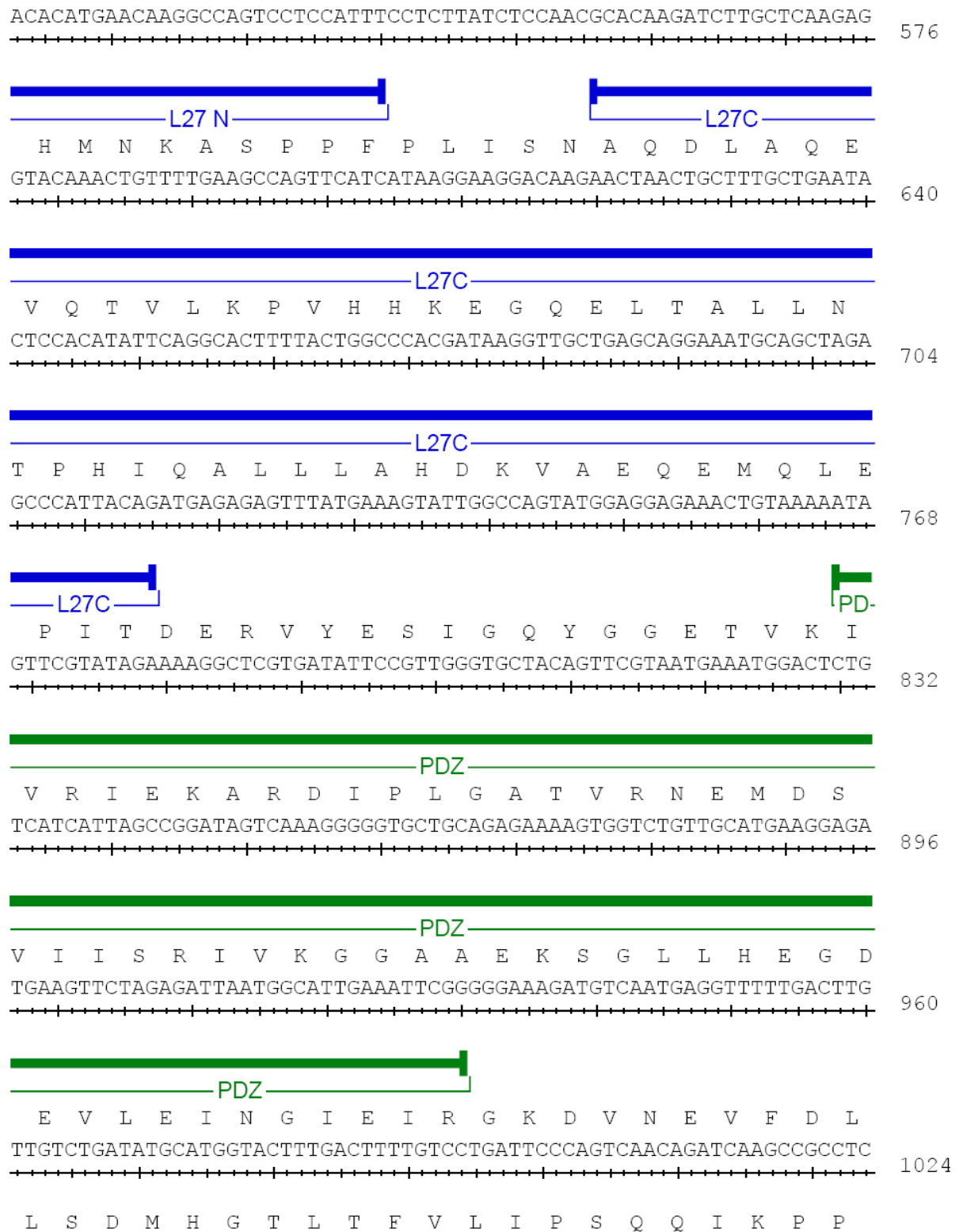


Abb. 7.2 b: DNA-(513-1024bp) und Protein Sequenz von hMPP5

eingezeichnet sind ein Teil der L27N, die L27C (Lin2/Lin7 Bindedomäne) und die PDZ (postsynaptic density 95/ discs large/ zonula occludens1) Domänen.

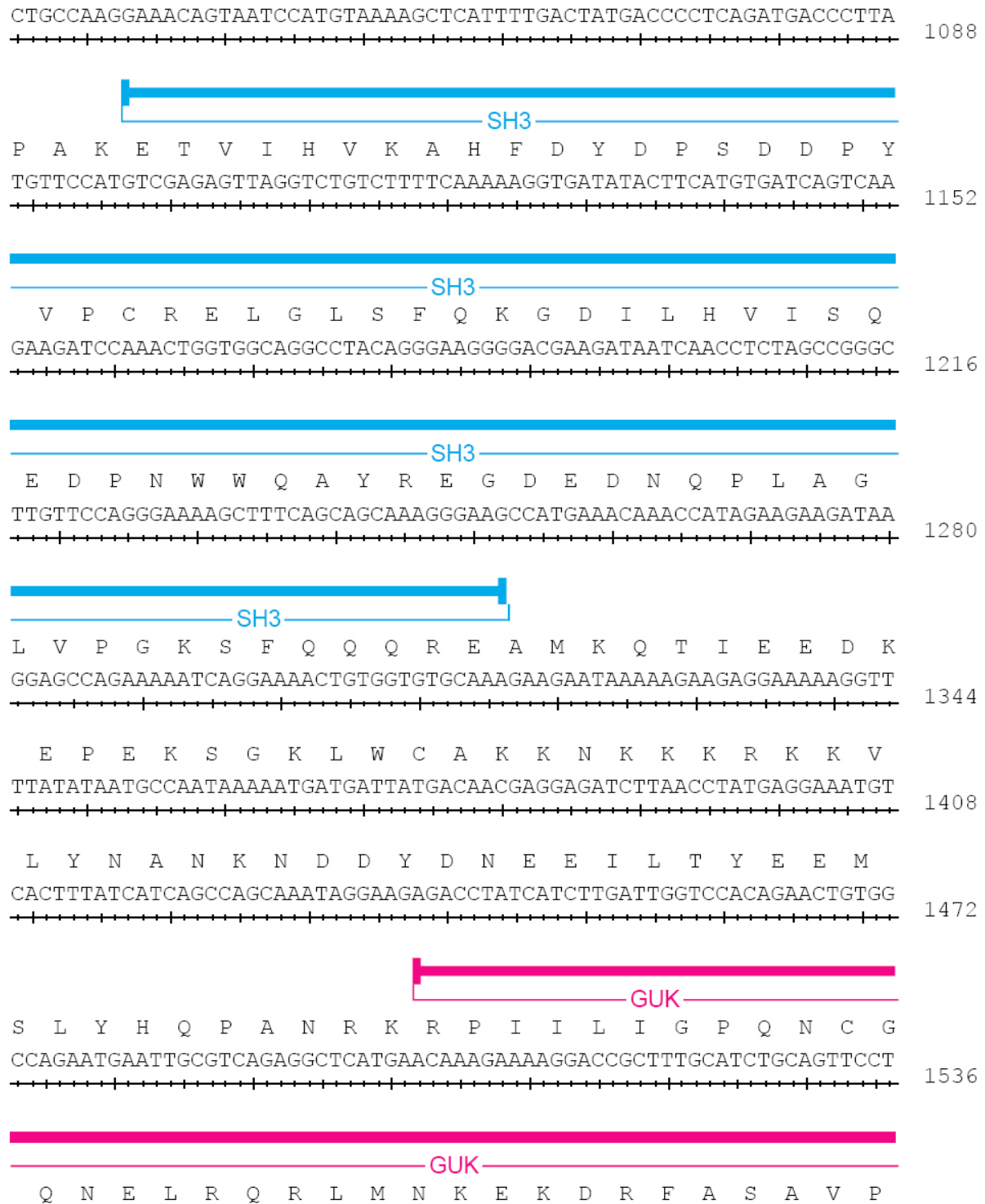


Abb. 7.2 c: (1025-1536bp)DNA- und Protein Sequenz von hMPP5

Eingezeichnet ist ein Teil der GUK (Guanylatkinase-Homolog) und die SH3 (Src- homology 3) Domänen.

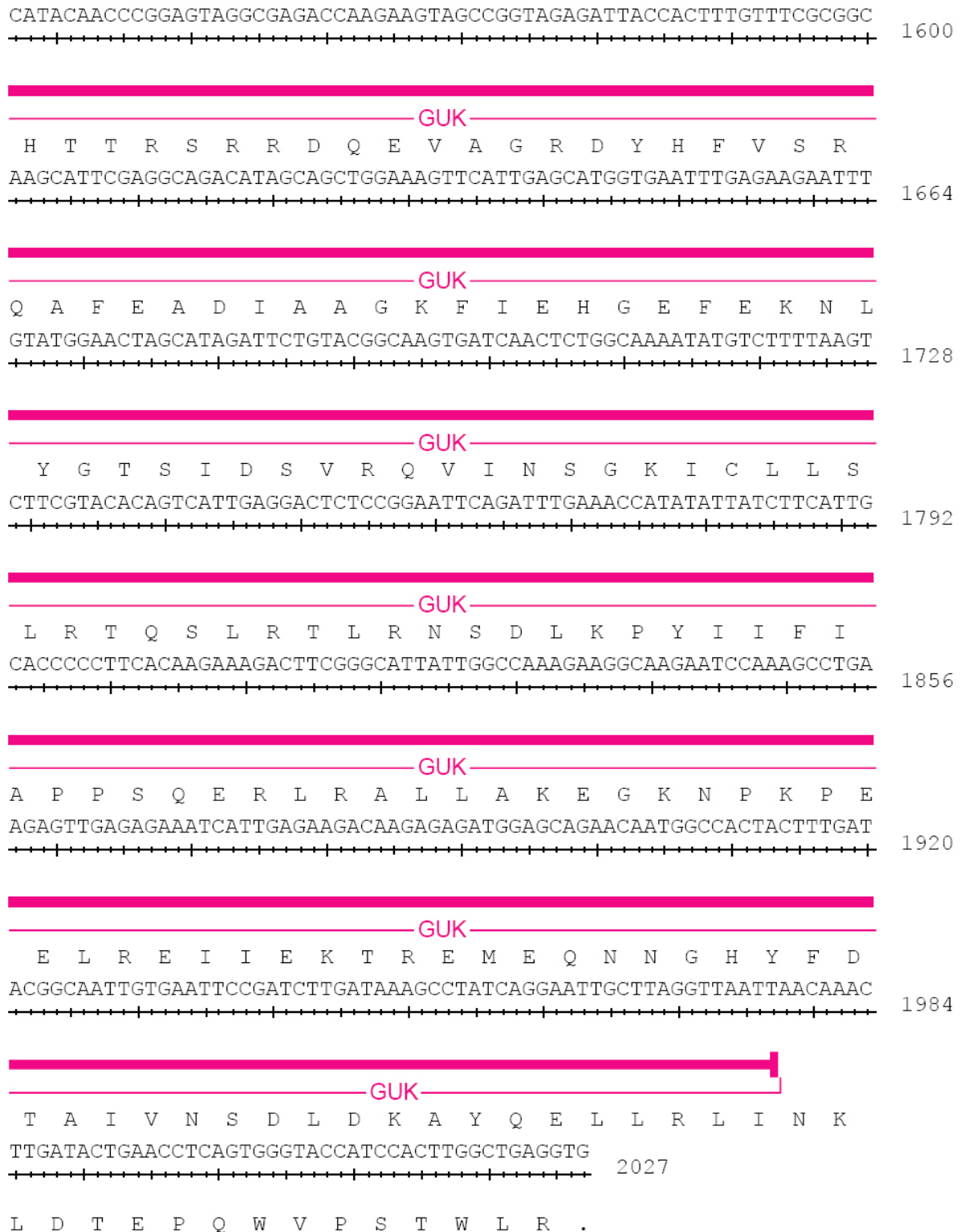


Abb. 7.2 d: (1537-1984bp) DNA- und Protein Sequenz von hMPP5
 Eingezeichnet ist ein Teil der GUK (Guanylatkinase-Homolog)

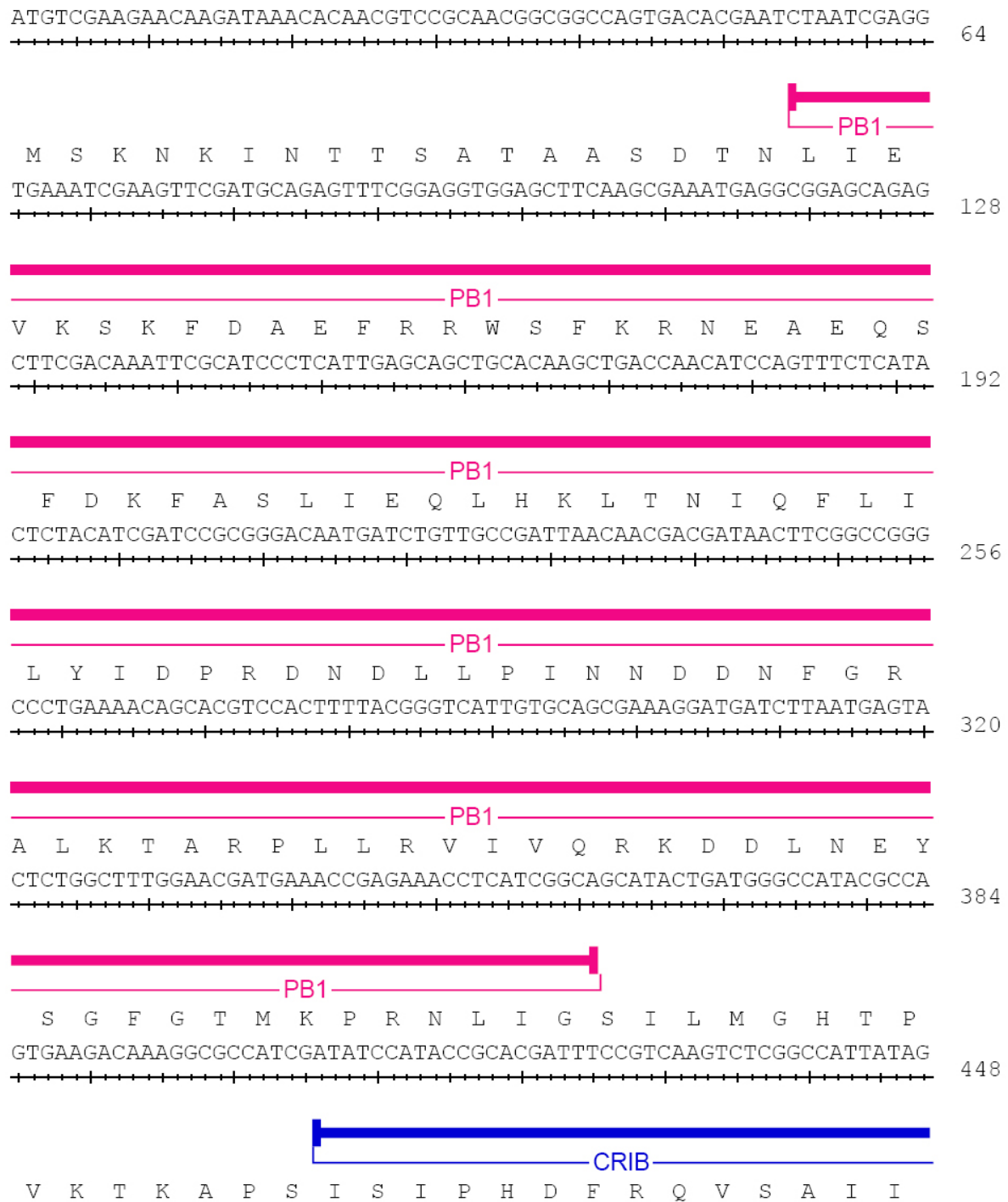


Abb. 7.3 a: DNA (1-448bp)- und Protein Sequenz von *DmPar-6*

Eingezeichnet ist die PB1 (Phox /Bem1-Bindemotiv) und ein Teil der CRIB (Cdc42/Rac interactive binding) Domäne.

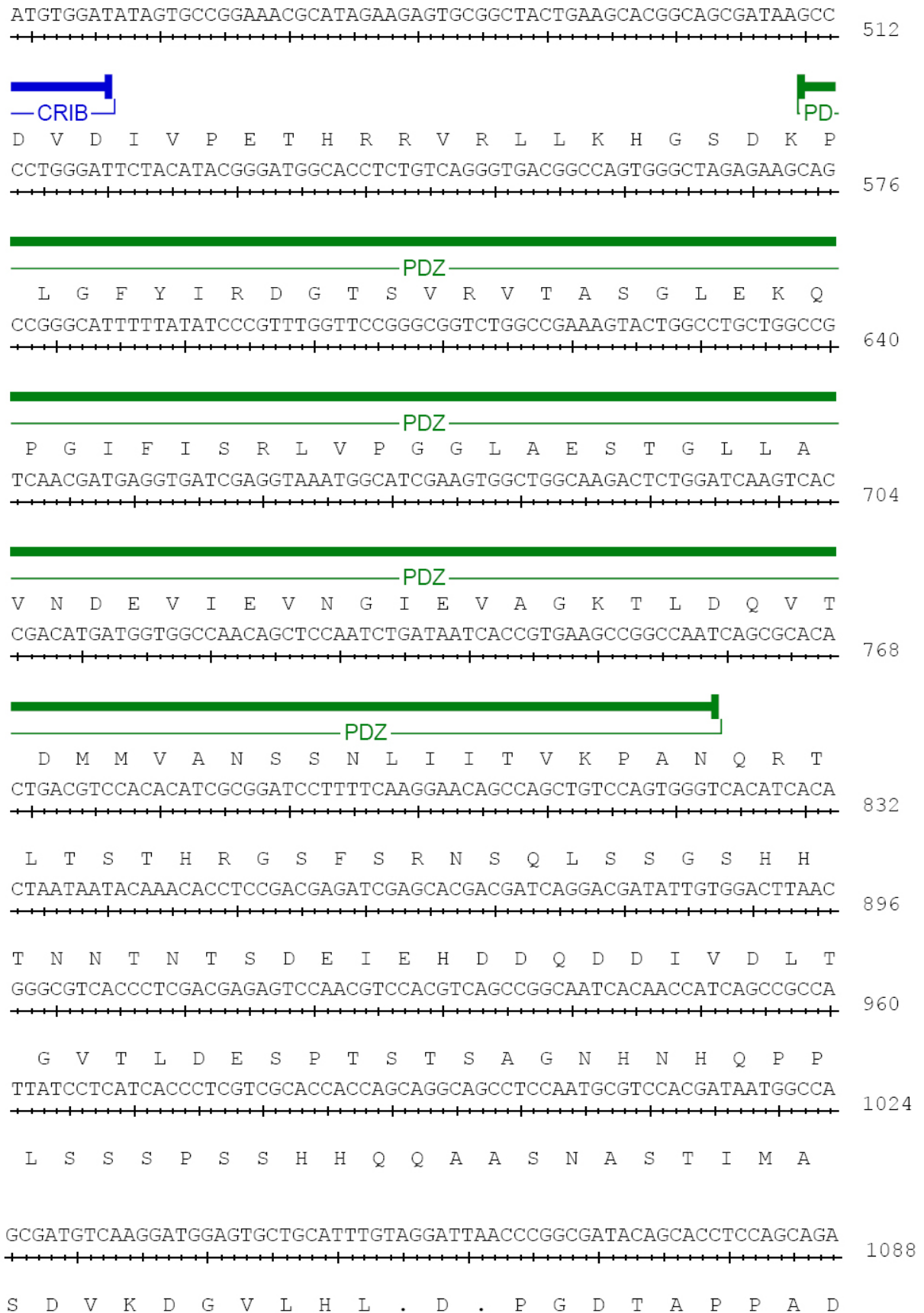


Abb. 7.3 b: DNA (449-1088bp)- und Protein Sequenz von *DmPar-6*
Eingezeichnet ist ein Teil der CRIB (Cdc42/Rac interactive binding) und die PDZ (postsynaptic density 95/ discs large/ zonula occludens1) Domäne.

Danksagung

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

Ihr möchte ich für die Unterstützung und die Überlassung des Themas danken sowie für die lehrreichen Diskussionen und dafür, dass es nie Fragen gab, die nicht gestellt werden durften.

Herrn Prof. Dr. Ernst danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens, die Mitbetreuung und dafür, dass ich die ONPG-Tests bei ihm durchführen durfte.

Ein Dankeschön an alle Mitglieder des Instituts für Genetik für die tolle Arbeitsatmosphäre; insbesondere gilt mein Dank den ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Knust-AG: Nico, Kevin, Wiebi, Sandra, Isa, Nadine, Christine, Susann, Ferdi, André und Natalia. Das Arbeiten mit Euch war schön. Susann ile beraber gecirdigimiz zaman cok güzeldi, arkadasligina tesekkür ederim.

Herrn Gödde, dem Fliegenlädchen und André danke ich für die kritische Durchsicht meiner Arbeit.

I would like to thank Natalia, for the great cooperation with our sdt constructs and the interesting discussions. Elke danke ich für die Hilfe bei einigen Fliegenarbeiten. Mein Dank gilt Olaf für die Lösungen diverser Mac-Geheimnisse und für anregende Diskussionen.

Bei André möchte ich mich dafür bedanken, dass er mir mit Rat, Tat und seinem Wissen jederzeit zur Seite stand.

Lieben Dank an Christine, für ihre Freundschaft und die Einführung in die ONPG-Tests sowie den Exkurs in die Mythen des Excel!

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, ihrer Liebe und dafür, dass sie mich in jeder Hinsicht unterstützt hat: Gina und Helmut für ihre unermüdliche Geduld während der Korrekturen und des Druckens, anneme, babama, ve kardesim Emre`ye: okumami desteklediginiz icin. Cocuguma, son aylarda beni tüm stresi unutturmaya yardimci odugu icin.

Meinem Mann Jerome danke ich für all seine Liebe, für die Geborgenheit, die er mir gegeben hat und seine unerschütterliche Geduld mit mir.

Erklärung:

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form, bis auf den zur Veröffentlichung eingereichten Teil, noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, November 2005

Teile dieser Arbeit wurden in EJCB zur Veröffentlichung eingereicht:

Kempkens, Ö., Médina, E., Fernandez-Ballester G., Özüyaman, S., Le Bivic, A., Serrano, L., Knust, E. (2005). Interactions between the Drosophila PDZ domain-proteins Stardust and DmPar-6 and Crumbs: modelling, in vitro and in vivo interactions. EJCB