

**Die Untersuchung des**  
***Drosophila melanogaster***  
**Proteins Bazooka hinsichtlich seiner**  
**Struktur und Funktion**

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

vorgelegt von  
Nannette Fischer  
aus Neuss

Düsseldorf, 2006

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

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

Referent: Prof. Dr. Andreas Wodarz

Koreferentin: Prof. Dr. Elisabeth Knust

Tag der mündlichen Prüfung: 16.11.2006

**Für Frank**

---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Epithelien</b>	<b>2</b>
1.1.1	Polarität in Epithelien	2
1.1.2	Zell-Zell-Kontakstrukturen in Epithelien	3
<b>1.2</b>	<b>Zellpolarität und Asymmetrische Teilung</b>	<b>4</b>
1.2.1	Die asymmetrische Teilung der Zygote bei <i>Caenorhabditis elegans</i>	4
1.2.2	Der PAR/aPKC-Komplex als integrierter Bestandteil eines Netzwerks von Protein-Protein-Interaktionen mit anderen Proteinkomplexen zur Regulierung epithelialer Zellpolarität und Bildung von Zell-Zell-Kontaktstrukturen	6
1.2.3	Die asymmetrische Teilung der Neuroblasten in <i>Drosophila melanogaster</i>	8
1.2.4	Die Lokalisierung und Funktion des PAR/aPKC-Komplexes im Hinblick auf die Kontrolle der Polarität und der asymmetrischen Zellteilung in Neuroblasten von <i>Drosophila</i>	9
1.2.5	Molekulare Interaktionen innerhalb des PAR/aPKC-Komplexes	12
1.2.6	Überlegungen zur Polarisierung des PAR/aPKC-Komplexes	14
<b>1.3</b>	<b>Die Struktur des <i>Drosophila</i> Proteins Bazooka</b>	<b>15</b>
<b>1.4</b>	<b>Themenstellung</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Chemikalien und sonstige Materialien</b>	<b>19</b>
<b>2.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>20</b>
2.2.1	Vektoren	21
2.2.2	Amplifizierung von DNA-Fragmenten	22
2.2.3	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> -Bakterien	24
2.2.4	Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA	26
2.2.5	Isolierung von Plasmid-DNA	26
2.2.6	Transfektion von Plasmid-DNA in Schneiderzellen (S2)	27
2.2.7	Austausch einzelner Aminosäuren mit dem <i>Stratagene</i> Mutagenese-Kit	28
2.2.8	Sequenzierung der verschiedenen mutanten <i>baz</i> -Allele	28
<b>2.3</b>	<b>Genetische Methoden</b>	<b>31</b>
2.3.1	Fliegenstämme, Chromosomen, Allele	31
2.3.2	Das UAS/GAL4-System	33
<b>2.4</b>	<b>Mikromanipulation von <i>Drosophila melanogaster</i></b>	<b>34</b>
2.4.1	Keimbahntransformation	34
<b>2.5</b>	<b>Histologische Methoden</b>	<b>37</b>
2.5.1	Verwendete Antikörper	37
2.5.2	Antikörper-Färbungen an Embryonen	38
2.5.3	Antikörper-Färbungen an Ovarien	39
2.5.4	Antikörper-Färbungen an Schneiderzellen (S2-Zellen)	39
2.5.5	Kutikula-Präparation	40
2.5.6	Analyse adulter Augen mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops (REM): <i>baz</i> -induzierter dominanter morphologischer Phänotyp im Auge	41
<b>2.6</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>41</b>
2.6.1	Herstellung von Ovarienextrakten für den Western Blot	41
2.6.2	SDS-PAGE-Gelelektrophorese und Western Blot	42
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>43</b>

---

<b>3.1 Untersuchungen im für <i>baz</i> wildtypischen Hintergrund</b> .....	<b>49</b>
3.1.1 Analyse der subzellulären Lokalisation des full-length Baz-Proteins und mutanter Baz-Proteine in embryonalen Epithelien.....	49
3.1.2 Analyse der subzellulären Lokalisation des full-length Baz-Proteins und mutanter Baz-Proteine in Neuroblasten, den Stammzellen des ZNS .....	55
3.1.3 Analyse der subzellulären Lokalisation des full-length Baz-Proteins und mutanter Baz-Proteine in Follikelzellen.....	61
3.1.4 Ein dominanter Phänotyp durch Überexpression von Baz während der Augenentwicklung .....	69
<b>3.2 Untersuchungen im für <i>baz</i> mutantern Hintergrund</b> .....	<b>76</b>
3.2.1 Verteilung des Baz-Proteins in hemizygoten <i>baz</i> mutanten Embryonen.....	78
3.2.2 Subzelluläre Analyse der Rettung des <i>baz</i> <sup>XR11</sup> mutanten Phänotyps.....	79
3.2.3 Subzelluläre Analyse der Rettung des <i>baz</i> <sup>815-8</sup> mutanten Phänotyps .....	84
3.2.4 Kutikula Präparate von mutanten <i>baz</i> -Allelen und von Rettungskreuzungen .....	87
3.2.5 Die Überlebensraten der <i>baz</i> <sup>-</sup> -Allele und der Rettungskreuzungen .....	93
3.2.6 Rettung des hemizygot letalen <i>baz</i> -Phänotyps bis hin zum adulten Tier.....	94
3.2.7 Sequenzierung mutanter <i>baz</i> -Allele .....	96
<b>4 Diskussion</b> .....	<b>98</b>
<b>4.1 Kontrolle der subzellulären Lokalisation von Baz in Epithelien und Neuroblasten</b> ....	<b>98</b>
<b>4.2 Für die polare Verteilung von Baz entlang der Plasmamembran in Epithelien und am Zytokortex von Neuroblasten sind die zweite und dritte PDZ-Domäne von Baz erforderlich</b> .....	<b>103</b>
<b>4.3 Die erste PDZ-Domäne ist für die Lokalisation von Baz im Zytokortex von Epithelien und Neuroblasten entbehrlich</b> .....	<b>104</b>
<b>4.4 Unterschiedliche Anforderungen an die N-terminalen AS 1-290 von Baz in verschiedenen Zelltypen von <i>Drosophila melanogaster</i></b> .....	<b>104</b>
<b>4.5 Die Verteilung des Baz-Proteins in verschiedenen <i>baz</i><sup>-</sup>-Allelen sowie kutikuläre <i>baz</i><sup>-</sup> - Phänotypen im Kontext der Sequenzdaten</b> .....	<b>107</b>
<b>4.6 Rettung des kutikulären <i>baz</i><sup>XR11</sup> - und des <i>baz</i><sup>815-8</sup>-Phänotyps</b> .....	<b>109</b>
<b>4.7 Die Rettung des hemizygot letalen <i>baz</i><sup>XR11</sup> - und des <i>baz</i><sup>815-8</sup>-Phänotyps bis hin zur adulten Fliege</b> .....	<b>110</b>
<b>4.8 Erzeugung dominanter Phänotypen durch Überexpression von Baz während der Augenentwicklung</b> .....	<b>111</b>
<b>5 Zusammenfassung</b> .....	<b>114</b>
<b>6 Literatur</b> .....	<b>116</b>
<b>7 Anhang</b> .....	<b>126</b>

# 1 Einleitung

In vielzelligen Lebewesen (Metazoen) werden die meisten einzelnen Zellen zu Geweben (Zellverbänden) zusammengefasst. Auf einer höheren Ebene verbinden sich verschiedene Gewebearten dann zu Organen.

Im Epithelgewebe sind die einzelnen Zellen fest miteinander verbunden und bilden Lagen. Die Epithelien kleiden Hohlräume aus und fungieren als Abschlussgewebe des Körpers. Je nach Spezialisierung üben sie verschiedene Aufgaben aus. So übernimmt die Epidermis der Haut Schutzfunktionen, das Darmepithel die Resorption der Nahrung, die Sinnesepithelien die Reizaufnahme und die Drüsenepithelien die Sekretion. Diese Aufgaben lassen sich vereinfacht in zwei grundlegende Funktionen der Epithelien einteilen: Sie grenzen Kompartimente voneinander ab und sie kontrollieren den Austausch von Molekülen und Ionen (Barrierefunktion). Ihr polarisierter Phänotyp und ihre Zell-Zell-Kontaktstrukturen ermöglichen den Epithelzellen, ihre spezialisierten Funktionen zu erfüllen (Knust & Bossinger, 2002).

Das embryonale Zentralnervensystem (ZNS) in Insekten entwickelt sich aus einer bilateralen, zweidimensionalen Schicht von Zellen, dem Neuroektoderm, von dem aus die multipotenten Stammzellen, die Neuroblasten (NB), delaminieren (Wheeler, 1891). Das Neuroektoderm ist eine epitheliale Zellschicht im Embryo z. B. von *Drosophila melanogaster*, aus dem sich die NB, die Vorläuferzellen des ZNS, entwickeln können. Sie sind ebenfalls wie die Epithelzellen polar aufgebaut. Im Gegensatz zu Epithelzellen teilen sie sich nicht symmetrisch sondern asymmetrisch (Wodarz & Huttner, 2003). Asymmetrische Zellteilungen sind während der Entwicklung der meisten Organismen von substantieller Bedeutung und ermöglichen die Erzeugung verschiedener Zelltypen. Damit sich eine Zelle asymmetrisch teilen kann, etabliert sie eine Polaritätsachse, orientiert ihre Spindel entlang dieser Achse und lokalisiert Zellschicksalsdeterminanten auf einer Seite der Zelle. Nach der Zytokinese erhält nur eine der beiden Zellen die Determinanten, die ihre weitere Entwicklung bestimmen (Horvitz & Herskowitz, 1992; Betschinger & Knoblich, 2004).

Wie wird die Etablierung und Aufrechterhaltung der Polarität in Epithelien und Neuroblasten sowie die asymmetrische Teilung in den Vorläuferzellen des ZNS in *Drosophila* gewährleistet? Welches sind die zellulären, genetischen und molekularen Mechanismen, die

die Polarität und asymmetrische Zellteilung kontrollieren? Die Beantwortung dieser Fragen ist ein zentraler Forschungsgegenstand der Entwicklungs- und Zellbiologie.

## 1.1 Epithelien

### 1.1.1 Polarität in Epithelien

Die Polarität einer Epithelzelle zeigt sich in der polar organisierten Plasmamembran, der asymmetrischen Verteilung von zellulären Komponenten/Organellen und in der polaren Organisation des Zytoskeletts. Die Plasmamembran der Epithelzelle teilt sich in einen apikalen und in einen basolateralen Bereich. Die apikale Membrandomäne ist nach außen oder zu einem Lumen hin gerichtet, während die basolaterale Membrandomäne mit ihren Nachbarzellen und dem darunter liegenden Gewebe in Kontakt steht (Knust & Bossinger, 2002).

Die verschiedenen Membrandomänen weisen eine unterschiedliche Protein- und Lipidzusammensetzung auf. Zum Beispiel befinden sich in der apikalen Membran, in den epithelialen Tight Junctions von Vertebraten, verschiedene integrale Membranproteine, wie Occludin (Furuse et al., 1993), Mitglieder der Claudin-Familie (Furuse et al. 1998; Morita et al., 1999) und Junctional adhesion molecule (JAM-1), das zur Immunglobulin-Großfamilie gehört (Martin-Padura et al., 1998; Liu et al., 2000). Die Zelladhäsion zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix erfolgt weitgehend durch Mitglieder der Integrin-Familie. Hierbei handelt es sich um heterodimere Transmembranrezeptoren (Hynes, 1992; Gumbiner, 1996; Brown et al., 2000; De Arcangelis & Georges-Labouchesse, 2000). In der apikalen Membran findet man Glycosphingolipide und in der basolateralen Membran Phosphatidylcholine (Eaton & Simons, 1995; Simons, 1995).

Zwei Mechanismen tragen zur polarisierten Verteilung von Plasmamembranproteinen bei: Der erste Mechanismus ist der zielgerichtete Transport ('selective targeting'), bei dem die neu synthetisierten Membranproteine im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) sortiert und dann zielgerichtet in Vesikeln zu einer der beiden Membrandomänen transportiert werden. Internalisierte Proteine werden in Endosomen sortiert, bevor sie an die entsprechende Membrandomäne transportiert werden. Der zweite Mechanismus ist die selektive Stabilisierung ('selective stabilization'). Hier werden die Proteine zu beiden Membrandomänen transportiert, aber sie werden nur an der für sie spezifischen Domäne durch die Interaktion mit dem Zytoskelett stabilisiert. Die nicht stabilisierten Proteine werden zu den Lysosomen transportiert, wo sie dann abgebaut werden (Matter, 2000).

Beim Transport von Vesikeln zwischen dem TGN und der apikalen Membran spielen Mikrotubuli eine Rolle. Sie sind entlang der apikobasalen Achse der Zelle angeordnet, d. h. sie laufen parallel zur lateralen Plasmamembran. Ihre Plus-Enden befinden sich im basalen Zytoplasma, entsprechend liegen die Minus-Enden im apikalen Bereich (Drubin & Nelson 1996). Die polare Organisation des Zytoskeletts wird auch an einem zweiten zytoskeletalen Bestandteil sichtbar: Aktinfilamente (Mikrofilamente) sind in kreisförmigen Bündeln im apikalen Teil von Epithelzellen vorhanden. Sie sind Teil des Adhäsionsgürtels (Zell-Zell-Adhäsionskontakte = ZA oder 'zonula adherens') (Gumbiner, 1996).

### 1.1.2 Zell-Zell-Kontakturen in Epithelien

Verschiedene Zell-Zell-Kontaktstrukturen, die sich entlang der basolateralen Oberfläche von Epithelzellen befinden, garantieren die Adhäsion zwischen den Zellen und ermöglichen die charakteristische epitheliale Barrierefunktion (Knust & Bossinger, 2002).

In Epithelien existieren verschiedene Zell-Zell-Verbindungsstrukturen (Abb. 1.1):

1. Die Zell-Zell-Adhäsionskontakte ('zonula adherens', ZA) zählen zu den Haftverbindungen, die in den Epithelien apikal in einem ringförmigen Gürtel, unterhalb der Tight Junctions (TJ), angeordnet sind, d. h. sie liegen an der Grenze zwischen apikaler und basolateraler Membrandomäne. Die Zell-Zell-Adhäsionskontakte sind für die feste Verbindung der benachbarten Zellen zuständig. Erreicht wird dies durch die Interaktion des Cadherin-Catenin-Komplexes. E-Cadherin geht eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige homophile Interaktion ein und verbindet so benachbarte Zellen miteinander. Mit seiner zytoplasmatischen Domäne bindet es an  $\beta$ -Catenin.  $\alpha$ -Catenin existiert als ein Monomer oder als ein Homodimer mit jeweils verschiedenen Bindeeigenschaften. Als Monomer bindet es stärker an den E-Cadherin- $\beta$ -Catenin-Komplex und als Homodimer bevorzugt es die Bindung an Aktin-Filamente. Eine gleichzeitige Bindung von  $\alpha$ -Catenin an die Aktin-Filamente und an den E-Cadherin- $\beta$ -Catenin-Komplex findet nicht statt. Es handelt sich vielmehr um einen dynamischen Prozess. Unterschiedliche molekulare Konformationen sind mit diesen verschiedenen Bindezuständen assoziiert, wodurch sich  $\alpha$ -Catenin als ein allosterisches Protein auszeichnet.  $\alpha$ -Catenin reguliert direkt die Organisation der Aktin-Filamente durch die Unterdrückung von Arp2/3 vermittelter Aktin-Polymerisation (von Steinberg & McNutt, 1999; Yamada et al., 2005; Dress et al., 2005). In *Drosophila* besteht der E-Cadherin- $\beta$ -Catenin-Komplex aus Shotgun (Shg) (DE-Cadherin) und Armadillo (Arm) ( $D\beta$ -Catenin) (Cox et al., 1996a; Grawe et al., 1996; Müller & Wieschaus, 1996;

Tepass et al., 1996). In *C. elegans* gibt es nur eine dreigeteilte Zell-Zell-Kontaktstruktur, die so genannte apikale *C. elegans* Junction (CeAJ). Sie ähnelt der ZA von *Drosophila* und von Vertebraten (Knust & Bossinger, 2002).

2. Bei den Tight Junctions (TJ) handelt es sich um Verschlusskontakte, die in einem Gürtel am Übergang zwischen apikaler und basolateraler Membrandomäne angeordnet vorliegen und auch als 'zonula occludens' (ZO) bezeichnet werden. Es sind spezialisierte Strukturen, die eine Rolle in der Zellpolarität spielen, indem sie eine Diffusionsbarriere, sowohl zwischen den Zellen in der epithelialen Zellschicht, als auch innerhalb der Plasmamembran bilden, so dass die apikalen und basolateralen Membrankomponenten auf ihre Bereiche beschränkt bleiben (Izumi et al., 1998; Balda und Matter, 1998). Die TJ kommen in den Epithelien von Vertebraten vor. In *Drosophila* hingegen sind sie nicht zu finden. Allerdings befindet sich in *Drosophila*, apikal der ZA, dort wo in den Vertebraten die TJ liegen, die subapikale Region (SAR). Hier sind Proteinkomplexe lokalisiert, die in den epithelialen Vertebraten-Zellen mit den TJ kolokalisieren (Knust & Bossinger, 2002).
3. Die Septate Junctions (SJ) lokalisieren basal der ZA und erstrecken sich über einen größeren lateralen Bereich. Sie üben eine Barrierefunktion aus. Discs large (Dlg) ist das erste SJ-Protein, das in *Drosophila* identifiziert wurde (Woods & Bryant, 1991).

## 1.2 Zellpolarität und Asymmetrische Teilung

### 1.2.1 Die asymmetrische Teilung der Zygote bei *Caenorhabditis elegans*

Die Zygote von *C. elegans* (P0-Zelle), eines der besten Modellsysteme für die Etablierung der Zellpolarität und der asymmetrischen Zellteilung, teilt sich entlang der anterior-posterioren Achse asymmetrisch und erzeugt so eine größere, anterior gelegene Zelle (AB-Zelle) und eine kleinere, posterior gelegene Zelle (P1). Die AB-Zelle teilt sich anschließend symmetrisch und senkrecht zur Teilungsachse der P0-Zelle. Sie bildet hauptsächlich ektodermale Zellen. Anders verhält es sich bei der P1-Zelle. Sie teilt sich asymmetrisch und parallel zur Teilungsachse der Zygote und erzeugt das Mesoderm, das Endoderm und die Keimbahnzellen. Sowohl die P1-Zelle als auch ihre Nachkommen durchlaufen wiederholt asymmetrische Teilungen, die zum größten Teil für die Bildung der verschiedenen Gewebe und Organe im frühen *C. elegans* Embryo verantwortlich sind (Doe & Bowerman, 2001).

In den achtziger Jahren wurde in einem 'Screen' nach maternal letalen Mutanten gesucht, in denen der Prozess der frühen asymmetrischen Teilungen der Zygote von *C. elegans* gestört war. Sie zeigten mutante Phänotypen, wie die Fehlverteilung der P-Granula und eine

symmetrische, statt einer asymmetrischen Teilung (Kemphues et al., 1988). Dabei wurden Gene identifiziert, die für den Ablauf der frühen asymmetrischen Zygotenteilung verantwortlich waren. Sie wurden als *par*-Gene (*par-1* bis *par-6*) bezeichnet, wobei *par* für 'partitioning-defective' steht (Kemphues et al., 1988). Später wurde *pkc-3*, ein siebtes Mitglied in dieser Gruppe, aufgrund seiner Homologie zu einer atypischen Proteinkinase C (aPKC) identifiziert (Tabuse et al., 1998). Die für die asymmetrische Teilung der *C. elegans* Zygote notwendigen *par*-Gene wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen kloniert: PAR-1 und PAR-4 sind Serin/Threonin-Kinasen, PAR-2 ist ein Protein mit einem RING-Finger Motiv, PAR-3 ist ein PDZ-Protein mit drei evolutionär konservierten Bereichen (CR1-CR3), PAR-5 ist ein phosphoserin-bindendes 14-3-3 Protein und bei PAR-6 handelt es sich um ein PDZ-Protein, das über ein semi-CRIB Motiv sowie über eine PB1-Domäne verfügt. Es konnte festgestellt werden, dass, mit Ausnahme von PAR-2, zu allen PAR-Proteinen von *C. elegans* homologe PAR-Proteine in anderen Arten existieren (Levitan, 1994; Etemad-Moghadam et al., 1995; Guo & Kemphues, 1995; Watts et al., 1996; Hung & Kemphues, 1999; Watts et al., 2000; Morton et al., 2002; Macara, 2004b; Suzuki & Ohno, 2006). Im Besonderen wurden Bazooka/PAR-3 in *Drosophila* und ASIP (atypical protein kinase C (aPKC) - specific interacting protein)/PAR-3 in Säugern als Homologe zu PAR-3 in *C. elegans* identifiziert (Kuchinke et al., 1998; Izumi et al., 1998). Im weiteren Verlauf wurden sowohl ein Homolog der aPKC in *Drosophila*, DaPKC, identifiziert (Wodarz et al., 2000), als auch Homologe in *Drosophila* und in Säugern zu einem weiteren PAR-Protein, PAR-6 (Petronczki & Knoblich, 2001; Joberty et al., 2000). Es stellte sich heraus, dass die drei Proteine PAR-3, PAR-6 und aPKC einen evolutionär konservierten Komplex, den PAR/aPKC-Komplex, bilden, der für die Etablierung der Zellpolarität in einer Vielzahl von biologischen Systemen notwendig ist. Dazu gehören die asymmetrische Zellteilung im frühen *C. elegans* Embryo und in den Neuroblasten von *Drosophila*, die Etablierung und Aufrechterhaltung der apikobasalen Polarität in Epithelzellen von *Drosophila* und von Säugern und die Bildung von Zell-Zell-Kontaktstrukturen (Ohno, 2001). Der evolutionär konservierte PAR/aPKC-Komplex konnte sowohl in Invertebraten (Beispiele: Fliege und Wurm) als auch in Vertebraten (Beispiele: Maus, Zebrafisch, Frosch und Mensch) nachgewiesen werden (Ohno, 2001; Wodarz, 2002; Suzuki & Ohno, 2006). Im weiteren Verlauf wird auf die Funktionen des PAR/aPKC-Komplexes in Epithelien und in NB sowie auf seine Interaktionen mit weiteren Proteinkomplexen näher eingegangen, bevor die molekularen Interaktionen innerhalb des PAR/aPKC-Komplexes besprochen werden. Im Anschluss daran folgen einige modellhafte Überlegungen zur Polarisierung des PAR/aPKC-

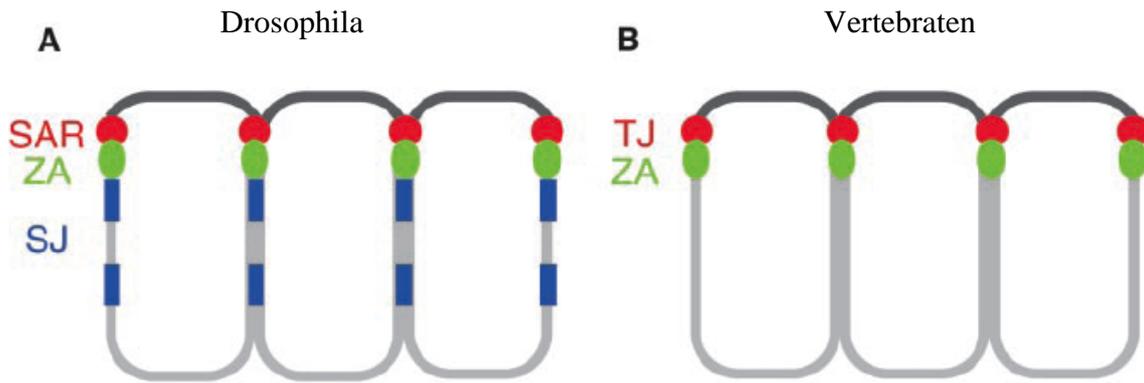
Komplexes und abschließend befasst sich das Kapitel 1.3 mit der Struktur von Baz, das Gegenstand dieser Arbeit ist.

### **1.2.2 Der PAR/aPKC-Komplex als integrierter Bestandteil eines Netzwerks von Protein-Protein-Interaktionen mit anderen Proteinkomplexen zur Regulierung epithelialer Zellpolarität und Bildung von Zell-Zell-Kontaktstrukturen**

Die Funktionalität von Epithelien wird durch ihren polarisierten Phänotyp und durch die Bildung von Zell-Zell-Verbindungsstrukturen gewährleistet. Die Polarität einer Epithelzelle zeigt sich an der asymmetrischen Verteilung von zellulären Komponenten/Organellen, in der polaren Organisation des Zytoskeletts und in der polar organisierten Plasmamembran (Knust & Bossinger, 2002). Die basolaterale Membran von Epithelzellen enthält, neben apikalen und basolateralen Abschnitten, distinkte Bereiche, wie die TJ und die ZA (Bilder et al., 2003).

Kürzlich wurden in *Drosophila* Interaktionen zwischen den Genen entdeckt, die sowohl für die Bildung von Zell-Zell-Kontaktstrukturen, wie der ZA, als auch für die Kontrolle der Zellpolarität notwendig waren (Bilder et al., 2003; Tanentzapf & Tepass, 2003; Johnson & Wodarz, 2003). Diese Gene können in drei Gruppen eingeteilt werden: Die *bazooka*-Gruppe, die aus den Genen *bazooka* (*baz*), *Drosophila atypical protein kinase C* (*DaPKC*) und *DmPAR-6* besteht; die *crumbs*-Gruppe, zu der *crumbs* (*crb*) und *stardust* (*sdt*) zählen; sowie die *discs large*-Gruppe, zu der die drei Tumorsuppressorgene: *discs large* (*dlg*), *scribble* (*scrib*) und *lethal giant larvae* (*lgl*) gehören. Alle acht Gene kodieren für Proteine, deren Homologe in Säugern und anderen Spezies konserviert sind. Außer Crumbs, bei dem es sich um ein Transmembranprotein handelt, sind die übrigen zytoplasmatische Proteine, die über eine Vielzahl von verschiedenen Protein-Protein-Interaktionsdomänen verfügen. Fünf der zytoplasmatischen Proteine besitzen mindestens eine PDZ-Domäne. Dieses Proteinmotiv (Abschnitt 1.3) findet man in Proteinen, die sich an interzellulären Junctions oder Synapsen zu Multiproteinkomplexen gruppieren können (Johnson & Wodarz, 2003). Die Entdeckung dieser Interaktionen zwischen den Gruppen brachte die Forschung einen erheblichen Schritt vorwärts. Doch wo genau lokalisieren diese Proteinkomplexe und wie sieht ihr Zusammenspiel aus?

Die *baz*-Gruppe kodiert für die Komponenten des PAR/aPKC-Komplexes, auf den im weiteren Verlauf näher eingegangen wird. Der PAR/aPKC-Komplex und die Produkte der *crb*-Gruppe lokalisieren an der apikalen Plasmamembran und sind in der subapikalen Region (‘subapical region’, SAR) konzentriert (Müller, 2000; Wodarz et al., 2000; Petronczki & Knoblich, 2001; Bachmann, 2001; Hong et al., 2001).



**Abb. 1.1 Zell-Zell-Kontaktstrukturen in Epithelzellen von *Drosophila* und von Vertebraten**

Die schematische Darstellung der Epithelzellen von *Drosophila* (A) und von Vertebraten (B) zeigt vergleichend die Anordnung der Zellkontaktstrukturen und der subapikalen Region (SAR). In der SAR lokalisieren die Produkte der *bazooka*-Gruppe (*baz*) und die der *crumbs*-Gruppe (*crb*). Die Produkte der *discs large*-Gruppe (*dlg*) sind in den Septate Junctions (SJ) zu finden. Die farbliche Darstellungen der Membranbereiche vermitteln die jeweils gleiche Proteinzusammensetzung. Ausnahme: In den Vertebratenzellen existieren keine SJ. Dennoch lokalisiert basal der ZA wie in *Drosophila*, auch in Vertebraten der Dlg-Komplex. (TJ: Tight Junctions) (entnommen aus: Knust & Bossinger, 2002).

Als SAR bezeichnet man den unmittelbar apikal der ZA gelegenen Teil der Plasmamembran in den ektodermalen Epithelzellen von *Drosophila*. Sie korrespondiert in ihrer Position, in der Proteinkomposition und sogar in einigen funktionellen Aspekten mit der TJ in Vertebraten (Müller, 2000; Johnson & Wodarz, 2003). Basal der ZA lokalisieren die Produkte der *dlg*-Gruppe. In *Drosophila* liegen die SJ basal der ZA und bilden eine Region mit Plasmamembrankontakten, die sich über einen längeren Bereich der lateralen Membrandomäne erstrecken (Knust & Bossinger, 2002). Die Abb. 1.1 gibt die Organisation der Epithelzellen in Bezug auf die Zell-Zell-Kontaktstrukturen wieder.

Embryonen, die weder über maternal noch zygotisch exprimiertes Baz verfügen, weisen während der Gastrulation in *Drosophila* eine Störung in den Zell-Zell-Kontaktstrukturen auf. Zudem zeigt sich das einschichtige Epithelgewebe so beeinträchtigt, dass sich eine vielschichtige Epidermis bildet (Müller & Wieschaus, 1996). Weiterhin wurde in *baz* Mutanten eine Reduzierung apikaler Polaritätsmarker beobachtet (Bilder et al., 2003). Später in der Entwicklung der Embryonen sterben die meisten epidermalen Zellen durch Apoptose. Einen ähnlichen Phänotypen beobachtet man in *DaPKC* und *DmPAR-6* mutanten Embryonen (Wodarz et al., 2000; Petronczki & Knoblich, 2001; Johnson & Wodarz, 2003; Rolls et al., 2003). Genetische Studien, in denen mutante Phänotypen und Epistasie-Experimente analysiert werden, ermöglichen es, in Bezug auf die Interaktionen zwischen den Gruppen folgendes Modell zu erstellen: Der PAR/aPKC-Komplex steht an der Spitze der Hierarchie,

die Bildung der ZA zu initiieren und die apikale Polarität zu etablieren. Die Proteine der Dlg-Gruppe, die unabhängig an den basolateralen Zytokortex rekrutiert werden, wirken dieser Aktivität entgegen. Der PAR/aPKC-Komplex ist sowohl für die Restriktion der Dlg-Gruppe an die basolaterale Membran notwendig, als auch für die stabile apikale Lokalisation des Crb-Komplexes erforderlich. Umgekehrt stabilisiert der Crb-Komplex die subapikale Lokalisierung des PAR/aPKC-Komplexes während der späten Gastrulation. Crb und Sdt unterdrücken die antagonistischen Effekte der Dlg-Gruppe auf den PAR/aPKC-Komplex (Bilder et al., 2003; Tanentzapf & Tepass, 2003; Johnson & Wodarz, 2003; Hutterer et al., 2004). Diese drei Komplexe sind in vielen Metazoen zu finden und ihre konservierte Rolle in der Organisation epithelialer Membrandomänen wurde in vielen Studien deutlich. Darüber hinaus wurden homologe Proteine dieser drei Gruppen beim Menschen entdeckt, die z. B. an der Entstehung von Krebs beteiligt sein können (Bilder et al., 2003).

### **1.2.3 Die asymmetrische Teilung der Neuroblasten in *Drosophila melanogaster***

Das ZNS in *Drosophila* entwickelt sich aus neuronalen Vorläuferzellen, den sogenannten Neuroblasten (NB). Die NB der ventralen neurogenen Region (VNR), die sich zum ventralen Nervenstrang entwickeln, delaminieren nach der Bildung des zellulären Blastoderms aus dem neuroektodermalen Epithel in das Innere des Embryos, wo sie zwischen der Epidermis und dem Mesoderm verbleiben. Damit sich aus den ektodermalen Zellen Neuroblasten entwickeln, wird die Aktivität proneuraler Gene benötigt. Kurz nach der Delamination beginnen sich die NB asymmetrisch zu teilen. Dabei erzeugen sie bei jeder einzelnen Teilung wieder einen NB und eine Gangliemutterzelle (GMZ). Die Zellschicksalsdeterminanten, die während der Mitose basal am Zytokortex lokalisiert sind, gelangen ausschließlich in die GMZ. Während der größere NB seine stammzellähnliche Teilung fortsetzt, teilt sich die kleinere GMZ nur noch einmal und erzeugt ein Paar Neuronen oder Gliazellen. (Campos-Ortega, 1993; Goodman and Doe, 1993, Wodarz und Huttner, 2003).

Während der Neuroblastenteilung (Metaphase) rotiert die mitotische Spindel um 90°. Die Teilungsachse liegt jetzt senkrecht zur Teilungsachse des neuroektodermalen Epithels (Kaltschmidt et al., 2000). Embryonale NB können sich mehr als zwölfmal teilen. Auf diese Weise produziert jeder NB eine spezifische Zelllinie (Bossing et al., 1996; Schmidt et al., 1997).

#### **1.2.4 Die Lokalisierung und Funktion des PAR/aPKC-Komplexes im Hinblick auf die Kontrolle der Polarität und der asymmetrischen Zellteilung in Neuroblasten von *Drosophila***

Der PAR/aPKC-Komplex kontrolliert die verschiedenen Phasen der asymmetrischen Teilung der Neuroblasten in *Drosophila*. In der ersten Phase wird die apikobasale Polarität der Neuroblasten (NB) in der Interphase etabliert. Es folgt in der zweiten Phase die asymmetrische Verteilung von Zellschicksalsdeterminanten und die Orientierung der mitotischen Spindel in der Pro- und Metaphase. Die dritte Phase ist durch die Erzeugung der Asymmetrie in der Spindel und in der Bildung von zwei unterschiedlich großen Tochterzellen in der Ana- und Telophase gekennzeichnet (Betschinger & Knoblich, 2004; Wodarz, 2005). Die Regulierung dieser verschiedenen Phasen benötigt nicht nur den PAR/aPKC-Komplex. Viele Studien der vergangenen Jahre verdeutlichen, dass ein Zusammenspiel verschiedener Proteinkomplexe sowohl die Polarität der Epithelien kontrolliert, als auch die der NB (Wodarz, 2005).

Bevor der NB ins Innere des Embryos delaminiert, ist er in das neuroektodermale Epithel integriert und mit den benachbarten Epithelzellen durch Zell-Zell-Adhäsionskontakte (ZA) verbunden. Delaminiert der NB dann aus der Epidermis heraus, lösen sich diese Kontakte, der NB verändert seine Form und bewegt sich basal in das Innere des Embryos. Kurzzeitig verbleibt noch ein apikaler Stiel des NB zwischen den Epithelzellen (Betschinger & Knoblich, 2004; Wodarz, 2005). Während der Delamination und der anschließenden Zellteilung behält der NB seine apikobasale Polarität bei. Sichtbar wird dies an der polarisierten Verteilung von Proteinen und mRNAs am apikalen oder basalen Kortex des NB (Wodarz, 2005). Solange der apikale Stiel noch vorhanden ist, lokalisieren dort die Proteine des PAR/aPKC-Komplexes. Nach der vollständigen Delamination des NB bleiben diese Proteine am apikalen Kortex und bilden eine halbmondförmige Struktur.

Mutationen in den Genen des PAR/aPKC-Komplexes führen zum Verlust der apikobasalen Polarität in NB. Als Folge davon können die sonst basal am Zellkortex lokalisierten Determinanten, wie Prospero (Pros) und Numb, sowie ihre Adapterproteine Miranda und Partner of Numb, nicht mehr asymmetrisch verteilt werden. Darüber hinaus verliert die Spindel ihre korrekte Orientierung (Kuchinke et al., 1998; Schober et al., 1999; Wodarz et al., 1999, Wodarz et al., 2000; Petronczki & Knoblich, 2001; Rolls et al., 2003).

Die drei Tumorsuppressorproteine Lethal giant larvae (Lgl), Discs large (Dlg) und Scribble (Scrib) sind wie die PAR/aPKC-Proteine für die basale Lokalisierung der Zellschicksalsdeterminanten notwendig (Oshiro et al., 2000; Peng et al., 2000; Albertson & Doe, 2003).

Alle drei Tumorsuppressorproteine sind am gesamten Zellkortex lokalisiert, sie werden nicht apikal ausgeschlossen und sie wirken nicht der apikalen Lokalisierung der PAR/aPKC-Proteine entgegen (Ohno, 2006). DaPKC bindet direkt an Lgl und phosphoryliert das Protein an drei evolutionär konservierten Serin-Resten. Durch diese Phosphorylierung wird Lgl am apikalen Neuroblastenkortex inaktiviert. Somit kann Lgl die kortikale Lokalisierung von Determinanten nur am basalen Neuroblastenkortex ermöglichen, wo kein DaPKC vorhanden ist (Betschinger et al., 2003). Die Phosphorylierung von Lgl führt zu einer Konformationsänderung des Proteins, wodurch die Verbindung von Lgl mit dem Zytoskelett verhindert wird (Betschinger et al., 2005).

Ein weiteres Protein, das ebenfalls wie der PAR/aPKC-Komplex eine apikale halbmondförmige Struktur am Kortex der NB bildet und sowohl für die Spindelorientierung als auch für die asymmetrische Lokalisierung von Determinanten notwendig ist, ist Inscuteable (Insc) (Kraut et al., 1996; Kraut & Campos-Ortega, 1996). Die Lokalisierung von Insc hängt von Bazooka/PAR-3 ab (Wodarz et al., 1999; Schober et al., 1999). Es wurde gezeigt, dass Baz an Insc bindet (Schober et al., 1999). Insc wird im Gegensatz zum PAR/aPKC-Komplex nicht in neuroektodermalen Epithelzellen exprimiert (Kraut et al., 1996). Mit Beginn der Delamination des NB wird Insc aufgrund seiner Bindung an den PAR/aPKC-Komplex an den apikalen Kortex rekrutiert (Kraut et al., 1996; Schober et al., 1999; Wodarz et al., 1999; Wodarz et al., 2000; Petronczki & Knoblich, 2001). Partner of Inscuteable (Pins) bindet gleichzeitig an Insc und an G $\alpha$ i, eine Untereinheit eines heterotrimerischen G-Proteins (Parmentier et al., 2000; Schaefer et al., 2000; Schaefer et al., 2001; Yu et al., 2000). Alle drei Proteine kolokalisieren mit den Komponenten des PAR/aPKC-Komplexes am apikalen Kortex der NB (Schober et al., 1999; Wodarz et al., 1999).

Es hat sich zum Einen gezeigt, dass in *insc*, *pins* und *G $\alpha$ i* mutanten NB die mitotische Spindel nicht ordnungsgemäß orientiert wird und zum Anderen, dass in diesen Mutanten, wie auch in denen des PAR/aPKC-Komplexes, die Zellgröße zwischen NB und GMZ nach wie vor unterschiedlich ist. In Kombinationen von Doppelmutanten hingegen, mit je einem Vertreter des PAR/aPKC-Komplexes einschließlich *insc* einerseits und des *pins/G $\alpha$ i*-Komplexes andererseits, sind die beiden Tochterzellen (NB/GMZ) gleich groß. Dies kann damit erklärt werden, dass die beiden Komplexe die Asymmetrie in der Zellgröße redundant steuern. Erst der gleichzeitige Ausfall beider Komplexe führte zu symmetrischen Teilungen (Cai et al., 2003; Wodarz, 2005). Der NB erzeugt seine Asymmetrie in der Zellgröße einerseits dadurch, dass die apikale Hälfte der mitotischen Spindel in der Anaphase länger wird als die basale

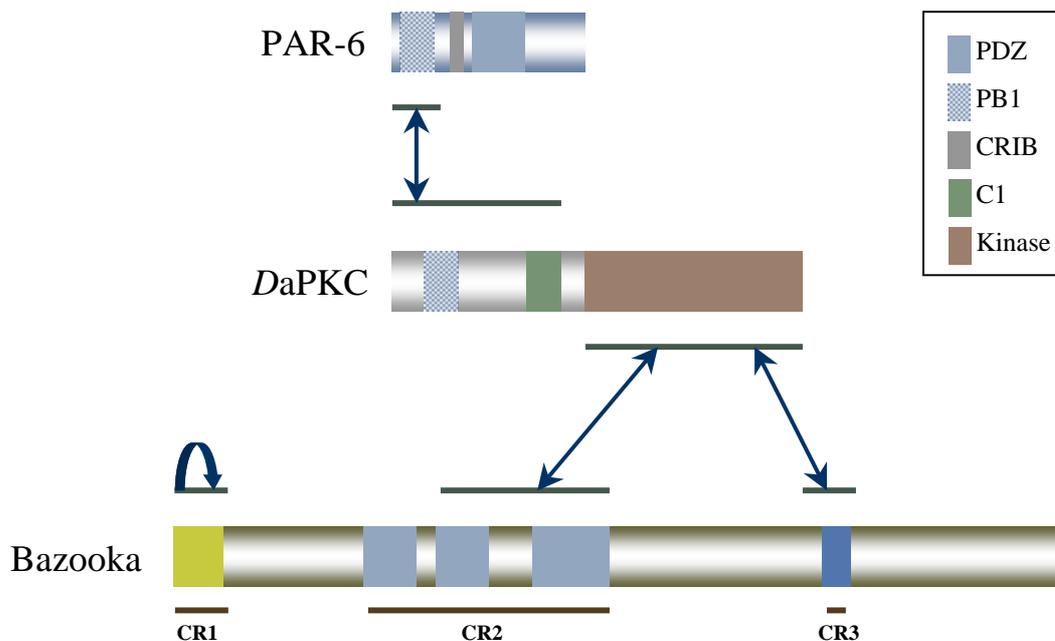


Bislang ist unbekannt, wie der PAR/aPKC-Komplex an den apikalen Kortex von NB rekrutiert wird. Die Pins/Göi-Proteine werden, nach der Lokalisierung des PAR/aPKC/Insc-Komplexes, von Insc an den apikalen Kortex rekrutiert (Betschinger & Knoblich, 2004). Siegrist & Doe (2005) zeigten, dass die Lokalisierung von Pins/Göi an den apikalen Kortex zusätzlich und unabhängig von Insc, während der Metaphase der NB erfolgen konnte. Hierbei induzierten astrale Mikrotubuli, Kinesin Khc-73 und Dlg die kortikale Polarisierung von Pins/Göi in NB. In der Abb. 1.2 wird schematisch die Delamination und die asymmetrische Teilung eines NB dargestellt.

### 1.2.5 Molekulare Interaktionen innerhalb des PAR/aPKC-Komplexes

Es konnte anhand von *in vivo* und von *in vitro* Analysen gezeigt werden, dass in *Drosophila* alle drei Proteine des PAR/aPKC-Komplexes direkt aneinander binden können. Zudem ist eine gegenseitige Abhängigkeit in ihrer asymmetrischen Lokalisierung sowohl in Epithelien als auch in Neuroblasten zu beobachten, d. h. fehlt eine Komponente des Komplexes, ist die asymmetrische Lokalisierung der beiden übrigen nicht mehr gegeben (Wodarz et al., 2000; Petronczki & Knoblich, 2001; Johnson & Wodarz, 2003; Hutterer et al., 2004; Egger-Adam, 2005). Bazooka/PAR-3 (Abb. 1.3 und Abb. 1.4) zeigt eine schwache Bindung mit seiner zweiten und dritten PDZ-Domäne an die Kinase-Domäne (KD) der DaPKC (Wodarz et al., 2000). Eine stärkere Bindung an die KD wird sichtbar, wenn ein kleines Baz-Konstrukt verwendet wird, das nur aus den AS 863-1097 besteht (CR3: AS 969-994) (Egger-Adam, 2005). Die Bindung von *Dm*PAR-6 an die DaPKC verläuft über die jeweilige PB1-Domäne, die beide Proteine im N-terminalen Bereich besitzen. Die PB1-Domäne der DaPKC liegt in der regulatorischen Domäne (RD) der Kinase (Petronczki & Knoblich, 2001; Johnson & Wodarz, 2003). Die ersten N-terminalen hundert AS von PAR-6 sind für die Bindung an die DaPKC ausreichend (Egger-Adam, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass Baz an sich selbst binden kann. In *in vivo* und *in vitro* Experimenten wurde festgestellt, dass der N-terminale Bereich von Baz (CR1) für diese Oligomerisierung notwendig ist. Fehlt der CR1 Bereich, wird die Lokalisation von Bazooka/PAR-3 sowohl in epithelialen Zellen als auch in der Keimbahn gestört. Des Weiteren wird die Funktion von Baz in Epithelzellen beeinträchtigt. Die Autoren schließen daraus, dass diese Domäne für die Lokalisation und Funktion des PAR/aPKC-Komplexes wichtig ist und folgern, dass hierdurch eine neue Rolle für Bazooka/PAR-3 in der Assemblierung von Proteinkomplexen einer höheren Ordnung definiert werden kann (Benton & St. Johnston, 2003a).

Auch in Vertebraten kann PAR-3 *in vivo* und *in vitro* mit seinem N-terminalen Bereich CR1 oligomerisieren (Mizuno et al., 2003). Die gegenseitige Abhängigkeit in der asymmetrischen Lokalisierung des PAR/aPKC-Komplexes wird auch in *C. elegans* und in Vertebraten beobachtet (Watts et al., 1996; Tabuse et al., 1998; Hung & Kemphues, 1999; Macara, 2004b; Nagai-Tamai et al., 2002; Ohno, 2001).



**Abb. 1.3 Proteindomänen und molekulare Interaktionen innerhalb des PAR/aPKC-Komplexes in *Drosophila***

Die Abbildung zeigt sowohl die direkten Interaktionen der Proteine des PAR/aPKC-Komplexes als auch die einzelnen Proteindomänen (in Anlehnung an: Johnson & Wodarz, 2003). Die direkte Bindung von PAR-6 mit Baz konnte, aufgrund der noch fehlenden Kenntnisse, welche Domänen beteiligt sind, nicht eingezeichnet werden. Erläuterungen zu den einzelnen Bindungen sind dem Text zu entnehmen und die Domänen werden rechts in dem eingerahmten Kasten aufgeführt. Eine detaillierte Beschreibung des Baz-Proteins, seiner evolutionär konservierten Bereiche (CR1-CR3) und der PDZ-Domänen befindet sich im Abschnitt 1.3. Im Folgenden werden die Proteindomänen weiterer PAR-Proteine aufgelistet: PAR-1: Ser/Thr Kinase, UBA; PAR-2: Zinkfinger; PAR-4: Ser/Thr Kinase; PAR-5: Phosphoserin-Bindung (Macara, 2004b).

Die Interaktionen der Komponenten des PAR/aPKC-Komplexes in Vertebraten entsprechen im Wesentlichen denen in *Drosophila*. Die aPKC (PKC $\lambda/\iota$ ) und PAR-6 binden ebenfalls über ihre N-terminal liegenden PB1-Domänen aneinander (Suzuki, 2001, 2003) und PAR-3 (ASIP = 'atypical PKC isotype-specific interacting protein') bindet an aPKC $\xi$ . Für diese Bindung ist bei PAR-3 (Ratte) der Bereich der AS 816-841 (CR3) notwendig und ausreichend. In diesem Abschnitt befinden sich konservierte Ser/Thr-Reste. Es wird jedoch nur ein Serin (S827) von der aPKC bevorzugt phosphoryliert. Das führt zur Reduzierung der Stabilität des PAR/aPKC-Komplexes. Eine Mutation von Serin zu Alanin verhindert die Phosphorylierung dieser

Sequenz, aber nicht die Bindung der aPKC an PAR-3 (Izumi et al., 1998; Nagai-Tamai, 2002). PAR-3 bindet mit seiner ersten PDZ-Domäne an die PDZ-Domäne von PAR-6 (Joberty et al., 2000; Lin et al., 2000). Die gegenseitige Abhängigkeit in der subzellulären Lokalisation innerhalb des PAR/aPKC-Komplexes in *Drosophila* findet man auch analog in den beiden anderen Gruppen Crb und Dlg (Johnson & Wodarz, 2003). Wie der PAR/aPKC-Komplex an die Membran verankert sein kann, zeigte sich in den Vertebraten. Zwei immunglobulinähnliche Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle, JAM-1 und Nectin, binden in den epithelialen TJ, bzw. in der ZA, an die erste PDZ-Domäne von PAR-3 und ermöglichen dadurch die Bindung an die Membran (Ebnet et al., 2001; Takekuni, 2003). In *Drosophila* sind noch keine Homologe zu JAM-1 und Nectin gefunden worden (Suzuki & Ohno, 2006).

### 1.2.6 Überlegungen zur Polarisierung des PAR/aPKC-Komplexes

In *Drosophila* besitzen die Weibchen zwei Ovarien mit je 15-17 Ovariolen-schläuchen, in denen sich die Follikel (Eikammern) bilden. Im anterioren Teil des Ovariolen-schlauchs, dem Germarium, beginnen sich die Eikammern zu entwickeln. Die Oogenese wird in vierzehn Stadien eingeteilt und beginnt mit vier mitotischen Teilungen der diploiden Oogonie, die sich aus einer Stammzelle gebildet hat. Es entstehen 15 Nährzellen und eine Oozyte, die durch Zytoplasmabrücken miteinander verbunden bleiben und eine Eikammer bilden, die von einem einschichtigen Epithel, dem Follikelepithel, umgeben ist (Spradling, 1993). Abb. 3.6 zeigt die schematische Darstellung von Eikammern (Stadium 8-10).

PAR-1, das ebenso wie der PAR/aPKC-Komplex für die epitheliale Polarität sowohl in *Drosophila* als auch in Säugern notwendig ist, lokalisiert entlang der lateralen Membran der Zellen des Follikelepithels und im posterioren Kortex der Oozyte (Böhm et al., 1997; Shulman et al., 2000; Cox et al., 2001b; Doerflinger et al., 2003). Benton & St. Johnston (2003b) zeigten, dass die Kinase PAR-1 Bazooka/PAR-3 an den Serinen S151 und S1085 phosphoryliert, wodurch zwei Bindestellen für ein 14-3-3-Protein (PAR-5) geschaffen wurden. 14-3-3-Proteine regulieren die Lokalisierung und Aktivität der verschiedenen Proteine, in dem sie als Dimer an konservierte Phosphoserin-enthaltende Motive binden (Fu et al., 2000). Die Bindung des 14-3-3-Proteins an die phosphorylierte AS S151, die in der Nähe der evolutionär konservierten CR1-Stelle liegt, verhindert die Oligomerisierung von Baz. Wohingegen die Bindung von 14-3-3 an die phosphorylierte AS S1085, die neben der CR3-Stelle lokalisiert ist, die Assoziation von Baz mit der DaPKC blockiert. Auf diese Weise induzierte PAR-1 die Destabilisierung des PAR/aPKC-Komplexes, wodurch der Komplex daran gehindert wurde, sich an der basolateralen Membran der Follikelzellen und im

posterioren Kortex der Oozyte anzulagern. Bazooka/PAR-3 bildete ektopisch laterale Komplexe, wenn die Serine, S151 und / oder S1085 zu nicht mehr phosphorylierbaren AS (S→A) verändert wurden (Benton & St. Johnston, 2003b).

Eine kleine GTPase, Cdc42, bindet an zwei nebeneinander liegende Domänen von PAR-6: das semi-CRIB Motiv und die PDZ-Domäne und hat sich als wichtiger Bestandteil in der Regulierung des Aktin-Zytoskeletts erwiesen (Joberty et al., 2000; Lin et al., 2000; Qiu et al., 2000; Gotta et al., 2001; Yamanaka et al., 2001; Garrard et al., 2003; Hutterer et al., 2004; Egger-Adam, 2005). Hutterer et al. (2004) zeigten in *Drosophila* die Bindung von Cdc42 an PAR-6, was Diane Egger-Adam (2005) bestätigen konnte. Diese Protein-Interaktion war für die apikale kortikale Lokalisierung von PAR-6 essentiell (Hutterer et al., 2004).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die apikale Lokalisation von Baz während der frühen embryonalen Entwicklung unabhängig von DaPKC und DmPAR-6 erfolgte und stattdessen von der Organisation des Zytoskeletts und dem Dynein-vermittelten Transport abhängig war (Harris & Pfeifer, 2005).

### 1.3 Die Struktur des *Drosophila* Proteins Bazooka

Das *bazooka*-Gen (*baz*), das für das PAR-3 Homolog in *Drosophila* kodiert, wurde bei der Suche nach zygotisch letalen Mutationen mit Defekten in der Kutikula identifiziert (Wieschaus et al., 1984, Kuchinke et al., 1998). Die Lokalisierung auf dem X-Chromosom wird bei 15E-F angegeben. Der von Kuchinke et al. isolierte cDNA-Klon (6761 Nukleotide) enthält das full-length-Transkript und zeigt ein offenes Leseraster von 4392 Nukleotiden, das für ein 1464 Aminosäure langes Protein (161 kDa) kodiert (Kuchinke et al., 1998).

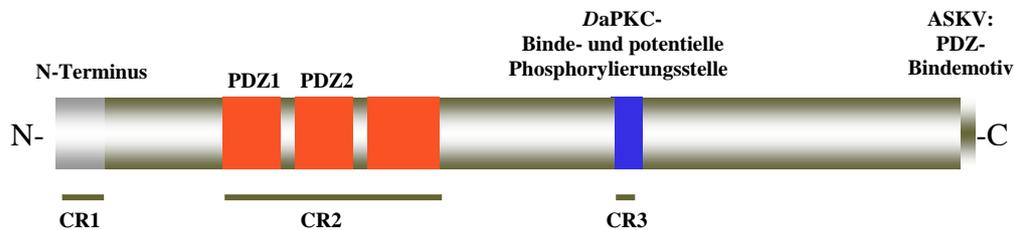
Das Protein Bazooka (Baz) besitzt drei Regionen, die zwischen den Homologen verschiedener Spezies (*Drosophila/C. elegans/Säugetiere*) evolutionär konserviert sind (CR: 'conserved regions') (Ohno, 2001):

**CR1:** Eine N-terminale Domäne, die keine Ähnlichkeit zu bereits bekannten Proteinmotiven enthält. [ AS 1-83 (Benton & St Johnston, 2003a)]

**CR2:** Drei PDZ-Domänen (Protein-Protein-Interaktionsmodule) [1. PDZ-Domäne: AS 321-396; 2. PDZ-Domäne: AS: 452-531; 3. PDZ-Domäne: AS: 633-736].

**CR3:** Eine Binde- und Phosphorylierungsstelle der aPKC (atypische Proteinkinase C) [AS 969-994 (Nagai-Tamai et al., 2002)]

Zusätzlich besitzt Bazooka ein C-terminales PDZ-Bindemotiv (ASKV), das sich nicht als evolutionär konserviert zwischen den Homologen herausgestellt hat. In der Abb. 1.4 ist die schematische Proteinstruktur mit den konservierten und nicht konservierten Bereichen von Bazooka dargestellt.



**Abb. 1.4 Die schematische Struktur des *Drosophila* Proteins Bazooka**  
Erläuterungen s. Text.

### PDZ-Domänen

PDZ-Domänen sind Protein-Protein-Interaktionsmodule, welche spezifisch kurze C-terminale Peptidmotive oder interne Sequenzen (Finger), die strukturell einem Peptidende ähneln, erkennen können. Dadurch haben sie die Möglichkeit, an spezifische Zielproteine zu binden oder ein verzweigtes Netzwerk durch Oligomerisierung zu bilden. Proteine, die PDZ-Domänen besitzen, sind meist am Aufbau von Multiproteinkomplexen (Proteingerüste: 'scaffolds') beteiligt, deren Funktion oft darin besteht, mehrere Komponenten eines Signaltransduktionsweges zusammenzubringen und eine räumliche Kompartimentierung der Signaltransduktion zu gewährleisten. Für eine effektive Signaltransduktion und Kommunikation der Zellen untereinander müssen Rezeptoren und nachgeschaltete Effektoren lokalisiert und organisiert werden. Beispiele finden sich u. a. in Photorezeptorzellen von *Drosophila* und in Synapsen von Säugern (Harris & Lim, 2001).

Der Name PDZ ergibt sich aus den ersten Proteinen, in denen man PDZ-Domänen fand: PSD-95 ('Post Synaptic Density'), DLG ('Discs Large') und ZO-1 ('Zonula Occludens 1'). Synonyme Bezeichnungen sind DHR-Domänen ('Discs Large Homology Repeat') und GLGF-Wiederholungen (nach der evolutionär konservierten GLGF-Aminosäuresequenz innerhalb dieser Domäne).

Manche PDZ-Proteine besitzen nur eine einzelne PDZ-Domäne, während andere 10 und mehr PDZ-Domänen aufweisen. Die meisten PDZ-Domänen sind etwa 90 Aminosäuren lang und weisen eine kompakte globuläre Konformation auf, so dass sich ihre N- und C-terminalen Enden sehr nahe kommen. Die Struktur der PDZ-Domäne besteht aus sechs  $\beta$ -Faltblättern

( $\beta$ A- $\beta$ F) und zwei  $\alpha$ -Helices ( $\alpha$ A und  $\alpha$ B) (Harris & Lim, 2001). Peptidliganden binden in eine ausgedehnte Furche zwischen dem  $\beta$ B und  $\alpha$ B. Diesen Mechanismus nennt man „zusätzliches- $\beta$ -Faltblatt“ (Harrison, 1996).

Je nach der Konsensussequenz, bzw. je nachdem PDZ-Bindemotiv werden PDZ-Domänen in verschiedene Klassen eingeteilt. Beispiele hierfür sind PDZ-Domänen vom Typ I und Typ II. Proteine mit PDZ-Domänen vom Typ I binden an C-terminale Peptide mit der Konsensussequenz Thr/Ser – X –  $\Phi$  – COOH (X = jede Aminosäure;  $\Phi$  = hydrophobe Aminosäure, gewöhnlich: Val, Ile oder Ala). Proteine mit PDZ-Domänen vom Typ II binden an C-terminale Peptide mit der Konsensussequenz  $\Phi$  – X –  $\Phi$  – COOH (X = jede Aminosäure;  $\Phi$  = hydrophobe Aminosäure, gewöhnlich: Val, Ile oder Ala) (Harrison, 1996).

## 1.4 Themenstellung

Bazooka/PAR-3, eine der drei Hauptkomponenten des PAR/aPKC-Komplexes, besitzt drei PDZ-Domänen. Diese Protein-Protein-Interaktionsmodule lassen vermuten, dass Bazooka eine Funktion als Gerüstprotein ausübt, sowohl in der Kontrolle der Zellpolarität als auch in der asymmetrischen Teilung von Neuroblasten. Weitere Bereiche des Proteins haben sich ebenso wie die PDZ-Domänen als evolutionär konserviert zwischen den verschiedenen Spezies herausgestellt. Dazu zählt der N-terminale Teil, der keine Ähnlichkeit zu bekannten Proteinmotiven aufweist und eine im C-terminalen Bereich gelegene DaPKC-Binde- und potentielle Phosphorylierungsstelle. Zusätzlich besitzt Bazooka ein nicht konserviertes PDZ-Bindemotiv.

Ziel dieser Arbeit war es mit einer Struktur- und Funktionsanalyse die Regionen von Bazooka zu identifizieren, die für seine korrekte Lokalisierung am apikalen Zytokortex von Neuroblasten und an der apikalen Plasmamembran von Epithelzellen notwendig sind. Des Weiteren sollte der Frage nachgegangen werden, wie sich der Verlust oder die Mutation spezifischer Domänen auf die Funktion von Bazooka in der Kontrolle der Zellpolarität und der asymmetrischen Zellteilung von Neuroblasten auswirkt.

Dazu wurden im ersten Schritt verschiedene durch *in vitro*-Mutagenese hergestellte Varianten von Bazooka in Fliegen transformiert, um sie *in vivo* analysieren zu können. Die ersten transgenen Linien stammen aus meiner Diplomarbeit (Fischer, 2001) und wurden in die vorliegenden Untersuchungen mit einbezogen.

Anhand von immunhistochemischen Experimenten wurden die mutanten Bazooka-Konstrukte auf ihre subzelluläre Lokalisation und Funktionalität, sowohl in einem wildtypischen, als auch

in einem für Bazooka mutanten Hintergrund analysiert. Rettungsexperimente gaben Aufschluss darüber, welcher Bereich ausreicht, den loss-of-function-Phänotyp von Bazooka zu retten und / oder die Überlebensrate zu erhöhen. Ein weiterer Ansatzpunkt, die mutanten Bazooka-Proteine auf ihre Funktionalität hin zu untersuchen, liegt in ihrer möglichen Fähigkeit durch Überexpression einen dominanten Phänotypen zu erzeugen. Als bewährte Methode wurde die Überexpression von mutanten Proteinen im Auge von *Drosophila* angewandt. Sequenzierungen verschiedener mutanter *baz*-Allele, die parallel zu den mutanten Bazooka-Proteinen analysiert wurden, erweiterten die Untersuchungen zur Struktur und Funktion von Bazooka. Die mutanten *baz*-Allele waren durch ionisierende Strahlung oder durch chemische Verbindungen entstanden. Aus diesem Grund ist die Gensequenz der mutanten *baz*-Allele nicht bekannt, im Gegensatz zu den Transgen-kodierten Baz-Proteinen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und sonstige Materialien

Alle benötigten Verbrauchskemikalien wurden in der Qualität 'pro analysis' (p.a.) von folgenden Firmen bezogen: *Acros*, Geel, Belgien; *Baker*, Deventer, Niederlande; *Biomol*, Hamburg; *Bio-Rad*, München; *Dianova*, Hamburg; *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 demineralisiertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) angesetzt und autoklaviert oder, falls dies nicht möglich war, sterilfiltriert.

Enzyme für molekularbiologische Arbeiten wurden, falls nicht anders erwähnt, von folgenden Firmen bezogen:

*Boehringer/Roche Diagnostics*, Mannheim; *MBI Fermentas*, St. Leon-Rot; *New England Biolabs*, Schwalbach/Taunus und *Promega*, Madison, USA

#### **Kitsysteme:**

- Nucleobond AX, *Macherey-Nagel*, Düren
- Nucleospin Extract Kit, *Macherey-Nagel*, Düren
- Jetquick Gel Extraction Spin Kit, *Genomed*, Bad Oeynhausen
- QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit #200518, *Stratagene*, LaJolla, Kalifornien
- DES® Inducible Kit, *Invitrogene*, Groningen, Niederlanden

#### **Fotoarbeiten:**

Röntgenfilm:	Fuji SuperRX, <i>Fuji</i> , Tokyo, Japan
Röntgenfilm-Entwickler:	Tenetal Roentogen, <i>Tenetal</i> , Norderstedt
Röntgenfilm-Fixierer:	Tenetal Roentogen Superfix, <i>Tenetal</i> , Norderstedt

#### **Bildbearbeitung:**

Fotolichtmikroskop:	Zeiss Axiophot 2, <i>Zeiss</i> , Oberkochen
Konfokales Mikroskop:	Leica TCS NT, <i>Leica</i> , Heidelberg

Computersystem:	Macintosh PowerPC, <i>Apple</i> , Ismaning
Computerprogramme:	Adobe Photoshop, <i>Adobe Systems</i> , San Jose, USA Canvas , <i>Deneba Systems</i> , Miami, USA PowerPoint, <i>Microsoft Corp.</i> , USA
Textverarbeitung:	Microsoft Word, <i>Microsoft Corp.</i> , USA

**Geräte:**

PCR-Maschine:	PCR-MJ Research PTC-20 Peltier Thermal Cycler, <i>Biozym Diagnostik</i> , Oldendorf
Zentrifugen:	Biofuge pico und Megafuge 1.0 R, <i>Heraeus Instruments</i> , Hanau
Photometer:	BIO Photometer, <i>Eppendorf</i> , Köln
Gene Pulser:	<i>BIO RAD</i> Pulse Controller Plus / Gene Pulser, Kalifornien
Mikromanipulator:	„ALGA“ Micrometer ALL-GLASS SYRINGE <i>BURROUGHS WELLCOME &amp; CO</i> , <i>Steinmeyer</i> , England
Mikroelektrodenpuller:	Model P-97 Flaming/Brown Micropipette Puller, <i>Sutter Instruments Co.</i> , USA
Mikroskop:	CWHK LOX/18L/OLYMPUS BH-2, <i>Olympus</i> , Japan
Kapillarschleifer:	Typ 462, <i>Backhofer</i> , Reutlingen
Rasterelektronenmikroskop:	1.) AMR1000, <i>Leitz</i> , Wetzlar 2.) LEO1430VP, <i>LEO Elektronenmikroskop GmbH</i> , Oberkochen

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

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

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte entweder unter Verwendung des Jetquick Gel Extraktion Spin Kits der Firma *Genomed*, Bad Oeynhausen oder des





### Abb. 2.2 'Multiple Cloning Site' im pUAST-FLAG-Epitop-Vektor

Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus dem pUAST-FLAG-Epitop-Vektor, in dem das FLAG-Epitop und die MCS dargestellt sind. Insbesondere sind die Restriktionsenzyme farblich markiert, die bei der Konstruktion der Baz-Konstrukte notwendig waren. EcoRI und NotI: Klonierung des FLAG-Epitops; NotI und KpnI (teilweise mit Hilfe von XhoI): Klonierung der einzelnen Baz-Konstrukte. Die Aminosäuren sind ab dem Translationsstart bis zur MCS angegeben.

#### 2.2.1.3 6.3 (-) – Vektor

Hierbei handelt es sich um das HindIII – cDNA-Fragment von Bazooka, welches in den pBluescript-Vektor kloniert wurde. Die Baz-cDNA (Accession: AJ130871 Kuchinke et al., 1998) wurde in den pBluescript-Vektor kloniert und erhielt den Namen 6.3 (-) – Vektor.

#### 2.2.1.4 pBluescript KS+/SK+

Standardvektor für molekularbiologische Arbeiten wie Subklonierungen und Sequenzierungen (*Stratagene*, Heidelberg).

### 2.2.2 Amplifizierung von DNA-Fragmenten

Primerpaare, die spezifisch an den entgegengesetzten DNA-Strängen binden, wobei sog. *forward*- und *reverse*-Primer je ein Primerpaar bilden, ermöglichen die gezielte Vervielfältigung gewünschter Gensequenzen mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

#### 2.2.2.1 Tabelle der verwendeten Primer zur Herstellung der mutanten Bazooka-Konstrukte

Die folgenden synthetischen Oligonukleotide (*BioTeZ*, Berlin) wurden zum Einen bereits für die Herstellung der ersten zehn mutanten Baz-Konstrukte in meiner Diplomarbeit (Fischer, N., 2001) benötigt und zum Anderen für die restlichen sechs mutanten Baz-Konstrukte in der nun hier vorliegenden Doktorarbeit.

Primer	Größe [pb]	Sequenz [5'→3']	Verwendung
Baz1044NotIfor	41	AAGGAAAAAAGCGGCCGCCATGAAGGTCACCGTCT GCTTCG	PCR
Baz3254KpnIrev	33	GGGGTACCTCACAAGATCTTGCGGCCTACCAGC	PCR
Baz1914NotIfor	40	AAGGAAAAAAGCGGCCGCCGAGAGCA AGCGAAAGGAGCCC	PCR
Baz5561KpnIrev	31	GGGGTACCGCAATGTGTTCAGCACTCG GTGG	PCR
Baz1916XhoIrev	29	CCGCTCGAGCTCCCTGGGCAAGGACTTGC	PCR
Baz3264XhoIfor	31	CCGCTCGAGAGTTCCAGTGACATTCTGGACC	PCR
Baz2850XhoIfor	30	CCGCTCGAGGACAGCCTGCCGCCAGCAGC	PCR
Baz2264XhoIrev	30	CCGCTCGAGCACCTTAGAGTCACGCTGTTGG	PCR
Baz1916NotIrev	38	AAGGAAAAAAGCGGCCGCTCCCTGGGCAAGGACT TGC	PCR
Baz2244NotIfor	42	AAGGAAAAAAGCGGCCGCCAACAGCGTGACTCTA AGGTGGC	PCR
Baz2687NotIrev	40	AAGGAAAAAAGCGGCCGCCACACCAGCACTTT TCTCC	PCR
Baz3264NotIfor	43	AAGGAAAAAAGCGGCCGCCAGTTCCAGTGACATTC TGGACCAC	PCR
Baz3254NotIrev	41	AAGGAAAAAAGCGGCCGCCAAGATCTTGCGGCCT ACCAGC	PCR
Baz410 NotIfor	43	AAGGAAAAAAGCGGCCGCCGTGTATGGTGGTTCCA TTGAGTCC	PCR
Baz4118KpnIrev	34	GGGGTACCTCAAATGGAACCACCATACACAGCG	PCR
Baz3944NotIrev	41	AAGGAAAAAAGCGGCCGCCGCCGAGTTTGTCTCC AAGCTC	PCR
Baz4032NotIfor	44	AAGGAAAAAAGCGGCCGCCTATCAGCGGAATAAG AAGTTACGCG	PCR
Baz3881SalIfor	28	ACGCGTCGACATCCAGCAACTTTGATGC	PCR
pUAST5' - SeqPrimer	18	ACCAAGTAAATCAACTGC	Sequenzierung
pUAST3' - SeqPrimer	19	AGCTTTAAATCTCTGTAGG	Sequenzierung
BazS980Afor2	39	GGGACGACGCGCCATCTCTGAGAAGCACCATGCGG TGCG	Mutagenese
BazS980Arev2	39	CGCACCGCATGGTGCTTCTCAGAGATGGCGCGTGC TCCC	Mutagenese
BazS982Afor2	39	GGGACGACGACGATCGCTGAGAAGCACCATGCGG TGCG	Mutagenese
BazS982Arev2	39	CGCACCGCATGGTGCTTCTCAGCGATGCTGCGTCGT CCC	Mutagenese
BazS980AS982Afor2	39	GCTTTGGGACGACGCGCCATCGCTGAGAAGCACC TGCG	Mutagenese
BazS980AS982Arev2	39	CGCATGGTGCTTCTCAGCGATGGCGCGTCCCAA AGC	Mutagenese
Baz3944NotIrev	41	AAGGAAAAAAGCGGCCGCCGCCGAGTTTGTCTCC AAGCTC	PCR

Tab. 2.1 Verwendete Primer zur Herstellung der mutanten Bazooka-Konstrukte

### 2.2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR-Protokoll)

Die Polymerase-Kettenreaktion erlaubt die gezielte Amplifikation ausgewählter DNA-Sequenzen (Mullis und Faloona, 1987). Der gewünschte DNA-Strang wurde thermisch bei 95° C denaturiert. Das entsprechende Primerpaar hybridisierte bei der anschließenden

Abkühlung an die einzelsträngige DNA. Die *Pfu*-Polymerase wurde zur Amplifizierung von PCR-Fragmenten, die für die Klonierung benötigt wurden, verwendet. Im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase war hier der Einbau falscher Nukleotide geringer. Mit Hilfe der DNA-Polymerase und einem Mix aus dNTPs erfolgte eine Extension der DNA, d. h. die Primer stellten das 3'-Ende dar, an dem die *Pfu*-Polymerase die DNA mit den dNTPs synthetisierte. Durch sich wiederholende Zyklen aus Denaturierung (Aufschmelzen der DNA), Annealing (Bindung der Primer) und Extension (Strangsynthese) konnte die gewünschte DNA-Sequenz exponentiell vervielfältigt werden.

Σ 50 µl	PCR-Ansatz
5 µl (1 x)	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase-Puffer (10 x) mit MgSO <sub>4</sub>
1 µl (je 200 µM)	dNTP-Mix, je 10 mM
5-50 pmol (0,1-1 µM)	forward-Primer
5-50 pmol (0,1-1 µM)	reverse-Primer
< 0,5 µg / 50 µl	DNA-Template
1,25 u / 50 µl	<i>Pfu</i> -Polymerase
ad 50 µl	dH <sub>2</sub> O

**Tab. 2.2** Pipettierschema für die PCR-Reaktionen

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min/sec]	Funktion
1.	95	4'30''	Denaturierung
2.	95	30''	Denaturierung
3.	55	30''	Annealing
4.*	72	7'	Extension
5.	go to 2. 30 x		
6.	95	30''	Denaturierung
7.	55	30''	Annealing
8.**	72	10'	Extension
9.	4	'for ever'	Reaktionsende

**Tab. 2.3 PCR-Protokoll**

Die Tabelle enthält das PCR-Protokoll, das für die Amplifizierung sämtlicher PCR-Produkte (Ausnahme: PCR-Produkte für die Sequenzierungen der *baz*-Allele) verwendet wurde. \*Pro kb des größten zu amplifizierenden PCR-Fragmentes wurden je 2 Minuten gerechnet (= der Leistung der *Pfu*-Polymerase). \*\*In Schritt 8 wurde der *Pfu*-Polymerase 2 Minuten mehr Zeit gegeben.

### 2.2.2.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung der PCR-Amplifikate erfolgte mit dem PCR-Purification Spin Kit JETquick der Firma Genomed, Bad Oeynhausen.

### 2.2.3 Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Bakterien

Elektrokompente Zellen wurden für die Transformation von Plasmid-DNA benötigt.

Die Basis dieses Protokolls findet man in Hanahan et al., 1991 (Meth. Enzymol 204 63). Wichtige Punkte sind hierbei zu erwähnen: Das Wachstumsmedium enthielt keine

Magnesium-Ionen ( $Mg^{2+}$ ), es wurde, statt in  $dH_2O$ , in 10%igem Glycerol gewaschen und die OD, bei der man das Wachstum stoppte, lag nicht bei 0.3, sondern bei 0.6 - 0.75.

Für diese Arbeiten mussten alle Geräte und Lösungen am Vortag autoklaviert werden. Die Geräte, wie Pipetten und 'Nalgene bottles' (ca. 350 ml Plastikgefäße mit verschließbarem Deckel) wurden dann ü. N. im 4 °C-Kühlraum aufbewahrt. Ebenso verfuhr man mit dem autoklavierten 10%igem Glycerol (4 L). Die Kolben mit dem SOB-Medium (4 x 500ml) wurden nach dem Autoklavieren ü. N. auf den 37 °C-Schüttler gestellt.

Zur Animpfung der Vorkultur nahm man am Vorabend 50 ml des SOB-Mediums, gab das Antibiotikum Tetracyclin (Konzentration: 12.5 µg/ml) und überführte eine Pipettenspitze mit XL1-Blue-Zellen (Lagerung bei -70 °C) in das Medium. Der Kolben wurde ebenfalls ü. N. auf den 37 °C-Schüttler gestellt.

Am nächsten Morgen wurde die Kultur angeimpft, d. h. pro Kolben und 500 ml SOB-Medium wurden je 7.5 ml der Vorkultur hinzugefügt.

Das Wachstum der Bakterien erfolgte auf dem 37 °C-Schüttler und dauerte ungefähr 5 h bis die  $OD_{600}$  bei 0.6 - 0.75 lag.

Das Medium mit den amplifizierten Zellen wurde nun in Plastikgefäße, die sogenannten 'Nalgene bottles', gefüllt und für eine 1/4 h auf Eis gestellt. Die Tischzentrifuge konnte in dieser Zeit auf 1 °C vorgekühlt werden. Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei 3500 rpm (15 min). Die Zellen lagen nun als Pellet in den Plastikgefäßen vor. Sie wurden mit dem 10%igen Glycerol resuspendiert und wieder zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Die Resuspendierungen erfolgten im 4 °C-Kühlraum. Die danach folgende Resuspendierung und Zentrifugation verlief in kleineren JA20-Röhrchen bei 4000 rpm (10 min). Die letzte Resuspendierung erfasste ein Volumen von 6 ml und wurde auf ca. 120 *Eppendorf* Gefäße verteilt. Pro *Eppendorf* Gefäß wurden 50 µl der gewonnenen Bakterienkultur eingefüllt. Die *Eppendorf* Gefäße wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

#### 2.2.3.1 Lösungen:

SOB- $Mg^{2+}$ : 20 g/L Trypton pepton, 5 g/L Select Yeast Extrakt, 0.58 g/L NaCl (10 mM),  
0.19 g/L KCL (2.5 mM)

10% Glycerol: 100 ml Glycerin, 900 ml  $dH_2O$

LB-Amp-Platten: LB-Medium: 5.0 g Bacto Trypton / Trypton Pepton, 4.0 g NaCl, ad 500 ml  $dH_2O$  + 6.25  
Agar, autoklavieren + 500 µl Ampicillin (Endkonz.: 100 µg/ml)

## 2.2.4 Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA

Die Elektroporation stellt eine sehr gute Methode dar, Plasmid-DNA in Bakterienzellen zu überführen. Mit Hilfe einer hohen Spannung (1.8 Volt) kommt es zur Ausbildung von kleinen Löchern in der Membran der Zellen. Dadurch kann die Plasmid-DNA ins Zytoplasma der Bakterien gelangen.

In eine Transformationsküvette pipettierte man die 50 µl einer Bakteriensuspension und 1 µl des 1:10 verdünnten Ligationsansatzes (< 1.0 ng/µl). Die hohe Spannung ermöglichte nun die Elektroporation. Im Anschluss daran gab man 1 ml LB-Medium in die Küvette, pipettierte die Suspension vorsichtig auf und ab und füllte sie dann in ein *Eppendorf* Gefäß. Nach einer Inkubation von 1 h auf 37 °C wurde die Bakteriensuspension kurz abzentrifugiert. Die Bakterien befanden sich im Pellet, welches nun mit ca. 200 µl des LB-Mediums, bzw. des Überstandes, auf eine LB-Amp-Platte ausplattiert werden konnte.

Die Platten, d. h. die eigentliche Platte und die Kontrollplatte (Ligation ohne das Insert) wurden ü. N. in den 37 °C-Wärmeschrank gelegt. Am nächsten Morgen konnten dann die Kolonien gepickt werden. Diese gab man dann jeweils in ein mit 3 ml LB-Medium versehenes Röhrchen und stellte sie ü. N. auf den 37 °C-Schüttler.

Nach dem Animpfen der Bakterienkolonien konnte am nächsten Tag mit der Plasmidpräparation der „Minis“ begonnen werden.

## 2.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA

### 2.2.5.1 „Mini“-Plasmidpräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die „Mini“-Präparation stellt eine schnelle, wenngleich auch etwas unsaubere Art dar, Plasmid-DNA zu isolieren, die zum Test, ob eine Ligation erfolgreich verlaufen ist, häufig ihre Anwendung findet. Das bedeutet, man testet mit dieser Methode meist 12-24 Kolonien, ob sich im Vektor das gewünschte Insert befindet oder nicht.

Die Präparationen erfolgten nach einem laborintern modifiziertem Protokoll mit den Nucleobond-Lösungen der Firma *Macherey-Nagel*, Düren (S1, S2 und S3). Von der aus 2.2.4 angeimpften Bakterienkultur wurden 1,5 ml in ein *Eppendorf* Gefäß gefüllt und 1 min bei 13.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die anschließende Resuspendierung erfolgte mit 300 µl von der RNase enthaltende S1-Lösung. Danach folgten 300 µl der S2-Lösung, wobei es sich hierbei um einen Lysis-Puffer handelte. Diese Lösung sollte nicht länger als 5 min bei RT einwirken. Neutralisiert wurde die Lösung durch Hinzufügen von 300 µl der S3-Lösung. Nun wurde das *Eppendorf* Gefäß für 30 min bei

13.000 U/min zentrifugiert (RT). Der Überstand, in dem sich jetzt die DNA befand, wurde in ein neues *Eppendorf* Gefäß überführt und mit 0.7 Volumen Isopropanol gefällt. Hierbei dauerte die Zentrifugation 20 - 30 min bei 13.000 U/min und konnte sowohl bei 4 °C als auch bei RT erfolgen. Der anschließende Waschschrift erfolgte mit 200 µl 70% Ethanol. Hierbei dauerte die Zentrifugation ungefähr 10 min bei 13.000 U/min. Die Trocknung der Plasmid-DNA unter einer herkömmlichen Schreibtischlampe dauerte 10 - 15 min. Nun bestand die Möglichkeit die DNA in 20 - 30 µl dH<sub>2</sub>O oder TE-Puffer aufzulösen.

Nachdem sich die DNA gelöst hatte (ca. 1 h) konnte eine Restriktionsspaltung erfolgen. Anschließend wurde die DNA auf ein Agarose-Gel aufgetragen und es zeigte sich unter einer UV-Lampe, ob die Insertion erfolgreich war. Im positiven Fall, nahm man 50 µl von der noch übriggebliebenen 1,5 ml Bakterienkultur und impfte damit eine sogenannte „Midi“ an, d. h. man gab diese 50 µl in einen Erlenmeyer-Kolben, in dem sich 50 ml LB-Medium und Ampicillin (100 µg/ml) befanden und stellte diesen ü. N. auf den 37 °C-Schüttler.

#### **2.2.5.1.1 Lösungen**

S1: 50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, RNase A (10 mg/ml), pH 8.0, Lagerung: 4 °C

S2: 200 mM NaOH, 1% SDS

S3: 2,80 M K-Acetat, pH 5.1

TE – Puffer: 10 mM Tris (pH 8.0), 1 mM EDTA

#### **2.2.5.2 „Midi“-Plasmidpräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Für Klonierungen, Sequenzierungen und für die Injektion von DNA in Fliegen (Keimbahntransformation) wird Plasmid-DNA in größeren Mengen und von höherer Reinheit benötigt („Midi“-Präparation). Aus diesem Grund wurde das Plasmid Midi Kit (Nucleobond AX) der Firma *Macherey-Nagel*, Düren verwendet.

#### **2.2.6 Transfektion von Plasmid-DNA in Schneiderzellen (S2)**

Möchte man die Expressionsfähigkeit seiner Konstrukte überprüfen, transfektiert man sie in die aus *Drosophila* stammende Zellkulturlinie S2.

Die Haltung sowie auch die Transfektion der Plasmid-DNA in die S2-Zellen wurde mit dem DES<sup>®</sup> Inducible Kit der Firma *Invitrogene*, Groningen, Niederlande, genau nach Herstellerangaben durchgeführt. Die dazu benötigten Lösungen wurden von der Firma *Gibco/BRL Life Technologies*, Karlsruhe, bezogen.

### 2.2.7 Austausch einzelner Aminosäuren mit dem *Stratagene* Mutagenese-Kit

Der Austausch einzelner Nukleotide und somit die Möglichkeit, einzelne Aminosäuren gezielt in einem Protein zu verändern, stellt einen weiteren Ansatz dar, um die Struktur und Funktion eines Proteins zu untersuchen.

Das Prinzip des *Stratagene* Mutagenese-Kits beruht auf einer Methode die der PCR ähnelt. Es soll an einem gewünschten Insert, welches sich in einem Vektor befindet, ein Nukleotid (Punktmutation) oder mehrere Nukleotide ausgetauscht werden. Somit kann man gezielt einzelne Aminosäuren verändern, wie hier im Fall des Proteins Bazooka (Baz). Zwei synthetische Primer, welche die gewünschte Mutation enthalten, binden an die im Insert zu mutierende Stelle. Mit Hilfe der *PfuTurbo* DNA-Polymerase werden die beiden Oligonukleotide verlängert, wodurch die jeweils entgegengesetzten Stränge komplementiert werden. Es entsteht ein mutantes Plasmid. Im Weiteren verwendet man die ebenfalls mitgelieferte Endonuklease Dpn I, die spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA verdaut. Unmethylierte DNA, wie das neu erzeugte mutante Plasmid, wird nicht verdaut. Nach einer Transformation in XL1-Blue-Zellen („superkompetente“ Zellen), die im Kit enthalten sind, können Kolonien gepickt und angeimpft werden. Mit der anschließenden DNA-Isolierung wird das Plasmid, zusammen mit dem entsprechenden Sequenzierprimer, zum Sequenzieren geschickt. *Stratagene* bietet je nach Größe des Plasmids verschiedene Mutagenese-Kits an. Da der 6.3 (-) – Vektor (pBluescript-Vektor mit der cDNA von Baz) > 8 kb ist, wurde entsprechend das Kit für Plasmide > 8 kb ausgewählt. Es zeigte sich jedoch kein Resultat. Daraufhin wurde folgende Klonierungsstrategie angewendet: Mit Hilfe der PCR-Methode erhielt man ein kleineres Baz-PCR-Fragment (Primer: Baz3881SalIfor und Baz5561KpnIrev / 6.3 (-)-Vektor), dass in den ursprünglichen pBluescript-Vektor kloniert wurde. Somit konnte mit einem wesentlich kleineren Vektor (ca. 4,7 kb) die Mutagenese mit dem *Stratagene* Mutagenese-Kit für Plasmide < 8kb (#200518) erfolgen. Nachdem die Mutagenese erfolgreich verlief, erfolgte eine „Rückklonierung“ in den Vektor mit der vollständigen Baz DNA. Abschließend wurde die vollständige Baz-Sequenz, mit den jeweiligen ausgetauschten Nukleotiden, analog mit allen übrigen Baz-Konstrukten, in den pUAST-FLAG-Epitop-Vektor kloniert. Die hierfür benötigten Primer sind in der Tab. 2.1 aufgeführt.

### 2.2.8 Sequenzierung der verschiedenen mutanten *baz*-Allele

Die genomische DNA von Baz, die aus sieben Exons und sechs Introns besteht, ist im Anhang wiedergegeben. Hierbei sind die Positionen sämtlicher PCR- und Sequenzierprimer

eingetragen. Zuerst wurde für jedes mutante *baz*-Allel eine Serie von PCRs durchgeführt, um ca. 1 kb große PCR-Produkte zu erhalten, die dann mit den PCR-Primern sequenziert wurden. Die PCR-Produkte entsprachen, mit einer Ausnahme, einem oder zwei Exons von Baz. Lediglich Exon 2 war zu groß, um in einem Fragment amplifiziert zu werden und wurde daher in zwei teilweise überlappenden PCR-Reaktionen amplifiziert. Um die inneren Bereiche der PCR-Fragmente zuverlässig sequenzieren zu können, wurden weitere Sequenzreaktionen mit Sequenzierprimern durchgeführt, die an den zentralen Bereich der PCR-Fragmente banden.

Die Sequenzierung der verschiedenen *baz*<sup>-</sup>-Allele (Tab. 2.4 und Tab. 2.9) erfolgte in drei Schritten. Im ersten Schritt wurde die DNA aus heterozygoten Fliegen isoliert, in denen das mutante *baz* Allel über das FM7 Balancer-Chromosom gehalten wurde. Im zweiten Schritt erfolgte eine PCR und der dritte Schritt bestand aus der Sequenzierung. 1.) DNA-Isolierung: 30 Fliegen wurden mit CO<sub>2</sub> betäubt, in ein *Eppendorf*-Gefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Homogenisierung wurden die Fliegen in *Eppendorf*-Gefäßen auf Eis mit 200 ml Puffer A und dem Biovortexer ca. 1-2 min zermörsert. Danach wurden weitere 200 ml Puffer A hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte im Heizblock bei 65 °C – 70 °C. Das anschließende Hinzufügen einer LiCl/Kaliumacetatlösung diente zur Neutralisierung. Nach dem Invertieren (2 x) erfolgte eine Inkubation auf Eis (30 min). Die *Eppendorf*-Gefäße wurden danach zentrifugiert (15 min). Der Überstand (ca. 1 ml) wurde mit 600 µl Isopropanol vermischt und ebenfalls zentrifugiert (15 min). Das DNA-Pellet wurde mit kaltem 70 % Ethanol gewaschen und im Anschluss getrocknet. Die DNA wurde in 100 µl dH<sub>2</sub>O ü. N. gelöst. 2.) PCR: in der Tab. 2.5 ist das PCR-Protokoll aufgeführt und in der Tab. 2.6 sind die PCR-Primer dargestellt. 3.) Die für die „Außer-Haus-Sequenzierung“ benötigten Sequenzierprimer sind in der Tab. 2.7 aufgelistet und die genomische *baz*<sup>+</sup>-DNA befindet sich im Anhang. Polymorphismen zwischen dem mutanten *baz*-Allel und dem Balancer-Chromosom zeigten sich anhand von Doppel-Signalen im Elektropherogramm der Sequenzreaktionen. Alle detektierten Mutationen wurden durch Sequenzierung des komplementären DNA-Strangs verifiziert.

---

*baz*<sup>-</sup>-Allele: *baz*<sup>XR11</sup>, *baz*<sup>815-8</sup>, *baz*<sup>Xi106</sup>, *baz*<sup>EH747</sup>, *baz*<sup>EH171</sup>

---

**Tab.2.4** Verwendete *baz*<sup>-</sup>-Allele für die Sequenzierung

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min/sec]	Funktion
1.	95	3'	Denaturierung
2.	95	30''	Denaturierung
3.	(*)	30''	Annealing
4.	72	1'30''	Extension
5.	go to 2. 33x		
6.	95	30''	Denaturierung
7.	55	30''	Annealing
8.	72	5'	Extension
9.	4	'for ever'	Reaktionsende

**Tab. 2.5 PCR-Protokoll zur Sequenzierung der *baz*-Allele**

(\*) die jeweiligen optimalen Annealing-Temperaturen der verschiedenen PCR-Primer sind in der Tab. 2.6 wiedergegeben. Der PCR-Ansatz erfolgte wie in 2.2.2.2 beschrieben.

<i>Baz</i> <sup>+</sup> -Exon	Produktgröße [pb]	PCR-Primer + Sequenz [5'→3']	optimale Annealing Temperatur [°C]
1	935	bazexon1for: ttgcgagcgagagcgaagaa bazexon1rev: acctcccgaactccagaag	55,5
2	954	bazexon2for: ctccacggccccagctaat bazexon2rev: gggctccttcgcttctctc	60,2
2b	1171	bazexon2bfor: gacatatcagcagggttctatc bazexon2brev: cggcctttcgggtcgtgta	55,5
3-4	1139	bazexon3-4for: gcgagtcggcgcttcaaatgta bazexon3-4rev: ggacgtgccggtagtgctctg	58,7
5	872	bazexon5for: caacacggcgctgcttatcg bazexon5rev: ccaggtcttgcgggctcta	60,0
6	808	bazexon6for: accggatgcgagcagtaagtttt bazexon6rev: gtgtgggtgagttgcgtgtgatg	58,7
7	805	bazexon7for: catgaatttggctggctactgt bazexon7rev: ccccttatgcatgtggtta	57,1
7b	942	bazexon7bfor: tcagcgaggtcaacgaggaggtg bazexon7brev: ggaagtgcggttcagtcagtcg bazexon7b2for: cgccggtcccagccacac bazexon7b2rev: gtaaggctgaaggctggcaacaac	hat bei Temp. von 50,0 – 57,0 nicht funktioniert

**Tab. 2.6 PCR-Primer zur Sequenzierung der *baz*<sup>-</sup>-Allele**

Die Tabelle enthält die Sequenzen der PCR-Primer, die notwendig waren, die einzelnen Exons in den jeweiligen *baz*<sup>-</sup>-Allelen zu amplifizieren. In der rechten Spalte befinden sich die jeweiligen optimalen Annealing-Temperaturen der PCR-Primer. Zudem sind die verschiedenen *baz*<sup>+</sup>-Exons und ihre Größe aufgeführt. Die Positionen der PCR-Primer sind in der genomischen DNA von *Baz* (Anhang 7) eingetragen.

<i>baz</i> <sup>+</sup> -Exon	Sequenzierprimer + Sequenz [5'→3']
1	bazexon1seq1for: ctggaagcgacgacgat / bazexon1seq1rev: ttttaacgctatgctc
2	bazexon2seq1for: cgggaccgatggctggac / bazexon2seq1rev: gccgaccagcgtttgtact
2b	bazexon2bseq1for: caacggctctgggcttttc / bazexon2bseq1rev: cgggcttcagcgtccatcc

**Tab. 2.7 Sequenzierprimer für die Sequenzierung der *baz*<sup>-</sup>-Allele (Teil I)**

Die Positionen der Sequenzierprimer sind in der genomischen DNA von *Baz* (Anhang 7) vermerkt.

<i>baz</i> <sup>+</sup> - Exon	Sequenzierprimer + Sequenz [5'→3']
3-4	bazexon3-4seq1for: ttcaaatggtagcggcaataa / bazexon3-4seq1rev: gcgctgctccctctct
5	bazexon5seq1for: agctgaccaaactggctgtg / bazexon5seq1rev: ccgaaaactgggcattag
6	bazexon6seq1for: tcagcagcaacaacagatac / bazexon6seq1rev: gcggtggcgggtggctgat
7	bazexon7seq1for: tgtgccgattggaagg / bazexon7seq1rev: cactgctctgctcccgtatgg

**Tab. 2.7 Sequenzierprimer für die Sequenzierung der *baz*<sup>-</sup> Allele (Teil II)**

Die Positionen der Sequenzierprimer sind in der genomischen DNA von Baz (Anhang 7) vermerkt.

## 2.3 Genetische Methoden

Die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen erfolgten an der Taufliege, *Drosophila melanogaster*. Der Generationszyklus von *Drosophila melanogaster* beginnt mit dem Embryonalstadium (24 h / 25 °C), welches in 17 Entwicklungsstadien unterteilt wurde (Campos-Ortega und Hartenstein, 1997). Es folgen 3 larvale Stadien, an die sich die Bildung der Puppe anschließt, aus welcher das adulte Tier schlüpft.

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

Standard-Medium: 356 g Maisschrot, 47,5 g Sojamehl, 84 g Trockenhefe, 225 g Malzextrakt, 75 ml 10 % Nipagin, 22,5 ml Propionsäure, 28 g Agar, 200 g Zuckerrübensirup, mit 4,9 l dH<sub>2</sub>O auffüllen und aufkochen. Nach dem Abkühlen auf ca. 55 °C kann der Futterbrei in Fliegenröhrchen oder Flaschen abgefüllt werden.

### 2.3.1 Fliegenstämme, Chromosomen, Allele

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

Stamm	Bemerkungen	Referenz
<u>1. Chromosom</u>		
FM7	Balancer-Chromosom	Lindsley und Zimm, 1992
FM7blue <sup>ftz</sup>	Balancer-Chromosom mit P[ftz::lacZ]-Insertion	Y. Hiromi

**Tab. 2.8 Verwendete Balancer-Chromosomen (Teil I)**

Stamm	Bemerkungen	Referenz
<u>2. Chromosom</u>		
CyO	Balancer-Chromosom	Lindsley und Zimm, 1992
Gla	dominant markierte Chromosomen	Lindsley und Zimm, 1992
If	dominant markierte Chromosomen	Lindsley und Zimm, 1992
<u>3. Chromosom</u>		
TM3	Balancer-Chromosom	Lindsley und Zimm, 1992
TM6B	Balancer-Chromosom	Lindsley und Zimm, 1992
MKRS	Dominanter Marker	Lindsley und Zimm, 1992

**Tab. 2.8** Verwendete Balancer-Chromosomen (Teil II)

Stamm	Bemerkungen	Referenz
<u>1. Chromosom</u>		
<i>y w f baz<sup>XR11</sup> / FM7</i>	hypomorphes Allel; durch Röntgenstrahlen induziert	R. Stanewsky
<i>y cv v f baz<sup>815-8</sup> / FM7</i> <i>P[ftz::lacZ]</i>	durch Röntgenstrahlen induziert	McKim et al., 1996
<i>y baz<sup>4</sup> / FM7 =</i> <i>y baz<sup>Xi106</sup> / FM7</i>	amorphes Allel ; EMS-Mutagenese	Bloomington*: #3295 Tearle & Nüsslein-Volhard, 1987
<i>baz<sup>Xi106</sup> FRT18D / FM7</i>	Rekombinante zwischen <i>baz</i> und FRT-Element	Wieschaus et al., 1984
<i>baz<sup>EH747</sup> y / Binsn</i>	amorphes Allel; EMS-Mutagenese	Eberl & Hilliker, 1988
<i>baz<sup>XK75</sup> / FM7</i>	amorphes Allel	Wieschaus et al., 1984
<i>baz<sup>EH171</sup> / FM7</i>	amorphes Allel; EMS-Mutagenese	Bloomington*: #1537

**Tab. 2.9** Verschiedene *baz*-Allele (Ausgangsstämme für die Rettungsexperimente)

\* Bloomington *Drosophila* Stock Center: flystocks@bio.indiana.edu

Stamm	Bemerkungen	Referenz
<i>insc-GAL4</i>	Neuroblasten-GAL4-Treiber / 1407 Insertion im <i>inscuteable</i> -Promotor	Luo et al., 1994
<i>pros-GAL4</i>	Neuroblasten-GAL4-Treiber: <i>prospero</i> -GAL4-20C	Goto, S. & F. M.
<i>sca-GAL4</i>	<i>scabrous</i> -GAL4-Treiber, der die Expression in allen proneuralen Clustern treibt	Baker et al., 1996
<i>elav-GAL4</i>	<i>elav</i> -GAL4-Treiber im Nervensystem	Luo et al., 1994

**Tab. 2.10** Verwendete GAL4-Aktivatorlinien (Teil I)

\* Bloomington *Drosophila* Stock Center: flystocks@bio.indiana.edu

Stamm	Bemerkungen	Referenz
<i>mat67;15-GAL4</i>	maternaler GAL4-Treiber, enthält ein Insert von GAL4-VP16 unter der Kontrolle des maternalen $\alpha$ -Tubulin-Promotor; <i>mat67</i> : 2.Chr., <i>mat15</i> : 3.Chr.	Hunter & Wieschaus, 2000
<i>mat7062-GAL4</i>	maternaler GAL4-Treiber, 2. Chr.	Bloomington*: #7062
<i>mat7063-GAL4</i>	maternaler GAL4-Treiber, 3. Chr.	Bloomington*: #7063
<i>actin-GAL4</i>	ubiquitärer <i>actin</i> -GAL4-Treiber, 2.Chr.	Bloomington*: #4414
<i>actin-GAL4</i>	ubiquitärer <i>actin</i> -GAL4-Treiber, 3.Chr.	Bloomington*: #3954
<i>arm-GAL4</i>	ubiquitärer <i>armadillo</i> -GAL4-Treiber, 3.Chr.	Bloomington*: #1561
<i>daG32</i>	<i>daughterless</i> -GAL4, (ubiquitär) 3.Chr.	Wodarz et al., 1995
<i>prd-GAL4</i>	<i>paired</i> -GAL4	Fasano, L. & Desplan, C. / Yoffe et al., 1995
<i>en-GAL4</i>	<i>engrailed</i> -GAL4, Expression in der embryonalen Epidermis in 14 Segmenten / Streifen, 2.Chr.	Bloomington*: #1973 N. Perrimon
<i>GMR-GAL4</i>	<i>Glass-Multimer Reporter</i> -GAL4 (augenspezifisch)	Hay et al., 1995
<i>Cu2-GAL4</i>	Follikelzelltreiber; in Follikelzellen ab Stadium 4/5, anfangs ungleichmäßig, nach Stadium 8/9 uniform (starke Expression)	Trudi Schüpbach

**Tab. 2.10** Verwendete GAL4-Aktivatorlinien (Teil II)

\* Bloomington *Drosophila* Stock Center: flystocks@bio.indiana.edu

### 2.3.2 Das UAS/GAL4-System

Das UAS/GAL4-System wurde 1993 von Brand und Perrimon entwickelt (Brand & Perrimon, 1993). Es ermöglicht die ektopische Expression von Genen zu einem bestimmten Zeitpunkt und in einem bestimmten Gewebe. Unter dem Einfluss eines zeit- und gewebespezifischen Enhancers wird der Hefe-Transkriptionsfaktor GAL4 in einem Fliegenstamm (GAL4-Aktivatorlinie) exprimiert. In einem weiteren Fliegenstamm (UAS-Effektorlinie) steht das zu untersuchende Gen unter dem Einfluss von UAS-Sequenzen (‘upstream activating sequences’), den Bindungsstellen für das GAL4-Protein. Durch die Kreuzung der GAL4-Aktivatorlinie mit der UAS-Effektorlinie gelangen beide Komponenten in einen Organismus und führen zur UAS/GAL4-vermittelten Expression des Zielgens unter der räumlichen und zeitlichen Kontrolle des Enhancers.

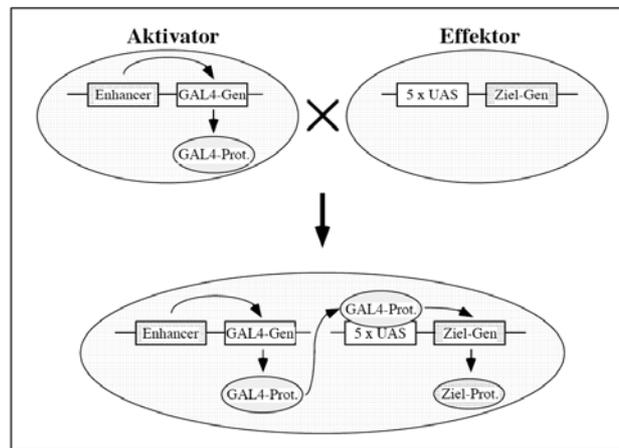


Abb. 2.3 Schematische Abbildung des UAS/GAL4-Systems

## 2.4 Mikromanipulation von *Drosophila melanogaster*

### 2.4.1 Keimbahntransformation

Die Keimbahntransformation von *Drosophila melanogaster* stellt eine einfache Methode zur Erzeugung transgener Fliegenstämme dar (Spradling, 1986). In *Drosophila* existieren unterschiedliche Typen von mobilen genetischen Elementen (Transposons). Das P-Element, ein Beispiel für ein Transposon, besitzt terminale invertierte Repeats von je 31 bp. Zudem enthält das P-Element vier Exons und drei Introns. Das Spleißen der Introns führt in der Keimbahn zu einem offenen Leseraster (ORF) und zu der Erzeugung einer Transposase. Sie ermöglicht die Transposition des P-Elements, indem sie die terminalen invertierten Repeats erkennt und dadurch das Ausschneiden sowie das Einfügen dieser DNA katalysieren kann. Das P-Element wurde gentechnisch so verändert, dass es dazu genutzt werden kann, Fremd-DNA, wie z. B. mutante Baz-Konstrukte, stabil in das Fliegen genom zu integrieren. Dieses modifizierte P-Element enthält keine transposasekodierende Region mehr. Es trägt aber, neben der fremden DNA, noch die invertierten Repeats. Eine Integration in das Fliegen genom kann hierbei nur gewährleistet werden, wenn ein zweites, ebenfalls modifiziertes Transposon, zusammen mit dem P-Element des Transgen-Plasmids injiziert wird. Bei dem veränderten Transposon handelt es sich um ein P-Element des Helfer-Plasmids (pUCHs $\pi$  $\Delta$ 2-3), das für die Transposase kodiert, aber über keine funktionellen invertierten Repeats mehr verfügt. Das modifizierte P-Element des Transgen-Plasmids, das auf die Tochterzellen verteilt wird, enthält ein Markergen, z. B. das  $w^+$ -Allel, wodurch angezeigt wird, ob die Transformation erfolgreich war. Die Helfer-Plasmide gehen hierbei verloren.

#### 2.4.1.1 Herstellung des Injektionsmixes und der Injektionskapillaren

Der Injektionsmix bestand aus 3-5  $\mu\text{g}$  der zu injizierenden DNA des P-Element-Transformationsvektors, 1  $\mu\text{g}$  von dem Helfer-Plasmid mit der Transposase (pUCHs $\pi\Delta$ 2-3), 1  $\mu\text{l}$  des 10 x Injektionspuffers und 1  $\mu\text{l}$  2 % Phenolrot und wurde mit dH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 10  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Bei den Injektionskapillaren handelte es sich um folgendes Modell von Glaskapillaren: Borosilikatglas GB120F-10 der Firma *Science Products GmbH*, Hofheim. Die Glaskapillaren wurden mit Mikroelektrodenpuller: Model P-97 Flaming/Brown Micropipette Puller der Firma *Sutter Instruments Co.*, USA, mit dem Programm Nr. 33 gezogen. Die Spitze der Kapillare musste anschließend unter einem Anstellwinkel von ca. 35 ° 5 min geschliffen werden (Typ 462, *Backhofer*, Reutlingen).

Der Injektionsmix musste vor dem Gebrauch eine halbe Stunde zentrifugiert (13.000 U/min) werden, damit sämtliche Schwebeteilchen auf dem Boden sinken konnten. Die Größe der Teilchen würde sonst die Kapillaren verstopfen. Anschließend nahm man 1  $\mu\text{l}$  von dem Injektionsmix und gab es auf einen Tropfen 3S Voltalef-Öl. Unter dem Mikroskop (CWHK LOX/18L/OLYMPUS BH-2, *Olympus*, Japan) konnte nun der Injektionsmix in die Kapillare, die vorher von hinten mit 3S Voltalef-Öl befüllt wurde, aufgezogen werden.

##### 2.4.1.1.1 Lösungen

10 x Injektionspuffer: 5 mM KCL, 0.1 mM Natrium-Phosphatpuffer, pH 6.8

#### 2.4.1.2 Mikroinjektion in *Drosophila*-Embryonen

Für die Injektion wurden  $w^-$ -Embryonen ( $w^{1118}$ , Lindsley und Zimm, 1992) verwendet. Die P-Element-Transformationsvektoren tragen ein  $w^+$ -Gen, das mit ins Genom integriert wird. Dadurch können die transgenen Fliegen anhand ihrer Augenfarbe (von schwach gelb bis dunkelrot, abhängig vom Insertionsort) erkannt werden.

Die Injektion erfolgte in den posterioren Pol junger  $w^-$ -Embryonen, bei denen die Bildung der Polzellen noch nicht begonnen hatte. Im positiven Fall wurden der P-Element-Transformationsvektor und das P-Element des Helfer-Plasmids ins Zytoplasma der sich bildenden Polzellen aufgenommen, wodurch dann später eine Integration im Kern stattfinden konnte. Bei den Polzellen handelt es sich um die Vorläuferzellen der Keimzellen, die die Gameten bilden. Verschmilzt ein Gamet mit einer chromosomalen Integration des Konstrukts (z. B. des mutanten Baz-Konstrukts) mit einem anderen Gameten, so trägt das aus dieser Zygote hervorgehende Tier die Integration in jeder Zelle des Körpers, einschließlich der Keimzellen.

2-3 Tage vor dem Injizieren setzte man die  $w^-$ -Fliegen ( $w^{1118}$ ) für die Eiablage auf Apfelsaft-Agar-Platten und wechselte diese mehrmals. Das erhöhte die Anzahl an gelegten Eiern und man erhielt Ablagen mit Embryonen, die vom Alter her synchronisiert vorlagen. Die Embryonen wurden dechorionisiert (2 min in einem Gemisch aus Natriumhypochlorit zu  $dH_2O$ , anschließend mit viel  $dH_2O$  waschen). Zur Erleichterung der Injektion ordnete man die Embryonen alle in gleicher Orientierung auf einem Apfelsaft-Agarblöckchen an und übertrug sie auf ein vorher mit Kleber versehenes Deckglas. Je nach Temperatur mussten die Embryonen 5-10 min trocknen, bis sich bei Berührung mit einer Präpariernadel Falten bildeten. Nun wurde das Deckglas auf einem Objektträger fixiert und mit 3S-Voltalef-Öl überschichtet. Die Injektionen erfolgten mit dem vorher vorbereiteten Mikromanipulator unter mikroskopischer Kontrolle in den posterioren Pol der Embryonen. Den Injektionsdruck variierte man über die Mikrometerschraube, dabei musste darauf geachtet werden, dass der Injektionsmix erst beim Eindringen in den Embryo ausfloss. Der Zusatz von Phenolrot im Injektionsmix ermöglichte diese Kontrolle. Die fertig injizierten Embryonen wurden mit einer zusätzlichen Überschichtung von 3S-Voltalef-Öl in einer feuchten Kammer bei 18 °C aufbewahrt. Nach 2 Tagen wurden die geschlüpften L1-Larven in ein Fliegenröhrchen mit Hefe umgesetzt und bei 18 °C gehalten.

#### 2.4.1.2.1 Lösungen

- Kleber: tesa-Pak Paketklebeband (*Beiersdorf*, Hamburg) einige Tage in Heptan einweichen, abzentrifugieren und den Überstand verwenden
- Apfelsaft-Agarplatten: 40 g Agar, 340 ml 100 % Apfelsaft, 17 g Rohrzucker mit  $H_2O$  auf 1 l auffüllen, aufkochen, nach dem Abkühlen auf 60 °C mit 30 ml 10 % Nipagin versetzen und Platten gießen
- 10 % Nipagin: 100 g Nipagin in 1 l 70 % Ethanol lösen

#### 2.4.1.3 Isolierung und Balancierung transgener Fliegen

Bei einer chromosomalen Integration besitzen die injizierten „Gründertiere“ ( $G_0$ -Tiere) neben den  $w^-$  - Gameten auch  $w^+$  - Gameten. Die erfolgreich verlaufende Transformation wird allerdings erst nach der Kreuzung mit Fliegen, die über den Genotyp  $w^- / w^-$  ;  $Gla / Cyo$  verfügen, anhand von roten Augen phänotypisch erkennbar.

Weitere Kreuzungen waren notwendig, um den Integrationsort des P-Elements auf dem ersten, zweiten oder dritten Chromosom zu ermitteln. Hierbei wurden die Kreuzungen gegen erst-, zweit- und drittchromosomale Balancer-Chromosomen durchgeführt. Die etablierten Stämme wurden entweder homozygot oder balanciert gehalten. Bei Mehrfachinsertionen kann es von Vorteil sein, sie zu trennen, separat auszukreuzen und zu etablieren.

## 2.5 Histologische Methoden

### 2.5.1 Verwendete Antikörper

Erster Antikörper	Beschreibung	Verwendung	Verdünnung	Referenz
Kaninchen- $\alpha$ -Baz	polyklonaler Antikörper	Embryonen, Ovarien, Western Blot	1:1000 1:1000 1:2000	Wodarz et al., 2000
Ratte- $\alpha$ -Baz	polyklonaler Antikörper	Embryonen	1:500	Wodarz et al., 1999
Kaninchen- $\alpha$ - $\beta$ -GAL	polyklonaler Antikörper	Embryonen	1:5000	<i>Cappel</i>
Maus- $\alpha$ - $\beta$ -GAL JIE7	monoklonaler Antikörper	Embryonen	1:100	Hybridoma Bank*
Ziege- $\alpha$ -E-Cadherin	polyklonaler Antikörper	Embryonen	1:100	<i>Santa Cruz</i>
Meerschweinchen- $\alpha$ - Miranda	polyklonaler Antikörper	Embryonen	1:1000	A. Wodarz
Kaninchen- $\alpha$ -FLAG	polyklonaler Antikörper	Embryonen	1:1000	<i>Sigma-Aldrich</i>
Maus- $\alpha$ -FLAG M5	monoklonaler Antikörper	Embryonen, Ovarien, Western Blot	1:1000 1:1000 1:2000	<i>Sigma-Aldrich</i>
Maus- $\alpha$ -Sxl M18	monoklonaler Antikörper	Embryonen	1:5	Hybridoma Bank*

**Tab. 2.11 Verwendete Primär-Antikörper**

\*Department of Biological Sciences, University of Iowa, Iowa City, IA 52242 (<http://uiowa.edu/~dshbwww/>).

Zweiter Antikörper	Verwendung	Verdünnung	Referenz
Esel- $\alpha$ -Maus Cy3	Embryonen, Ovarien	1:200 1:200	<i>Dianova</i>
Ziege- $\alpha$ -Maus Cy2	Embryonen	1:200	<i>Dianova</i>
Ziege- $\alpha$ -Maus HRP	Western Blot	1:10000	<i>Dianova</i>
Esel- $\alpha$ -Kaninchen Cy3	Embryonen, Ovarien	1:200 1:200	<i>Dianova</i>
Esel- $\alpha$ -Kaninchen Cy2	Embryonen	1:200	<i>Dianova</i>
Ziege- $\alpha$ -Kaninchen HRP	Western Blot	1:10000	<i>Dianova</i>
Ziege- $\alpha$ -Meerschweinchen Alexa 647	Embryonen	1:200	<i>Dianova</i>
Esel- $\alpha$ -Ratte	Embryonen	1:200	<i>Dianova</i>
Esel- $\alpha$ -Ziege Alexa 647	Embryonen	1:200	<i>Dianova</i>

**Tab. 2.12 Verwendete polyklonale Sekundär-Antikörper**

## **2.5.2 Antikörper-Färbungen an Embryonen**

Zunächst müssen die Embryonen für die Antikörper zugänglich gemacht werden. Das geschieht zum Einen durch das Entfernen des Chorions, dabei handelt es sich um die äußere Eihülle des Embryos (Dechorionisierung) und zum Anderen durch das Entfernen der inneren Vitellinmembran (Devitellisierung).

### **2.5.2.1 Dechorionisierung**

Die Embryonen wurden 5 min mit einem 1:1 Gemisch aus Natriumhypochlorit zu dH<sub>2</sub>O dechorionisiert und anschließend mit viel dH<sub>2</sub>O gewaschen.

### **2.5.2.2 Fixierung**

Nach dem Waschen wurden die Embryonen in ein Glasröhrchen überführt, das mit einem 1:1 Gemisch aus je 3 ml Fixierlösung (4 % FA-Lösung in PBS) und Heptan versehen war. Die Fixierung erfolgte auf dem Taumler für 20 – 25 min.

### **2.5.2.3 Devitellisierung**

Nach der Fixierung der Embryonen erfolgte die Devitellisierung. Hierbei wurde die untere, wässrige Phase abgezogen und verworfen. Im Anschluss daran wurden 4 ml Methanol hinzugefügt und für 30 sec sehr kräftig geschüttelt. Die devitellisierten Embryonen sanken dabei zu Boden und konnten mit einer Glaspipette in ein Eppendorf-Gefäß überführt werden. Nach zweimaligem Waschen mit Methanol wurden die Embryonen bei – 20 °C gelagert.

### **2.5.2.4 Antikörper-Färbung**

Um das Methanol zu entfernen, wurden die Embryonen 3 x 20 min mit PBT gewaschen. Im Anschluss daran wurden sie in NHS (Normales Pferdeserum, 5 %) in PBT 3 x 20 min geblockt, bevor der erste Antikörper hinzugegeben werden konnte. Die Inkubation erfolgte ü. N. bei 4 °C auf dem Taumler. Am nächsten Morgen wurde der erste Antikörper abgezogen und die Embryonen für 3 x 20 min mit PBT gewaschen. Nun folgte in 5 % NHS/PBT die Inkubation des zweiten Antikörpers für 2 h bei RT (Taumler). Da es sich um eine Immunofluoreszenz-Färbung handelte, sollte das *Eppendorf*-Gefäß mit den Embryonen mit einer Aluminiumfolie abgedunkelt werden, um so das Färbeergebnis zu verbessern. Nach der Antikörper-Reaktion wurden die Embryonen 3 x 20 min mit PBT gewaschen. Anschließend erfolgte eine Überführung der Embryonen auf einen Objektträger, auf dem sich ein Tropfen Moviol mit DABCO (1,4diazabicyclo{2.2.2}octane Antibleichmittel der Firma *Sigma-*

Aldrich, Steinheim) befand. Mit einem Deckglas versehen konnten die Präparate bei 4 °C gelagert werden.

#### **2.5.2.4.1 Lösungen**

Fixierlösung: 4 % FA-Formaldehyd in PBS  
Moviol: 5 g Moviol/Elvanol mit 20 ml PBS 24 h bei RT verrühren, 10 ml Glycerin hinzufügen und weitere 24 h rühren lassen, bei 4000 rpm zentrifugieren, aliquotieren und bei – 20 °C lagern  
10 x PBS: 130 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4, autoklavieren  
1 x PBT: 0,1% Tween-20 in PBS

### **2.5.3 Antikörper-Färbungen an Ovarien**

Fliegen, deren Ovarien präpariert und gefärbt werden sollten, wurden am Tag zuvor mit Hefe gefüttert. Die größeren Ovarien konnten dadurch einfacher entnommen werden. Die Präparation der Ovarien in PBS erfolgte auf Eis. Ein vorsichtiges Auf - und Abpipettieren ermöglichte die Vereinzelung der Eikammern. Anschließend überführte man die Ovarien in kleine Glasschälchen mit einer 4 % FA-Fixierlösung. Die Fixierung dauerte 10 - 15 min bei RT (Taumler). Im Anschluss daran konnten die Ovarien für 3 h geblockt werden. Die Inkubation des ersten Antikörpers erfolgte ü. N. auf einem Taumler im 4 °C-Raum. Am nächsten Morgen wurden die Ovarien 4 x 15 min mit PBT gewaschen. Die Inkubationszeit des zweiten Antikörpers betrug bei RT 1 h. Die Objektträger mit den Ovarien wurden mit Moviol + DABCO und einem Deckglas versehen. Die Präparate konnten dann bei 4 °C gelagert werden.

#### **2.5.3.1 Lösungen**

Einige Lösungen sowie Rezepte sind bereits im Kapitel 2.5.2.4.1 wiedergegeben.

Blockierlösung: 1 x PBS, 5 % NHS, 0,5 % Triton-X-100

Die beiden Antikörper-Lösungen wurden hier, abweichend zu allen anderen Antikörper-Lösungen, mit 1x PBS + 1 %, statt sonst mit 5 % NHS angesetzt.

### **2.5.4 Antikörper-Färbungen an Schneiderzellen (S2-Zellen)**

Als Ausgangspunkt können entweder transient transfizierte Zellen oder stabil transfizierte S2 Zelllinien verwendet werden (Kapitel 2.2.6). Zuerst wurden 'Chamber-Slides' beschichtet. Die mit dH<sub>2</sub>O 1:10 verdünnte Polylysinlösung wurde auf die Kammern verteilt (0,5 ml / Kammer). Die Trockenzeit betrug hierbei 1 h, bevor man die verdünnte Polylysinlösung wieder abziehen und die Kammern zum weiteren Trocknen erneut unter die Sterilbank legen konnte.

Zu Beginn der Antikörper-Färbung wurde zuerst 0,5 ml frisches Schneiderzell-*Drosophila*-Komplett-Medium in jede Kammer gefüllt, bevor man 2-3 Tropfen S2-Zellen hinzufügen konnte. Die Zellen wurden einige Stunden oder über Nacht in der Kammer belassen, bis sie am Objektträger anhafteten. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden 0,4 ml 4 % FA-Fixierlösung hinzugegeben. Die Einwirkzeit betrug 15 min. Ein weiterer Waschschrift folgte, wobei diesmal 0,5 ml PBT / 15 min verwendet wurde. Im Anschluss daran konnte der erste Antikörper auf die Zellen gegeben werden (Gesamtvolumen: 125 µl / Probe). Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte entweder 2 h bei RT oder ü. N bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Bevor der zweite Antikörper (Gesamtvolumen: 125 µl / Probe) dazu gegeben werden konnte, mussten die Zellen mit PBT gewaschen werden. Der zweite Antikörper wurde für 2 h bei RT inkubiert. Hierbei musste die feuchte Kammer in Aluminiumfolie eingewickelt werden. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Waschen in PBT.

Bevor man auf jedes Probenfeld einen Tropfen Glycerin - Propylgalat zur Einbettung geben konnte, mussten die 'Chamber - Slides' - Kammern sowie die Gummiabdichtung entfernt werden. Zum Schluss gab man auf den Objektträger noch ein Deckglas und umrandete als Vorsichtsmaßnahme, damit sich das Glycerin - Propylgalat nicht mit dem später zur Mikroskopierung benötigten Öl vermischte, den Objektträger mit Nagellack.

#### **2.5.4.1 Lösungen**

Die entsprechenden Medien und Lösungen stammen von dem DES<sup>®</sup> Inducible Kit der Firma *Invitrogene*, Groningen, Niederlande, und der Firma *Gibco/BRL Life Technologies*, Karlsruhe und wurden genau nach Herstellerangaben verwendet. Siehe auch Lösungen 2.5.2.4.1  
Glycerin-Propylgalat: 50 mg/ml Propylgalat in 75 % Glycerin

#### **2.5.5 Kutikula-Präparation**

Fliegen des gewünschten Genotyps wurden zur Eiablage auf Apfelsaft-Agarplatten gesetzt. Die abgelegten Eier einer ü. N. Ablage wurden anschließend für weitere 48 h bei 25 °C inkubiert, so dass alle Embryonen die Embryonalentwicklung vom zeitlichen Rahmen abgeschlossen haben könnten und Kutikula sekretiert hatten.

Nach dem Waschen in dH<sub>2</sub>O wurden die Embryonen dechorionisiert (ca. 4-5 min in Natriumhypochlorit) und nochmals mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Embryonen wurden auf einen Objektträger mit einem Tropfen Hoyers/Lactat überführt und mit einem Deckglas versehen. Die Objektträger wurden ü. N. bei 65 °C erhitzt. Bei diesem Schritt konnten die Kutikula-Präparate transparent werden und das Hoyers Medium aushärten. Die Lagerung der Präparate erfolgte bei RT.

### **2.5.5.1 Lösungen**

Hoyers/Lactat: 50 ml dH<sub>2</sub>O + 30 g Gummi arabicum ü. N. rühren, 200 g Chloralhydrat und 16 ml Glycerin zugeben; mindestens 3 h bei 12000 rpm zentrifugieren und den Überstand verwerfen; 1:1 Lactat mischen

### **2.5.6 Analyse adulter Augen mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops (REM): baz-induzierter dominanter morphologischer Phänotyp im Auge**

Mit einer Rasierklinge wurden die Köpfe der Fliegen vorsichtig halbiert. Im Anschluss daran wurden die Köpfe in einer alkoholischen Reihe (Ethanol: 30, 50, 70, 90, 96, 100 %) im *Eppendorf*-Gefäß entwässert und anschließend für 2 x 10 min in 100 % Aceton gewaschen. Durch die Inkubation (10 min) in einem 1:1 Gemisch aus Aceton zu TMS (Tetramethylsilane, *Sigma*, Deishofen) erfolgte die Trocknung der Köpfe. Im weiteren Verlauf wurde das obige 1:1 Gemisch aus Aceton zu TMS zuerst durch ein 1:2 Gemisch ersetzt und anschließend durch reines TMS. Nach dem Waschen (15-30 min) mit TMS wurde neues TMS hinzugefügt. Das *Eppendorf*-Gefäß wurde ü. N. offen unter dem Abzug stehen gelassen. Da TMS einen Siedepunkt bei 27 °C hat, kann die Flüssigkeit bei RT verdampfen. Die so getrockneten Köpfe wurden auf kleine Präparateteller montiert und mit einer dünnen Goldschicht überzogen (‘sputtern’, Balzers Union, *Balzers*, Fürstentum Liechtenstein). Gegebenenfalls wurde das ‘Sputtern’ wiederholt. Die Analyse der Augenpräparate erfolgte mit einem Rasterelektronenmikroskop (entweder am REM: AMR1000, *Leitz*, Wetzlar oder am neuen REM: LEO 1430VP, *LEO Elektronenmikroskop GmbH*, Oberkochen).

## **2.6 Proteinbiochemische Methoden**

Wenn man die Größe der mutanten Proteine in den einzelnen transgenen Linien von Baz überprüfen möchte, nutzt man die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Größe auf einem SDS-Gel (SDS: Polyacrylamid Gel Elektrophorese). Dieses Verfahren nennt man SDS-PAGE-Gelelektrophorese. Beim anschließenden Western Blot werden die aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen und abschließend detektiert.

### **2.6.1 Herstellung von Ovarienextrakten für den Western Blot**

Fliegen, deren Ovarien präpariert und für den Western Blot verwendet werden sollten, wurden einen Tag vorher mit Hefe gefüttert. Das Präparieren der Ovarien in PBS erfolgte auf Eis. Anschließend wurden die Ovarien in ein *Eppendorf*-Gefäß überführt. Hierbei wurde das PBS abgezogen und durch 30 µl 3 x SDS-Probenpuffer ersetzt. Diese Angabe bezieht sich auf

ungefähr 5 Ovarien. Mit dem Biovortexer vortexte man die Ovarien 2 x kurz und kochte sie 5 - 10 min auf. 5 µl wurden davon dann auf das Gel aufgetragen.

### 2.6.1.1 Lösungen

3 x SDS-Probenpuffer: 0,25 M Tris / HCl pH 6.8, 15 % Mercaptoethanol, 30 % Glycerol, 7 % SDS, 0,3 % Bromphenolblau Lagerung bei -20 °C

### 2.6.2 SDS-PAGE-Gelelektrophorese und Western Blot

Für die SDS-PAGE-Gelelektrophorese und das 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 % – 12 % Acrylamid enthielten, aufgetrennt und im Western Blot auf Nitrozellulosemembranen der Firma *Schleicher und Schüll*, Dassel übertragen. Der Transfer wurde durch eine Ponceau S-Färbung überprüft. Die Proteindetektion erfolgte dann nach folgendem Protokoll: Die Nitrozellulosemembran wurde für 1 h in einer Blockierlösung eingelegt. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper in der Blockierlösung erfolgte ü. N. bei 4 °C auf dem Taumler. Am nächsten Morgen wurde die Membran mit den Proteinen 4 x 15 min mit TBST gewaschen. Die anschließende Inkubation mit dem zweiten HRP-gekoppelten Antikörper erfolgte in der Blockierlösung für 2 h bei RT auf dem Taumler. Im Anschluss daran erfolgten 4 Waschschriffe (je 15 min) in TBST. Die abschließende Detektion mit dem Chemilumineszenz-Substrat (BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD) der Firma *Boehringer/Roche Diagnostics*, Mannheim) erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

#### 2.6.2.1 Lösungen

4 % Sammelgel: 310 µl 30 % Acrylamid / Bis-Acrylamid (29:1), 235 µl 1 M Tris pH 6.8, 10 µl 20 % SDS, 1.3 ml dH<sub>2</sub>O, 10 µl APS, 5 µl TEMED

7,5 % Trenngel: 1,9 ml 30 % Acrylamid / Bis-Acrylamid (29:1), 2,7 ml dH<sub>2</sub>O, 2,7 ml 1 M Tris pH 8.8, 38 µl 20 % SDS, 30 µl 10 % APS, 8 µl TEMED

10 % Trenngel: 2,5 ml 30 % Acrylamid / Bis-Acrylamid (29:1), 2,1 ml dH<sub>2</sub>O, 2,8 ml 1 M Tris pH 8.8, 38 µl 20 % SDS, 30 µl 10 % APS, 8 µl TEMED

12,5 % Trenngel: 3,1 ml 30 % Acrylamid / Bis-Acrylamid (29:1), 1,5 ml dH<sub>2</sub>O, 2,8 ml 1 M Tris pH 8.8, 38 µl 20 % SDS, 30 µl 10 % APS, 8 µl TEMED

1 x TBST: 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween

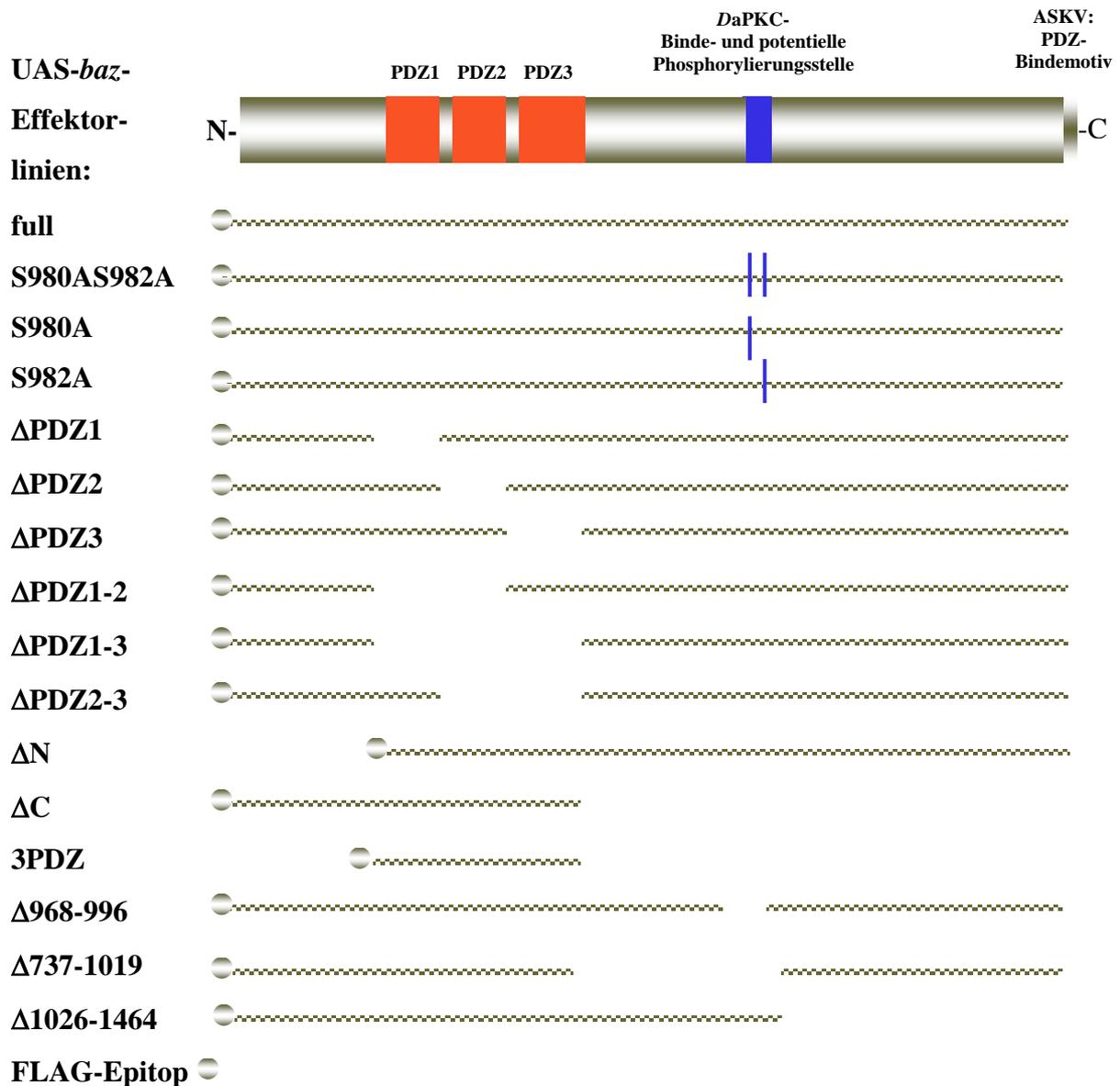
Blockierlösung : 3 % Milchpulver, 1 % BSA in 1 x TBST

### 3 Ergebnisse

Um die Funktion von Baz bei der Kontrolle der Zellpolarität in verschiedenen Zelltypen zu verstehen, ist die Identifikation von möglichen Interaktionspartnern von großer Bedeutung. Eine ebenso wichtige und notwendige Analyse betrifft jedoch die einzelnen Regionen des Proteins selbst. Die Frage, welche Aufgaben die verschiedenen Domänen erfüllen und welche für bestimmte Funktionen entbehrlich sind, war daher Gegenstand dieser Arbeit.

Das UAS-GAL4-System stellt eine bewährte Methode dar, um Gene ektopisch zu einem bestimmten Zeitpunkt und in einem bestimmten Gewebe zu exprimieren. Zu diesem Zweck wurden 16 Baz-Konstrukte mit jeweils verschiedenen Deletionen hergestellt (Abb. 3.1). Ein Teil der Konstrukte wurde bereits während meiner Diplomarbeit (Fischer, 2001) hergestellt (Tab. 3.1). Die Wahl der Deletionen und Punktmutationen stützte sich auf Kenntnisse, die man bereits von der Struktur von Baz hatte (CR1, CR2 und CR3) und auf die Einblicke, die an homologen Proteinen von Baz in anderen Spezies gewonnen worden waren. Im Verlauf dieser Arbeit zeigte sich, dass die Deletion, der im C-terminalen Bereich von Baz liegenden AS 738-1464 in Epithelzellen und Neuroblasten zu einer vollständig diffusen Verteilung von Baz in einem für *baz* wildtypischen Hintergrund führte. Zur gleichen Zeit veröffentlichte Nagai-Tamai et al. (2002) folgende Ergebnisse: In der DaPKC-Binde- und potentiellen Phosphorylierungsstelle (CR3: AS 971-985) von Baz liegen zwei Serine (S980/S982), die zwischen den verschiedenen Spezies evolutionär konserviert sind. In der Ratte konnte nun gezeigt werden, dass bei dem Homolog von Baz diese beiden Serine für die Bindung der aPKC an PAR-3 wichtig waren, aber nur S827, das mit S980 in Baz korrespondiert, phosphoryliert wurde. Die AS 816-841 (Baz: AS 969-994) waren notwendig und ausreichend für die Bindung der aPKC an PAR-3. Wurde S827 phosphoryliert, führte das zur Reduzierung der Stabilität des PAR/aPKC-Komplexes. Der Austausch dieser phosphorylierbaren AS S827 in eine nicht mehr phosphorylierbare AS A827 verhinderte die Phosphorylierung dieser Sequenz, aber nicht die Bindung der aPKC an PAR-3 (Nagai-Tamai et al., 2002). Später wurde gezeigt, dass in *Drosophila* die DaPKC nicht nur über die 2. und 3. PDZ-Domäne an Baz bindet (Wodarz et al., 2000), sondern auch über die DaPKC-Binde- und potentielle Phosphorylierungsstelle in Baz. Hierfür waren die AS 863-1097 von Baz hinreichend (Egger-Adam, 2005). Ob es sich bei der DaPKC-Bindestelle von Baz in *Drosophila* auch um eine Phosphorylierungsstelle handelt, ist noch nicht bekannt. Ebenso unbekannt ist, ob die Bindung der DaPKC und/oder die potentielle Phosphorylierung der DaPKC-Bindestelle für

die Lokalisierung und Funktion von Baz und somit des PAR/aPKC-Komplexes, notwendig sind. Deswegen wurden weitere Baz-Konstrukte (UAS-*baz*-Effektorlinien) angefertigt.



**Abb. 3.1 Schematische Darstellung der UAS-*baz*-Effektorlinien**

Die schematische Darstellung zur Herstellung der UAS-*baz*-Effektorlinien ist im Anhang (Anhang 2) wiedergegeben. Erläuterungen s. Text, Tab. 3.1 und Anhang 1.

Beim ersten Baz-Konstrukt wurde die *DaPKC*-Binde- und potentielle Phosphorylierungsstelle deletiert (Δ968-996). Durch dieses Konstrukt sollte geklärt werden, in wieweit dieser Teil für die Lokalisation und Funktion wichtig ist. Um zwischen Effekten der Bindung der *DaPKC* an Baz und einer eventuellen Phosphorylierung unterscheiden zu können, wurden bei drei Baz-Konstrukten verschiedene AS so ausgetauscht, dass sie nicht mehr phosphoryliert werden

konnten. Als Orientierung wurden hierbei die AS (S980 und/oder S982) ausgewechselt, die analog bei PAR-3 in der Ratte für die Bindung/Phosphorylierung notwendig waren.

Stamm	Name	Bemerkungen	Referenz
UAS- <i>baz</i> <sup>full</sup>	full	full-length Baz	Fischer, 2001
UAS- <i>baz</i> <sup>S980AS982</sup>	S980AS982A	full-length + Austausch: S980 und S982 [S→A] in der DaPKC-Binde- und pot. Phosphorylierungsstelle	diese Arbeit
UAS- <i>baz</i> <sup>S980A</sup>	S980A	full-length + Austausch der AS S980 [S→A] in der DaPKC-Binde- und potentiellen Phosphorylierungsstelle	diese Arbeit
UAS- <i>baz</i> <sup>S982A</sup>	S982A	full-length + Austausch der AS S982 [S→A] in der DaPKC-Binde- und potentiellen Phosphorylierungsstelle	diese Arbeit
UAS- <i>baz</i> <sup>ΔPDZ1</sup>	ΔPDZ1	Deletion: 1. PDZ-Domäne von Baz	Fischer, 2001
UAS- <i>baz</i> <sup>ΔPDZ2</sup>	ΔPDZ2	Deletion: 2. PDZ-Domäne von Baz	Fischer, 2001
UAS- <i>baz</i> <sup>ΔPDZ3</sup>	ΔPDZ3	Deletion: 3. PDZ-Domäne von Baz	Fischer, 2001
UAS- <i>baz</i> <sup>ΔPDZ1-2</sup>	ΔPDZ1-2	Deletion: 1.+ 2. PDZ-Domäne von Baz	Fischer, 2001; diese Arbeit
UAS- <i>baz</i> <sup>ΔPDZ1-3</sup>	ΔPDZ1-3	Deletion: 1.- 3. PDZ-Domäne von Baz	Fischer, 2001
UAS- <i>baz</i> <sup>ΔPDZ2-3</sup>	ΔPDZ2-3	Deletion: 2.+ 3. PDZ-Domäne von Baz	Fischer, 2001; diese Arbeit
UAS- <i>baz</i> <sup>ΔN</sup>	ΔN	Deletion: N-terminale AS 1-290	Fischer, 2001
UAS- <i>baz</i> <sup>ΔC</sup>	ΔC	Deletion: C-terminale AS 738-1464	Fischer, 2001; diese Arbeit
UAS- <i>baz</i> <sup>3PDZ</sup>	3PDZ	nur die 3 PDZ-Domänen,	Fischer, 2001; diese Arbeit
UAS- <i>baz</i> <sup>Δ968-996</sup>	Δ968-996	Deletion: AS 968-996 (DaPKC-Binde- und pot. Phosphorylierungsstelle)	diese Arbeit
UAS- <i>baz</i> <sup>Δ737-1019</sup>	Δ737-1019	Deletion: AS 737-1019	diese Arbeit
UAS- <i>baz</i> <sup>Δ1026-1464</sup>	Δ1026-1464	Deletion: AS 1026-1464	diese Arbeit

**Tab. 3.1** Verwendete UAS-Effektorlinien

Für jedes Baz-Konstrukt konnten mehrere transgene Linien erzeugt werden. Eine grobe Erläuterung der jeweiligen mutanten Baz-Konstrukte ist in der dritten Spalte aufgeführt. Weitere Angaben dazu befinden sich im Anhang (Anhang 1 und Anhang 2) und im Text.

Um die Analyse der C-terminalen Region von Baz unabhängig von der DaPKC-Bindestelle zu untersuchen, wurden zwei weitere Baz-Konstrukte hergestellt. Beim ersten Baz-Konstrukt erstreckt sich die Deletion von den PDZ-Domänen bis kurz hinter die DaPKC-Binde- und potentielle Phosphorylierungsstelle ( $\Delta 737-1019$ ) und beim zweiten Konstrukt wurde der Bereich deletiert, der hinter der DaPKC-Binde- und potentiellen Phosphorylierungsstelle beginnt und dann das C-terminal liegende PDZ-Bindemotiv mit einschließt ( $\Delta 1026-1464$ ). Diese beiden letzten Baz-Konstrukte sollten gegebenenfalls weitere Hinweise geben, um den für die Lokalisation/Funktion von Baz erforderlichen Bereich zu ermitteln.

Die Klonierung der einzelnen Konstrukte erfolgte in den P-Element Vektor pUAST-FLAG-Epitop (Anhang 1 und Anhang 2). Dieser spezielle Vektor ist so ausgestattet, dass mittels Mikromanipulation transgene UAS-*baz*-Effektorlinien erzeugt werden konnten und eine *in vivo* Analyse der verschiedenen mutanten Baz-Proteine möglich war. Für jedes Konstrukt konnten mehrere transgene Linien hergestellt werden. Kreuzte man eine GAL4-Aktivatorlinie gegen eine UAS-*baz*-Effektorlinie, konnte in der Nachkommenschaft die Expression des mutanten Baz-Proteins stattfinden.

Neben einer erfolgreichen Sequenzierung der Konstrukte wurde untersucht, ob die mutanten Baz-Proteine durch das GAL4-System in den Fliegen translatiert wurden und ob die zu erwartende Größe mit dem tatsächlichen Molekulargewicht übereinstimmte. Dafür wurden Ovarienlysate der 16 UAS-*baz*-Effektorlinien mittels proteinbiochemischer Methoden (SDS-PAGE-Gelelektrophorese / Western Blot) untersucht. Da die mutanten Proteine mit einem FLAG-Epitop fusioniert waren, sollte die Detektierung mit einem FLAG-Antikörper erfolgen. Es konnten dabei und bei der Aufreinigung über FLAG-Säulen (FLAG-Beads) keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden. Somit konnte weder die Translation des full-length Baz-Proteins und der mutanten Baz-Proteine in den Fliegen verifiziert werden, noch bestätigt werden, dass sie das erwartete Molekulargewicht hatten. In der Abb. 3.1 werden schematisch die erhaltenen UAS-*baz*-Effektorlinien dargestellt und in der Tab. 3.1 erläutert.

Um sich der Struktur und Funktion von Baz experimentell anzunähern, wurden die einzelnen Bereiche des Baz-Proteins zunächst in einem für *baz* genetisch wildtypischen Hintergrund untersucht. Für die Identifizierung der Regionen von Bazooka, die einerseits für seine korrekte Lokalisierung am apikalen Zytokortex von Neuroblasten und andererseits an der apikalen Membran von Epithelzellen notwendig sind, wurden Antikörperfärbungen an Embryonen und Ovarien durchgeführt. Die Expression der mutanten Baz-Proteine in den Epithelzellen der Ovarien ermöglichte der Follikelzelltreiber *Cu2*-GAL4 und die Expression

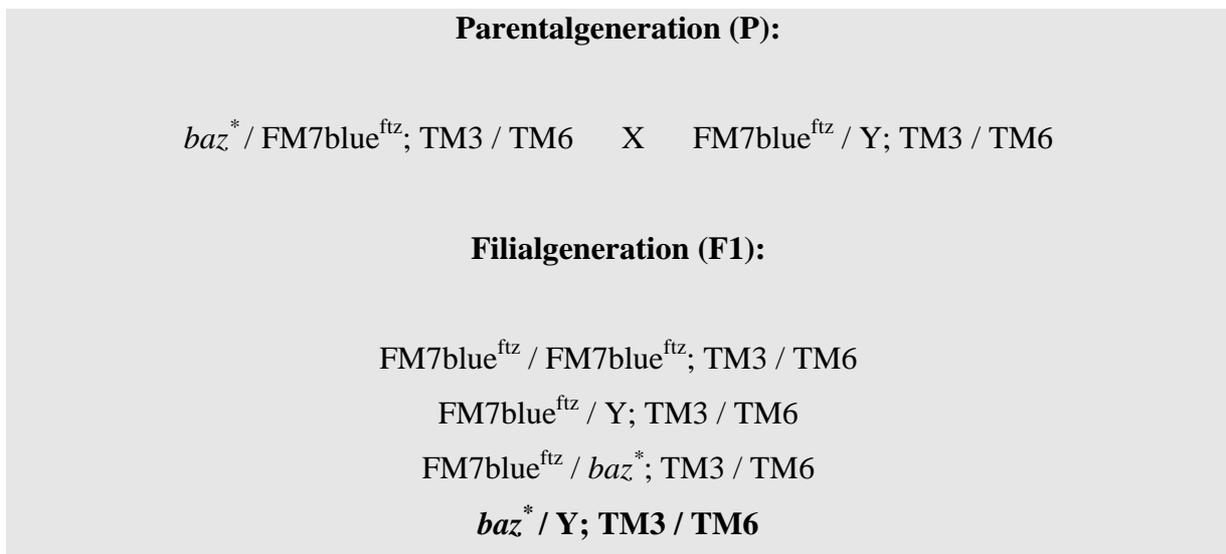
in der embryonalen Epidermis die Aktivatorlinien *en-GAL4* (Expression in den posterioren Segmentgrenzen), *daG32* (ubiquitär) und der maternale Treiber *mat67;15-GAL4*. Die ubiquitär exprimierende Aktivatorlinie *daG32* und der maternale Treiber *mat67;15-GAL4* erlaubten auch die Expression der mutanten Baz-Proteine in den Neuroblasten. Verschiedene Kombinationen an Dreifachfärbungen ermöglichten die Analyse der subzellulären Lokalisation der mutanten Baz-Proteine im Zusammenhang mit dem endogenen, wildtypischen Baz-Protein, den speziellen Markern für die Neuroblasten (z. B. Miranda), den zusätzlichen Markern für die Epithelien (z. B. DE-Cadherin) und der DNA (YoYo-Färbung). Im wildtypischen Hintergrund bestand die Möglichkeit, dass die mutanten Versionen von Baz direkt oder indirekt mit dem endogenen, wildtypischen Baz interagieren konnten. Dies galt insbesondere nachdem die mögliche Selbstassoziation von Baz festgestellt worden war (Benton & St. Johnston, 2003a). Interagieren die mutanten Proteine mit dem endogenen Baz, wird dadurch gegebenenfalls nicht ihre tatsächliche Fähigkeit zur korrekten Lokalisation wiedergespiegelt, die sie im Falle der vollständigen Abwesenheit des endogenen Baz zeigen würden.

Aus diesem Grund wurden die 16 mutanten Versionen von Baz auf ihre subzelluläre Lokalisation in einem für *baz* mutanten Hintergrund hin analysiert. Dafür wurden zunächst verschiedene Kreuzungen durchgeführt, um Stämme herzustellen, die im Folgenden beschrieben und als Grundstämme in dieser Arbeit bezeichnet werden. Diese Grundstämme enthalten ein mutantes *baz*-Allel, einen 'Blue-Balancer' (FM7blue<sup>ftz</sup>) und eine GAL4-Aktivatorlinie und konnten so gegen die UAS-*baz*-Effektorlinien gekreuzt werden. Im Anhang (Anhang 3) sind alle in dieser Arbeit hergestellten Grundstämme aufgeführt. Experimentell wurden, analog zu den Lokalisationsstudien in einem für *baz* wildtypischen Hintergrund, auch hier Antikörperfärbungen durchgeführt.

In Abb. 3.2 werden die Genotypen der mutanten *baz*-Allele wiedergegeben. Neben der unterschiedlichen Kopienzahl von wildtypischem und/oder mutantem Baz, verfügen alle Embryonen über maternal exprimiertes Baz. Hemizygoten Embryonen (*baz*\* / Y; TM3 / TM6) verschiedener mutanter *baz*-Allele stellen ein geeignetes System dar, die Untersuchungen in einem für *baz* mutanten Hintergrund *in vivo* durchzuführen.

Für das *baz*<sup>Xi106</sup>-Allel wurde gezeigt, dass es sich genetisch wie ein amorphes Allel verhält (Müller & Wieschaus, 1996) und in Keimbahnklonen (ohne maternales und ohne zygotisches Baz) sowie in mitotischen Klonen in Imaginalscheiben kein Baz-Protein detektierbar war (Wodarz et al., 1999; Bellaiche et al., 2001).

Tanentzapf und Tepass (2002) zeigten, dass in den zygotischen  $baz^{Xi106}$ -Mutanten das maternale Baz-Protein in den meisten Teilen des embryonalen Ektoderms in der späten Gastrulation (Stadium 9; Campos-Ortega & Hartenstein, 1997) nicht mehr detektierbar war. Ob sich das maternale Baz-Protein anderer  $baz$ -Allele ebenso verhält, sollte innerhalb dieser Arbeit geklärt werden.



**Abb. 3.2 Kreuzungsschema mutanter  $baz$ -Allele**

In der Parentalgeneration war das Weibchen heterozygot für das jeweilige mutante  $baz$ -Allel. Es entstanden in der F1-Generation verschiedene Genotypen, wobei nur das 1. und 3. Chromosom aufgeführt werden. Auf die Darstellung sämtlicher Kombinationen von TM3 und TM6 wurde verzichtet. ( $baz^*$ : mutantes  $baz$ -Allel ( $baz^{XR11}$ ,  $baz^{815-8}$ ,  $baz^{Xi106}$ ,  $baz^{EH747}$ ,  $baz^{EH171}$ ,  $baz^{XK75}$ );  $FM7blue^{ftz}$ : Balancer-Chromosom mit  $baz^+$ ; Y: Y-Chromosom).

Die vollständige Rettung des  $baz$  mutanten Phänotyps zu lebensfähigen adulten Tieren wurde von Ute Kuchinke et al. (1998) für das full-length Baz Protein gezeigt. Es stellte sich die Frage, welche Domänen für die Rettung des  $baz$  mutanten Phänotyps bis hin zu lebensfähigen adulten Tieren unerlässlich sind und welche nicht.

Fand keine vollständige Rettung der Letalität statt, sollten Antikörperfärbungen an den  $baz$  mutanten Embryonen Aufschluss geben, ob die jeweiligen mutanten Baz-Proteine die zellulären Defekte, die in  $baz$  mutanten Embryonen beobachtet wurden, teilweise oder vollständig retten konnten oder nicht. Im Fall der teilweisen Rettung sollte geklärt werden, ob einzelnen Domänen bestimmte Aufgaben zugeordnet werden können.

Das *bazooka*-Gen wurde bei der Suche nach zygotisch letalen Mutationen mit Defekten in der Kutikula identifiziert. Die Namensgebung für das Gen erklärt sich über das detektierte Muster in der Kutikula. Es erinnerte an Einschusslöcher einer Panzerfaust (Wieschaus et al., 1984). Diese Löcher in der Kutikula findet man bei zygotischen  $baz$  mutanten Embryonen.

Zusätzlich zu den großen dorsalen und ventralen Löchern zeigen sich noch Defekte im Kopfskelett. Hierbei handelt es sich um die wichtigsten Hauptmerkmale des Phänotyps. Die große Variationsbreite des *baz*<sup>-</sup>-Phänotyps wird vermutlich durch den unterschiedlichen Einfluss der maternalen Komponente hervorgerufen (Tearle & Nüsslein-Volhard, 1987; Kuchinke, 1998; Wodarz et al., 2000). Wird zusätzlich noch das maternale *baz* entfernt, entwickeln die meisten Embryonen gar keine kutikulären Strukturen mehr und nur sehr wenige Embryonen bilden noch kleine Reste an Kutikula (Wieschaus und Noell, 1986; Kuchinke, 1998). Die larvale Kutikula wird gegen Ende der Embryogenese von Epithelien sezerniert. Als Beispiele von Epithelien seien hier die Epidermis und Tracheen genannt. Auf diese Weise kann die Untersuchung der Kutikula Hinweise über den Zustand des sezernierenden Epithels geben. Aus diesem Grund wurden Kutikulapräparationen von abgestorbenen Embryonen, die aus den Rettungskreuzungen entstanden waren, hergestellt, um die Integrität der Kutikula zu analysieren. Um die genauen Veränderungen innerhalb des variablen Phänotyps bestimmen zu können, wurde zuerst der kutikuläre Phänotyp der verschiedenen *baz*-Allele in 10 Klassen eingeteilt. Dies stellte das notwendige Kriterium dar, um Veränderungen erfassen zu können.

### 3.1 Untersuchungen im für *baz* wildtypischen Hintergrund

Die subzellulären Lokalisationsstudien des full-length Baz-Proteins und mutanter Baz-Proteine im genetisch für *baz* wildtypischen Hintergrund erfolgten anhand von immunhistochemischen Analysen in Embryonen (Epithelien/NB) und Ovarien (Epithelien) von *Drosophila*. Die ektopische Expression der mutanten Baz-Proteine im Auge von *Drosophila* stellte ein künstlich erzeugtes System dar, durch das die unterschiedliche, willkürlich festgelegte Funktionalität der verschiedenen mutanten Baz-Proteine verglichen werden konnte.

#### 3.1.1 Analyse der subzellulären Lokalisation des full-length Baz-Proteins und mutanter Baz-Proteine in embryonalen Epithelien

Embryonen (Stadium 9-12) aus Kreuzungen der *en*-, *daG32*- oder *mat67;15*-GAL4-Aktivatorlinien gegen UAS-*baz*-Effektorlinien wurden fixiert und mit verschiedenen Antikörpern gefärbt. Die Untersuchungen erfolgten mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops. UAS-*baz*<sup>full</sup> und die folgenden mutanten Transgen-kodierten Baz-Proteine UAS-*baz*<sup>S980AS982</sup>, UAS-*baz*<sup>APDZ1</sup>, UAS-*baz*<sup>APDZ1-2</sup> und UAS-*baz*<sup>ΔN</sup> lokalisierten in

der embryonalen Epidermis apikal an der Plasmamembran, wie das Kuchinke et al. (1998) für das endogene, wildtypische Baz-Protein zeigen konnten (Abb. 3.3; 1. Klasse).

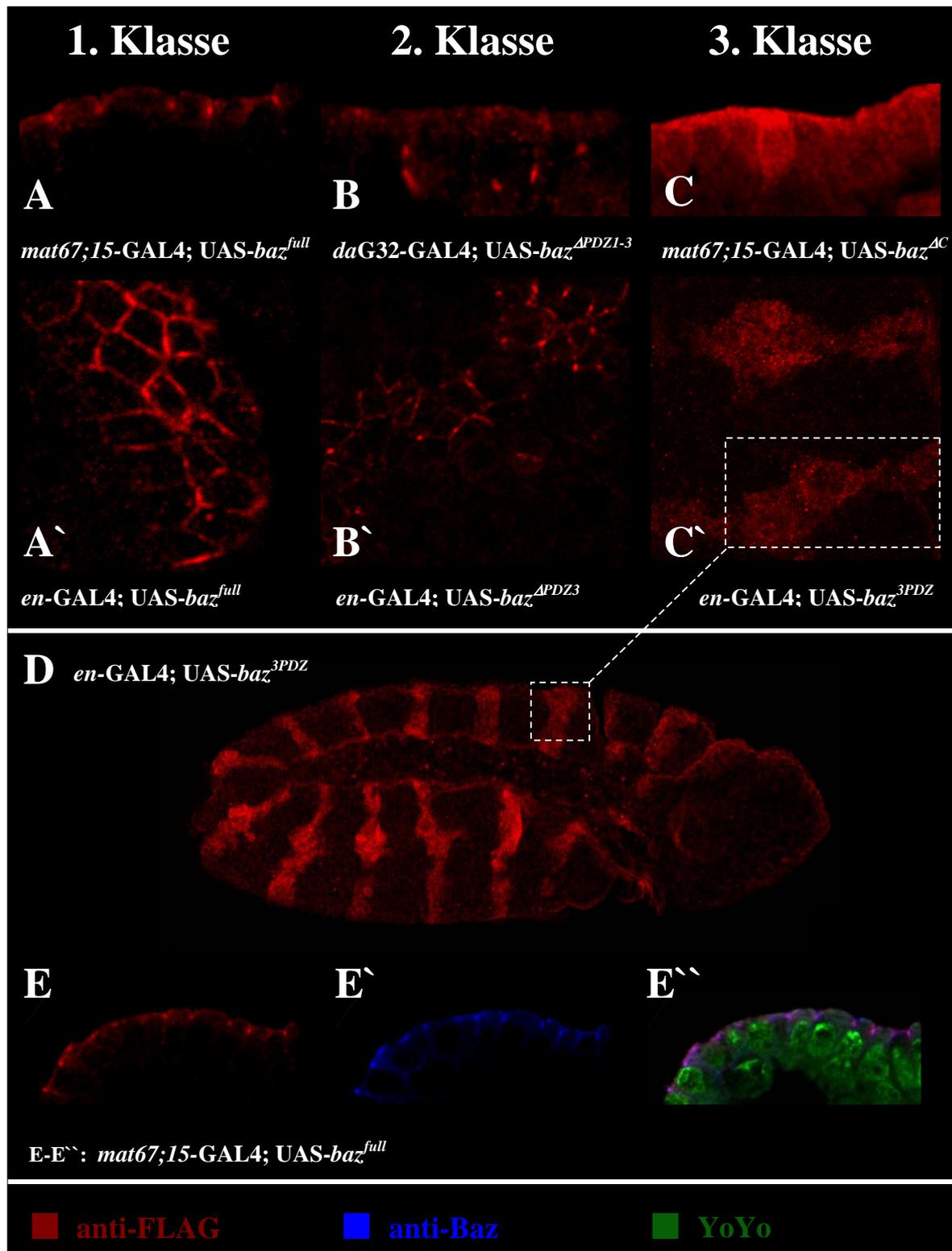
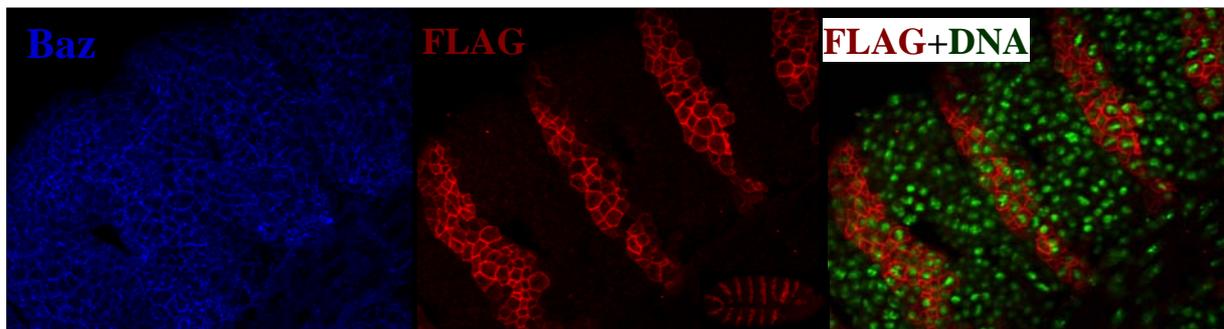


Abb. 3.3 Subzelluläre Lokalisation des full-length Baz-Proteins und mutanter Baz-Proteine in der Epidermis. Text s. nächste Seite.

### Abb. 3.3 Subzelluläre Lokalisation des full-length Baz-Proteins und mutanter Baz-Proteine in der Epidermis

Embryonen (Stadium: 9-12) aus folgenden Kreuzungen wurden mit dem FLAG-Antikörper gefärbt, um die mutanten Baz-Proteine sichtbar zu machen: *en-* (A`, B`, C` und D), *daG32-* (B) *mat67;15-* (A, C, E, E`, E``) GAL4-Aktivatorlinie x UAS-*baz*-Effektorlinie (A, A`, E, E`, E``: UAS-*baz*<sup>full</sup>, B: UAS-*baz*<sup>APDZ1-3</sup>, B`: UAS-*baz*<sup>APDZ3</sup>, C: UAS-*baz*<sup>AC</sup>, C`, D: UAS-*baz*<sup>3PDZ</sup>). Das full-length Baz-Protein und die mutanten Baz-Proteine wurden in Bezug auf ihre subzelluläre Lokalisation in der embryonalen Epidermis in drei Klassen eingeteilt. Je ein oder zwei Vertreter einer jeden Klasse werden hier exemplarisch aufgeführt, um das Lokalisationsmuster jeder Klasse darzustellen. Die mutanten Baz-Proteine der 1. Klasse zeigten eine wildtypische Verteilung an der apikalen Membran in der embryonalen Epidermis (A, A`, E-E``). Bei den mutanten Proteinen der 2. Klasse zeigte sich eine entweder punktuelle oder mehr apikal-laterale Lokalisation an der Plasmamembran (B, B`) und die mutanten Proteine der 3. Klasse waren diffus im Zytoplasma verteilt (C, C`, D). D: Gezeigt wird ein *Drosophila* Embryo mit 14 segmentalen *engrailed*-Streifen in der Epidermis. Ausschnitte von diesen Streifen sind in A`, B` und C` angegeben, wobei der Embryo nur als Beispiel fungiert und der gestrichelte Ausschnitt nicht direkt von diesem Embryo genommen wurde. A, B, C: optische Sagittalschnitte von Embryonen. Um die Lokalisationen der mutanten Baz-Proteine der einzelnen Klassen im direkten Zusammenhang vergleichen zu können, wurde auf die Darstellung der DNA und des endogenen Baz verzichtet. In E (FLAG), E` (Baz) und E`` (DNA (YoYo), FLAG, Baz) wird dieser Zusammenhang mit der DNA, Baz und FLAG exemplarisch hergestellt. Die Zuordnung des full-length Baz-Proteins und der mutanten Baz-Proteine zu den verschiedenen Klassen ist der Tab. 3.2 und dem Text zu entnehmen (A, B, C, E-E``: apikal: oben, basal: unten).

Bei UAS-*baz*<sup>ΔN</sup> zeigte sich bei mehreren transgenen Linien dieses Baz-Konstrukts, dass die Intensität der Färbung im Vergleich mit allen anderen mutanten Baz-Proteinen deutlich stärker war. Abb. 3.4 zeigt die Überexpression des ΔN Baz-Proteins in *engrailed*-Streifen.



### Abb. 3.4 Starke Überexpression des ΔN Baz-Proteins in *engrailed*-Streifen

Aufsicht auf die Epidermis des im Inset gezeigten Embryos (Stadium 11), der aus der Kreuzung der *en*-GAL4-Aktivatorlinie gegen die UAS-*baz*<sup>ΔN</sup>-Effektorlinie hervorgegangen war. Der FLAG-AK detektiert das überexprimierte mutante ΔN Baz-Protein. Die Lokalisation des endogenen, wildtypischen Baz-Proteins wird durch die Expression des ΔN Baz-Proteins nicht beeinflusst. Der N-terminale Baz-AK erkennt in dieser Färbung nur das endogene Protein, da im ΔN Baz-Protein der N-terminale Bereich deletiert ist.

Ebenfalls an der Plasmamembran, aber nicht auf den apikalen Bereich beschränkt, lokalisierten die folgenden mutanten Baz-Proteine: UAS-*baz*<sup>APDZ2</sup>, UAS-*baz*<sup>APDZ3</sup>, UAS-*baz*<sup>APDZ2-3</sup> und UAS-*baz*<sup>APDZ1-3</sup> (Abb. 3.3; 2. Klasse). Die Lokalisierung erstreckte sich entweder punktuell oder in längeren zusammenhängenden Abschnitten entlang der apikalen und lateralen Plasmamembran. Eine diffuse Verteilung der mutanten Proteine im Zytoplasma

zeigten **UAS-*baz*<sup>ΔC</sup>**, **UAS-*baz*<sup>3PDZ</sup>**, **UAS-*baz*<sup>Δ968-996</sup>** und **UAS-*baz*<sup>Δ737-1019</sup>**. Teilweise fand man auch eine Verteilung dieser mutanten Proteine an der Membran (Abb. 3.3; **3. Klasse**). Drei Linien, **UAS-*baz*<sup>S980A</sup>**, **UAS-*baz*<sup>S982A</sup>** und **UAS-*baz*<sup>Δ1026-1464</sup>**, zeigten eine sehr schwache Färbung in Fluoreszenzpräparaten, weswegen bislang noch keine Aufnahmen gemacht werden konnten.

Die Verteilung der mutanten Baz-Proteine S982A und S980A sah, obwohl nur sehr schwach erkennbar, wildtypisch aus und könnte den mutanten Proteinen der 1. Klasse zugeordnet werden. Die Lokalisation des Δ1026-1464 Baz-Proteins sah zytoplasmatisch aus, wodurch man dieses Protein den mutanten Baz-Proteinen der 3. Klasse zuordnen könnte. Allerdings war bei allen drei Proteinen eine Unterscheidung zwischen einer Hintergrundfärbung, die durch den FLAG-Antikörper verursacht wurde und einer echten Expression, nicht eindeutig möglich. Neben dem FLAG-Signal wurde auch das endogene, wildtypische Baz sowie die DNA (YoYo) angefärbt. Hierbei zeigte sich, dass der Baz-Antikörper nahezu alle oben aufgeführten mutanten Baz-Proteine, mit Ausnahme des ΔN Baz-Proteins und des 3PDZ Baz-Proteins, ebenfalls detektieren konnte. Die drei mutanten Baz-Proteine, **UAS-*baz*<sup>S980A</sup>**, **UAS-*baz*<sup>S982A</sup>** und **UAS-*baz*<sup>Δ1026-1464</sup>**, deren FLAG-Färbung sehr schwach war, zeigten auch keine eindeutige Baz-Färbung.

Nicht in allen Fällen konnte zwischen endogenem Baz und den mutanten Baz-Proteinen, die ebenfalls mit dem Baz-Antikörper gefärbt wurden, unterschieden werden. Somit war bei der Analyse der mutanten Baz-Proteine der 2. und 3. Klasse nicht immer klar, ob das endogene Baz ebenfalls fehllokalisiert wurde.

Lediglich die Untersuchung des 3PDZ Baz-Proteins zeigte die wildtypische Verteilung des endogenen Baz (Baz-Antikörper) und die Fehlverteilung des mutanten Baz-Proteins (FLAG-Antikörper) aufgrund des fehlenden N-terminalen Bereichs von Baz (N-terminaler Baz-Antikörper) „getrennt“ von einander (ohne Abbildung). Das bedeutet, dass das mutante 3PDZ Baz-Protein nicht an das endogene Baz binden konnte.

In der Tab. 3.2 werden die Ergebnisse tabellarisch aufgelistet und die Abb. 3.3 zeigt die ektopische Expression jeweils eines mutanten Proteins aus der 1., 2. und 3. Klasse. In der oberen Reihe geben Querschnitte an Embryonen einen Einblick in die Lokalisation der mutanten Baz-Proteine. Hier wurden der *mat67;15*- und der *daG32*-Treiber eingesetzt. Entsprechend darunter sieht man, in einem Ausschnitt, eine *en*-GAL4-abhängige Expression der mutanten Proteine in segmentalen Streifen in der Epidermis. Dabei wird eine Aufsicht auf die Embryonen gezeigt. Um die Lokalisationen der mutanten Baz-Proteine im direkten Zusammenhang vergleichen zu können, wurde auf die Darstellung der Färbung der DNA und

von Baz verzichtet. In der untersten Reihe wird dann dieser Zusammenhang mit der DNA, Baz und FLAG exemplarisch hergestellt.

**Zusammenfassend** kann festgehalten werden, dass die verschiedenen mutanten Versionen von Baz in Bezug auf ihre subzelluläre Lokalisation in Gegenwart des endogenen, wildtypischen Baz-Proteins in drei Klassen eingeteilt werden konnten. Die mutanten Proteine der **1. Klasse** zeigten eine wildtypische Verteilung, die mutanten Proteine der **2. Klasse** wiesen eine unpolarierte Lokalisation entlang der Membran auf und die mutanten Proteine der **3. Klasse** waren vollständig diffus im Zytoplasma verteilt.

UAS- <i>baz</i> - Effektor- linien	Klasse	apikal an der Membran	punktuell oder in längeren zusammenhängenden Abschnitten entlang der apikalen und lateralen Plasmamembran	diffuse Verteilung im Zyto- plasma
full	1	X		
S980AS982A	1	X		
S980A	1	(X)*		
S982A	1	(X)*		
ΔPDZ1	1	X		
ΔPDZ2	2		X	
ΔPDZ3	2		X	
ΔPDZ1-2	2	X		
ΔPDZ1-3	2		X	
ΔPDZ2-3	2		X	
ΔN	1	X**		
ΔC	3			X
3PDZ	3			X
Δ968-996	3			X
Δ737-1019	3			X
Δ1026-1464	3			(X)*

**Tab. 3.2 Zusammenfassung der Ergebnisse der subzellulären Lokalisationsstudie des full-length Baz-Proteins und mutanter Baz-Proteine in der embryonalen Epidermis**

Das full-length Baz-Protein und die mutanten Baz-Proteine wurden bezüglich ihrer Lokalisation in den Epithelien in drei Klassen eingeteilt. Die mutanten Proteine in der **1. Klasse** lokalisierten, wie das endogene Baz-Protein, apikal an der Membran, die mutanten Proteine der **2. Klasse** lokalisierten punktuell oder in längeren zusammenhängenden Abschnitten entlang der apikalen und lateralen Plasmamembran und die mutanten Proteine der **3. Klasse** verteilten sich vollständig diffus im Zytoplasma. X\*\*: Das ΔN Baz-Protein bildete eine Ausnahme, es zeigte an sich eine wildtypische Lokalisierung, wurde aber, vermutlich aufgrund seiner starken Expression, gelegentlich teilweise lateraler lokalisiert. (X)\*: Bei der Überexpression von drei mutanten Baz-Proteinen (Δ1026-1464 / S980A / S982A) konnten, aufgrund einer sehr schwachen Färbung, noch keine Aufnahmen am konfokalen Mikroskop erfolgen.

Daraus ergab sich, dass die C-terminalen AS 738-1464 für die Lokalisierung von Baz an der Epidermismembran zuständig waren.

Für die genaue Zuordnung, welcher Bereich der C-terminalen AS 738-1464 von Baz für die Lokalisierung notwendig war, wurden sechs weitere Baz-Konstrukte hergestellt. Das Ergebnis war, dass der Austausch der potentiell phosphorylierbaren AS in nicht mehr phosphorylierbare AS keine Auswirkung auf die Lokalisierung von Baz an der Epidermismembran hatte. Somit lag die Vermutung nahe, dass Baz für seine Lokalisierung an der Membran nicht an den AS S980 und AS S982 phosphoryliert werden musste. Die übrigen drei mutanten Baz-Proteine, bei denen kleinere Bereiche des C-terminalen Bereichs (AS738-1464) deletiert waren, zeigten, bis auf die UAS-*baz*<sup>Δ1026-1464</sup>-Linie, alle eine zytoplasmatische Verteilung. Bei der UAS-*baz*<sup>Δ1026-1464</sup>-Linie war nur ein sehr schwaches Signal zu erkennen, bzw. es konnte nicht zwischen der FLAG-Hintergrundfärbung unterschieden werden.

Ein weiteres Ergebnis war, dass die N-terminalen AS 1-290 von Baz und die 1. PDZ-Domäne vermutlich nicht für die Lokalisierung von Baz an der Membran notwendig waren. War die 1. PDZ-Domäne zusammen mit der 2. PDZ-Domäne deletiert, galt diese Aussage ebenso. Dieses Ergebnis stand im Gegensatz zu den Resultaten, die am Baz-Homolog PAR-3 in Vertebraten gefunden worden waren.

### **Domänen von Baz → Funktion/en in der embryonalen Epidermis in einem für *baz* wildtypischen Hintergrund**

**C-terminaler Bereich AS 738-1464** → war notwendig für die Lokalisierung von Baz an der Epidermismembran in Embryonen von *Drosophila*

**DaPKC-Binde- und pot. Phosphorylierungsstelle** → war erforderlich für die Lokalisierung von Baz an der Epidermismembran in Embryonen von *Drosophila*

**AS 1-290 und 1. PDZ-Domäne** → waren für die Lokalisierung von Baz an der Plasmamembran entbehrlich

**S980 und S982** → die beiden AS S980 und S982 mussten für die Lokalisierung von Baz an der Membran nicht phosphoryliert werden

**2. und 3. PDZ-Domänen** → waren notwendig für die apikale Lokalisierung von Baz

Tab. 3.3 Die Aufgaben der verschiedenen Domänen von Baz, hinsichtlich der subzellulären Lokalisationsstudie der mutanten Baz-Proteine in der embryonalen Epidermis von *Drosophila*  
Erläuterungen s. Text.

Ebnet et al. (2001) zeigten, dass PAR-3 mit seiner 1. PDZ-Domäne an das TJ-Protein JAM-1 binden konnte und dadurch die Bindung an die TJ-Membran ermöglicht wurde. Hier in *Drosophila* stellte die 1. PDZ-Domäne von Baz nicht den Bereich dar, der für die Membranverankerung notwendig war. Ein drittes Resultat wurde in der Lokalisierung der mutanten Proteine deutlich, denen die 2. und/oder 3. PDZ-Domäne oder alle drei PDZ-Domänen fehlten. Sie waren unipolar entlang der Epidermismembran verteilt. So schienen die 2. und 3. PDZ-Domäne für die apikale Lokalisierung von Baz an der Membran verantwortlich gewesen zu sein. Die Aufgaben der Domänen von Baz, hinsichtlich der subzellulären Lokalisierungsstudie in einem für *baz* wildtypischen Hintergrund in der embryonalen Epidermis, sind in der Tab. 3.3 (s.o.) zusammengefasst.

### 3.1.2 Analyse der subzellulären Lokalisation des full-length Baz-Proteins und mutanter Baz-Proteine in Neuroblasten, den Stammzellen des ZNS

Für die Analyse der subzellulären Lokalisation des full-length Baz-Proteins und der mutanten Baz-Proteine in den NB wurden Embryonen (Stadium 9-12) aus Kreuzungen *daG32*- oder *mat67;15*-GAL4-Aktivatorlinie gegen UAS-*baz*-Effektorlinien fixiert und mit unterschiedlichen Antikörpern gefärbt.

Nachstehend wird, in einem für *baz* wildtypischen Hintergrund, die subzelluläre Lokalisation des full-length Baz-Proteins und der mutanten Versionen von Baz in den Neuroblasten, den Vorläuferzellen des Zentralnervensystems, untersucht. UAS-*baz*<sup>full</sup> und die folgenden mutanten Transgen-kodierten Baz-Proteine UAS-*baz*<sup>APDZ1</sup>, UAS-*baz*<sup>APDZ1-2</sup> und UAS-*baz*<sup>ΔN</sup> lokalisierten in den Metaphase-Neuroblasten am apikalen Zytokortex in einer halbmondförmigen Struktur, wie das Kuchinke et al. (1998) für das endogene, wildtypische Baz-Protein zeigen konnten (Abb. 3.5; **1. Klasse**). Wie bereits bei der Überexpression des ΔN Baz-Proteins in der Epidermis erwähnt wurde, zeigte sich auch hier gelegentlich, vermutlich aufgrund der starken Expression des mutanten Proteins, eine Ausweitung der Färbung in Richtung des basalen Zellpols, verglichen mit der Lokalisation des endogenen Baz-Proteins.

In teilweiser punktueller Form lokalisierten die folgenden mutanten Baz-Proteine an der Membran sowie teilweise leicht im Zytoplasma: UAS-*baz*<sup>APDZ2</sup>, UAS-*baz*<sup>APDZ3</sup>, UAS-*baz*<sup>APDZ2-3</sup> und UAS-*baz*<sup>APDZ1-3</sup> (Abb. 3.5; **2. Klasse**). In wieweit hier zwischen einer Hintergrundfärbung (FLAG-Antikörper) und einer echten Lokalisierung der mutanten Proteine genau unterschieden werden konnte, war schwierig zu beurteilen. Die polarisierte Verteilung schien nicht mehr gegeben zu sein.

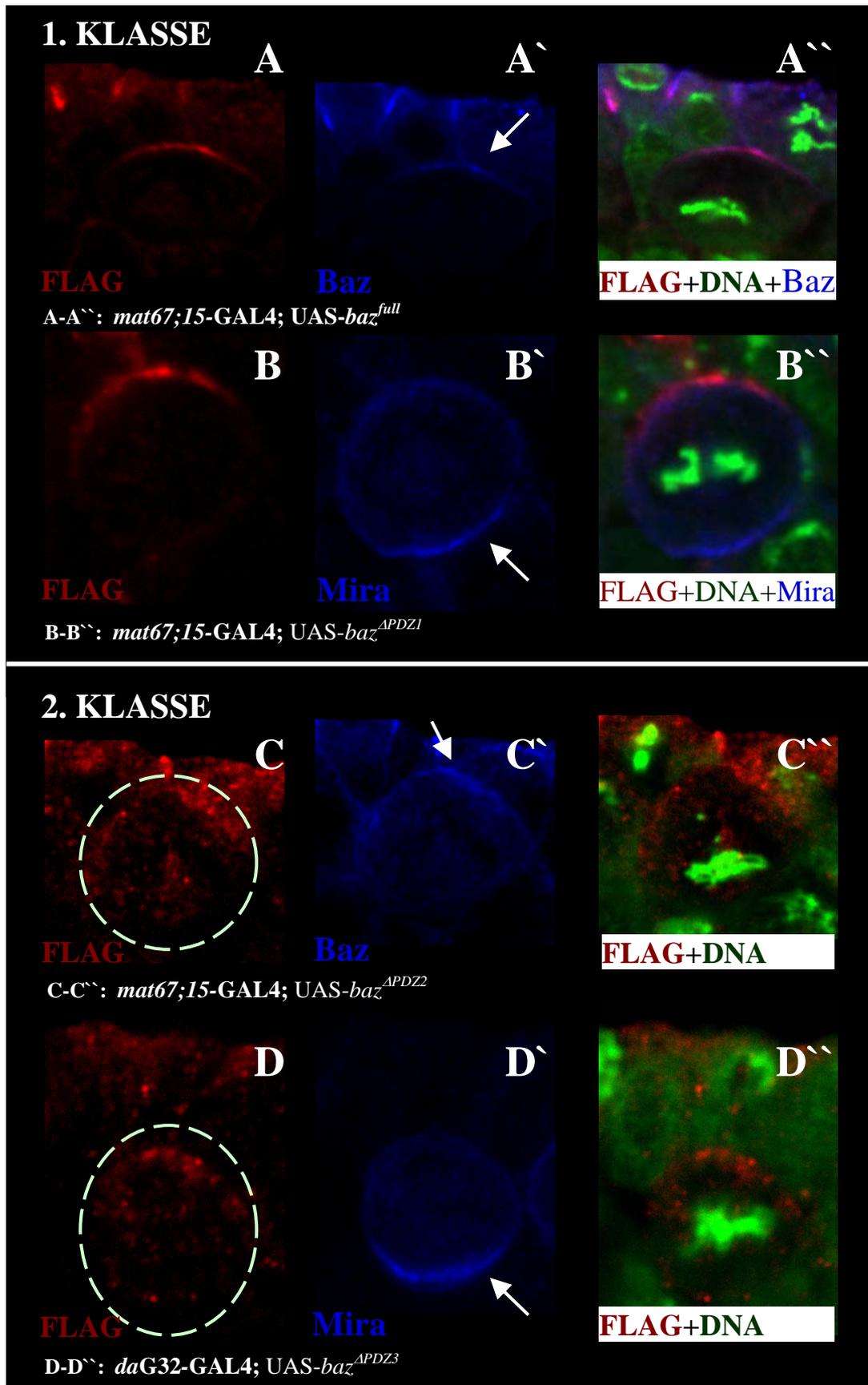
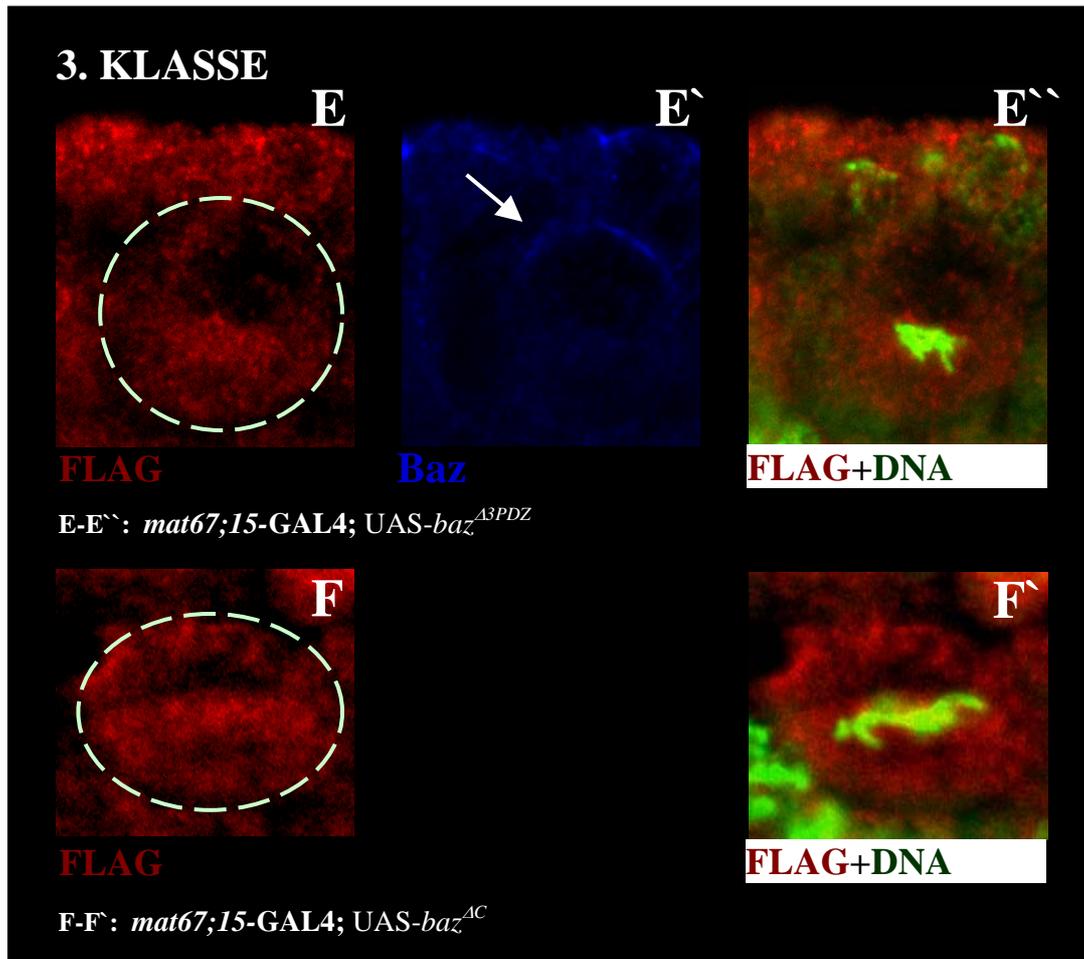


Abb. 3.5 Subzelluläre Lokalisation des full-length Baz-Proteins und mutanter Baz-Proteine in Neuroblasten. Text am Ende der Abbildung.



**Abb. 3.5 Subzelluläre Lokalisation des full-length Baz-Proteins und mutanter Baz-Proteine in Neuroblasten**

Embryonen (Stadium: 9-12) aus folgenden Kreuzungen wurden mit dem FLAG-Antikörper gefärbt, um die mutanten Proteine in den NB sichtbar zu machen: *daG32-* (D-D'') oder *mat67;15-* (A-A'', B-B'', C-C'', E-E'', F-F'') GAL4-Aktivatorlinie x UAS-*baz*-Effektorlinie (A-A'': UAS-*baz*<sup>full</sup>, B-B'': UAS-*baz*<sup>APDZ1</sup>, C-C'': UAS-*baz*<sup>APDZ2</sup>, D-D'': UAS-*baz*<sup>APDZ3</sup>, E-E'': UAS-*baz*<sup>3PDZ</sup>, F-F'': UAS-*baz*<sup>AC</sup>). Es werden Ausschnitte mit Metaphase-NB dargestellt. Das full-length Baz-Protein und die mutanten Baz-Proteine wurden, hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation in den NB, in drei Klassen eingeteilt. Je zwei Vertreter einer jeden Klasse werden exemplarisch aufgeführt, um das Lokalisationsmuster jeder Klasse darzustellen. In der 1. Klasse sind die mutanten Baz-Proteine, die die wildtypische Verteilung in einer halbmondförmigen Struktur am apikalen Zytokortex in den NB aufwiesen (A-A'' und B-B''). Die 2. Klasse beinhaltet die mutanten Baz-Proteine, die eine teilweise punktuelle Lokalisation am Zytokortex sowie leicht im Zytoplasma zeigten (C-C'' und D-D'') und in der 3. Klasse sind die mutanten Baz-Proteine, die vollständig diffus im Zytoplasma verteilt waren (E-E'' und F-F'). A-F: FLAG; A', C', E': Baz; B', D': Mira; A'': DNA, FLAG, Baz; B'': DNA, FLAG, Mira; C''-F'': DNA, FLAG. Zur besseren Übersichtlichkeit werden nur die FLAG- und DNA-Färbungen gezeigt. C-F: gestrichelte Kreise umranden jeweils einen NB; weiße Pfeile weisen auf eine apikale Baz- oder basale Mira-Färbung hin. Die Zuordnung des full-length Baz-Proteins und der mutanten Baz-Proteine zu den verschiedenen Klassen ist der Tab. 3.4 und dem Text zu entnehmen. (apikal: oben, basal: unten).

Eine diffuse, zytoplasmatische Lokalisierung im Metaphase-Neuroblasten zeigten folgende mutante Baz-Proteine: UAS-*baz*<sup>AC</sup> und UAS-*baz*<sup>3PDZ</sup>. Insbesondere bei UAS-*baz*<sup>3PDZ</sup> fiel auf, dass sich das mutante Baz-Protein mehr in der basalen als in der apikalen Hälfte des Metaphase-Neuroblasten befand (Abb. 3.5; **3. Klasse**).

Die Kreuzungen mit nachstehenden Linien zeigten in den Nachkommen bislang noch keinen NB, in dem die Expression des entsprechenden mutanten Baz-Proteins zu beobachten war: **UAS-baz<sup>S980AS982</sup>**, **UAS-baz<sup>S980A</sup>**, **UAS-baz<sup>S982</sup>**, **UAS-baz<sup>A968-996</sup>**, **UAS-baz<sup>A737-1019</sup>** und **UAS-baz<sup>A1026-1464</sup>**.

Neben dem FLAG-Antikörper, um die mutanten Baz-Proteine zu detektieren, wurde entweder der Baz- oder der Mira-Antikörper verwendet und eine YoYo-Färbung (DNA) sollte die Metaphase-Neuroblasten sichtbar machen.

Es zeigte sich jedoch, dass der Baz-AK nur Proteine erfasste, die eine halbmondförmige Struktur am apikalen Zytokortex der NB bildeten. Entweder wurde hier nur das endogene Baz detektiert oder man konnte von einer Kolo-kalisierung der Proteine sprechen, die sowohl mit dem Baz, als auch mit dem FLAG-AK erfasst werden konnten.

In den beiden Fällen des  $\Delta N$  Baz-Proteins und des 3PDZ Baz-Proteins war eindeutig das endogene Baz apikal in einer halbmondförmigen Struktur zu erkennen. Bei den übrigen mutanten Baz-Proteinen, bei denen eine FLAG-Färbung in den NB zu erkennen war, konnte eine solche klare Festlegung nicht erfolgen. In fast allen diesen NB zeigte sich die wildtypische halbmondförmige Struktur am apikalen Zytokortex, die mit dem Baz-AK sichtbar wurde. Eine Ausnahme bildete das mutante  $\Delta C$  Baz-Protein, da in einem NB nie gleichzeitig eine apikale halbmondförmige Struktur, die mit dem Baz-Antikörper detektiert wurde, und eine zytoplasmatische FLAG-Färbung entdeckt wurden. Darüber hinaus wurde keine Kolo-kalisierung in den punktförmig erfassten Strukturen ermittelt. Dadurch ist nicht sicher, in wie weit wirklich von einem punktförmigen Muster der mutanten Baz-Proteine der 2. Klasse in den NB gesprochen werden konnte.

In tabellarischer Form werden die Ergebnisse in Tab. 3.4 aufgelistet und in Abb. 3.5 werden jeweils von zwei Vertretern einer Klasse die Überexpression des full-length Baz-Proteins und der mutanten Baz-Proteine in den NB exemplarisch abgebildet.

Eine **Zusammenfassung** der Ergebnisse, die aus der subzellulären Lokalisationsstudie des full-length Baz-Proteins und der verschiedenen mutanten Baz-Proteine in den NB gewonnen wurde, stellt sich wie folgt dar: Analog zu den Resultaten in der embryonalen Epidermis, konnten die verschiedenen mutanten Versionen von Baz in Bezug auf ihre subzelluläre Lokalisation in den NB in Gegenwart des endogenen, wildtypischen Baz-Proteins in drei Klassen eingeteilt werden.

UAS- <i>baz</i> -Effektor-Linien	Klasse	apikale, halbmondförmige Struktur am Zytokortex	teilweise punktuelle Lokalisation, an der Membran / z. T. leicht im Zytoplasma	zytoplasmatische Verteilung im Metaphase - NB
full	1	X		
S980AS982A	—			
S980A	—			
S982A	—			
$\Delta$ PDZ1	1	X		
$\Delta$ PDZ2	2		X	
$\Delta$ PDZ3	2		X	
$\Delta$ PDZ1-2	2	X		
$\Delta$ PDZ1-3	2		X	
$\Delta$ PDZ2-3	2		X	
$\Delta$ N	1	X		
$\Delta$ C	3			X
3PDZ	3			X
$\Delta$ 968-996	—			
$\Delta$ 737-1019	—			
$\Delta$ 1026-1464	—			

**Tab. 3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der subzellulären Lokalisationsstudie des full-length Baz-Proteins und mutanter Baz-Proteine in den Neuroblasten**

Das full-length Baz-Protein und die mutanten Baz-Proteine konnten bezüglich ihrer Lokalisation in den NB in drei Klassen eingeteilt werden. Das full-length Baz-Protein und die mutanten Baz-Proteine in der **1. Klasse** lokalisierten wie das endogene Baz-Protein apikal am Zytokortex und bildeten im Metaphase-NB eine apikale halbmondförmige Struktur, die mutanten Baz-Proteine der **2. Klasse** lokalisierten teilweise punktuell sowohl an der Membran, als auch im Zytoplasma und die mutanten Baz-Proteine der **3. Klasse** verteilten sich diffus im Zytoplasma. Bei sechs UAS-*baz*-Effektorlinien war die Expression der mutanten Proteine in NB nicht nachweisbar. Erläuterungen s. Text.

Die mutanten Baz-Proteine der **1. Klasse** zeigten eine wildtypische Verteilung, d. h. sie bildeten in der Metaphase im NB eine apikale, halbmondförmige Struktur am Zytokortex, die mutanten Baz-Proteine der **2. Klasse** wiesen eine unpolarierte, teilweise punktuelle Lokalisation entlang der Membran auf und die mutanten Baz-Proteine der **3. Klasse** waren vollständig diffus im Zytoplasma der Metaphase-Neuroblasten verteilt. Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass die C-terminalen AS 738-1464 für die Lokalisierung von Baz am Zytokortex der Metaphase-Neuroblasten in einem für *baz* wildtypischen Hintergrund zuständig waren. Um den Bereich einzugrenzen, der für die Lokalisierung von Baz am Zytokortex notwendig war, wurden sechs weitere Baz-Konstrukte hergestellt. Bislang zeigte keine dieser UAS-*baz*-Effektorlinien, wenn sie mit verschiedenen GAL4-Aktivatorlinien gekreuzt wurde, in den Nachkommen dieser Kreuzung eine Expression

der jeweiligen mutanten Baz-Proteine in den NB. Generell kann dazu gesagt werden, dass auch die Expressionsrate der jeweiligen mutanten Baz-Proteine, in den übrigen, bereits untersuchten UAS-*baz*-Effektorlinien in den NB gering war. Der Grund dafür könnte darin gelegen haben, dass der Zellzyklus in den NB von kurzer Dauer ist (ca. 1 h).

Somit war es schwierig einen hohen Expressionslevel von GAL4-getriebenen transgenen Linien zu erhalten, da sowohl das GAL4-Protein, als auch die GAL4-abhängigen Transgene hintereinander transkribiert und translatiert werden mussten, bevor das Protein, das durch das Transgen kodiert wurde, mittels immunhistochemischer Methoden detektiert werden konnte.

Deswegen wurden weitere GAL4-Treiberlinien ausgetestet. Insbesondere wurden Treiberlinien ausgewählt, die speziell in den NB die Expression der mutanten Baz-Proteine ermöglichen sollten. Sie werden im folgenden aufgezählt: *insc*-GAL4, *pros*-GAL4, *sca*-GAL4, *elav*-GAL4. Bei der Verwendung dieser GAL4-Aktivatorlinien wurde kein einziger NB mit der Expression eines mutanten Baz-Proteins entdeckt. Um auszuschließen, dass diese Treiberlinien nicht mehr funktionell waren, wurde die UAS-*lacZ*-Effektorlinie zur Überprüfung eingesetzt. Dabei stellte sich heraus, dass jede Aktivatorlinie funktionell war. Neben den speziell für die NB entwickelten GAL4-Aktivatorlinien wurden noch verschiedene ubiquitär exprimierende Linien ausgewählt (*actin*-GAL4, *arm*-GAL4) sowie auch verschiedene maternale Treiber (*mat7062*-GAL4, *mat7063*-GAL4). Die geringe Expressionsrate konnte dadurch nicht erhöht werden.

Ein weiteres Resultat war, dass der N-terminale Bereich (AS 1-290) und die 1. PDZ-Domäne, analog zu den Ergebnissen der Lokalisationsstudie in der Epidermis, nicht für die Lokalisation von Baz am Zytokortex in den NB notwendig waren.

Der folgende Effekt wurde bei der Überexpression des 3PDZ Baz-Proteins festgestellt: In allen untersuchten NB, in denen das 3PDZ Baz-Protein überexprimiert vorlag, befand sich das mutante Protein im Zytoplasma hauptsächlich in der basalen Hälfte des NB. Bei der Überexpression des  $\Delta C$  Baz-Proteins hingegen, wo die N-terminalen AS 1-290 von Baz nicht deletiert waren, befand sich das mutante Protein diffus im ganzen Zytoplasma verteilt, sowohl in der apikalen, als auch in der basalen Hälfte des NB.

Wie auch bereits bei den Resultaten der Lokalisationsstudie an der Epidermis zu sehen war, waren die 2. und 3. PDZ-Domäne für die polare Verteilung von Baz in den NB notwendig.

In Tab. 3.5 werden diese Ergebnisse komprimiert dargestellt.

## Domänen von Baz → Funktion/en in den Neuroblasten in einem für *baz* wildtypischen Hintergrund

**C-terminaler Bereich AS 738-1464** → war notwendig für die Lokalisierung von Baz am Zytokortex in Neuroblasten von *Drosophila*

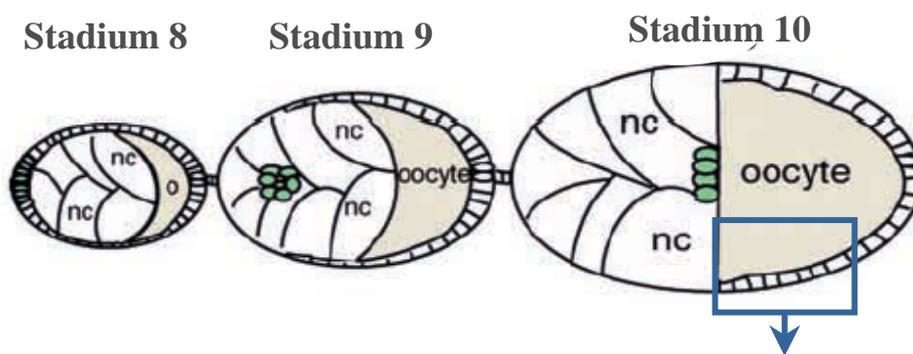
**AS 1-290 und 1. PDZ-Domäne** → waren für die Lokalisierung von Baz an den Zytokortex entbehrlich

**2. und 3. PDZ-Domänen** → waren für die polare zusammenhängende Lokalisierung von Baz erforderlich

Tab. 3.5 Die Aufgaben der verschiedenen Domänen von Baz, hinsichtlich der subzellulären Lokalisationsstudie der mutanten Baz-Proteine in den Neuroblasten  
Erläuterungen s. Text.

### 3.1.3 Analyse der subzellulären Lokalisation des full-length Baz-Proteins und mutanter Baz-Proteine in Follikelzellen

Ovarien (Stadium 9-10) aus Kreuzungen der *Cu2-GAL4*-Aktivatorlinie gegen *UAS-baz*-Effektorlinien wurden fixiert und anhand einer Dreifachfärbung (FLAG, Baz und DNA) am konfokalen Lasermikroskop untersucht. Abb. 3.6 zeigt zunächst die schematische Darstellung von Eikammern. Hierbei weist ein Auswahlviereck auf den Ausschnitt aus dem Follikelepithel hin, der jeweils in den Abb. 3.7 und Abb. 3.9 dargestellt ist.



**Abb. 3.6 Schematische Darstellung von Eikammern (Stadium 8-10)**

Eine kurze Einführung in die Oogenese ist im Kapitel 1.2.6 wiedergegeben. Das Auswahlviereck zeigt aus welchem Bereich die Ausschnitte aus dem Follikelepithel in Abb. 3.7 und Abb. 3.9 stammen. 'oocyte' / o: Oocyte, nc: Nahrungszellen (entnommen und verändert nach: Pinheiro & Montell, 2004).

Im Nachfolgenden werden, in einem für *baz* wildtypischen Hintergrund, die subzelluläre Lokalisation des full-length Baz-Proteins und der mutanten Versionen von Baz, in somatischen Follikelzellen wiedergegeben.

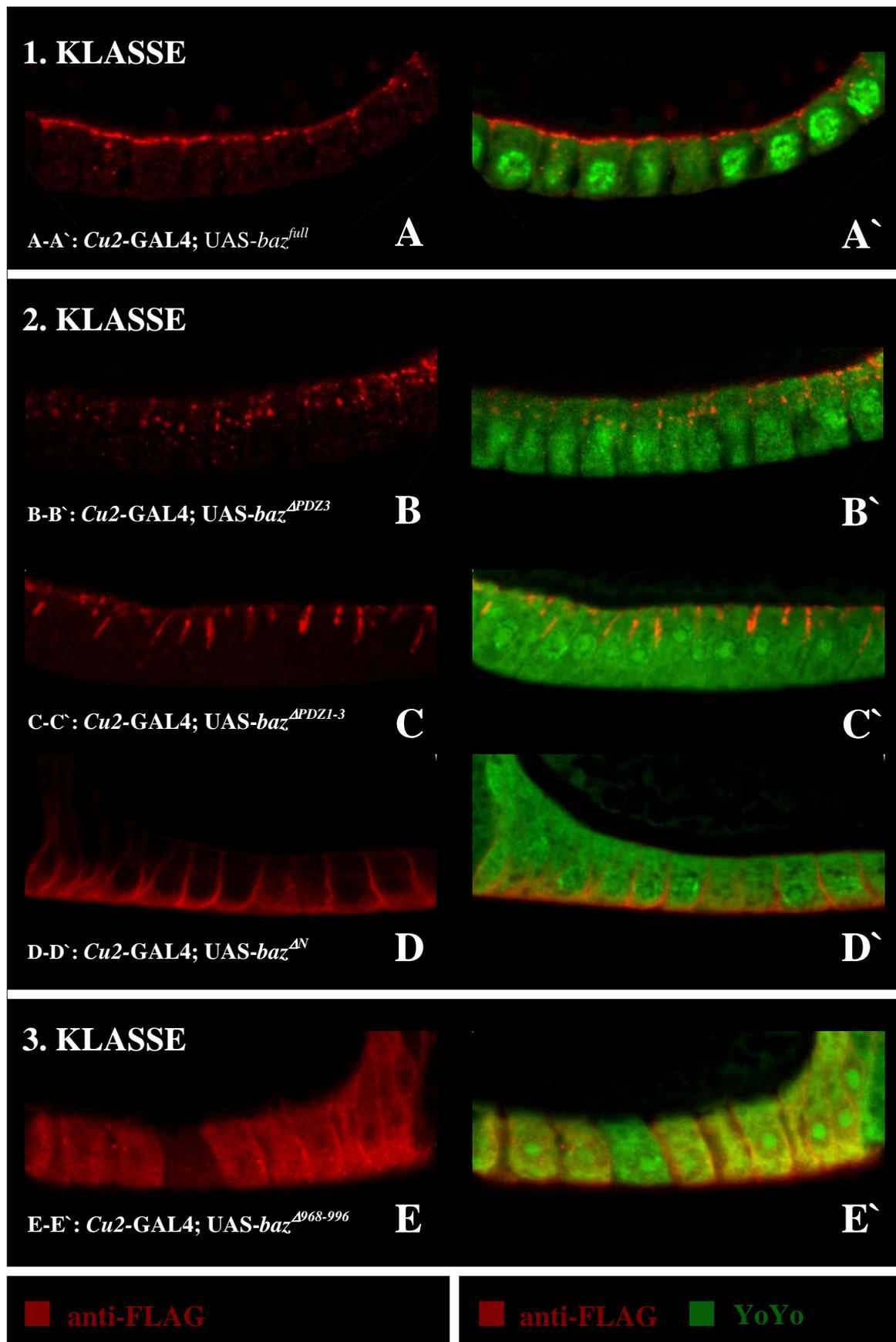


Abb. 3.7 Klasseneinteilung des full-length Baz-Proteins und mutanter Baz-Proteine in Bezug auf ihre subzelluläre Lokalisation in Follikelzellen. Text s. nächste Seite.

**Abb. 3.7 Klasseneinteilung des full-length Baz-Proteins und mutanter Baz-Proteine in Bezug auf ihre subzelluläre Lokalisation in Follikelzellen**

Ovarien mit Eikammern (Stadium: 9-10) aus folgenden Kreuzungen wurden mit dem FLAG-Antikörper gefärbt, um das full-length Baz-Protein und die mutanten Baz-Proteine in den Follikelzellen sichtbar zu machen: *Cu2-GAL4*-Aktivatorlinie x *UAS-baz*-Effektorlinie (A, A': *UAS-baz<sup>full</sup>*; B, B': *UAS-baz<sup>APDZ3</sup>*; C, C': *UAS-baz<sup>APDZ1-3</sup>*; D, D': *UAS-baz<sup>ΔN</sup>*; E, E': *UAS-baz<sup>Δ968-996</sup>*). Es werden Ausschnitte aus dem Follikelepithel gezeigt. Zur besseren Orientierung sind in Abb. 3.6 schematisch Eikammern mit der Oozyte und dem Follikelepithel dargestellt. Das full-length Baz-Protein und die mutanten Baz-Proteine wurden, hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation in den epithelialen Follikelzellen, in drei Klassen eingeteilt. Es werden Vertreter einer Klasse exemplarisch aufgeführt, um das Lokalisationsmuster jeder Klasse darzustellen. In der 1. Klasse sind die mutanten Baz-Proteine, die die wildtypische Verteilung vorwiegend an der apikalen Membran aufwiesen (A-A'). Innerhalb der 2. Klasse befinden sich die mutanten Baz-Proteine, die eine Lokalisation entlang der lateralen Membran zeigten. Bei einigen mutanten Baz-Proteinen wies die Membranlokalisierung ein punktuell Muster auf. Die Lokalisierung war, mit Ausnahme des  $\Delta N$  Baz-Proteins (D, D'), auf die apikale Hälfte der lateralen Plasmamembran beschränkt (B, B' und C-C'). In der 3. Klasse sind die mutanten Baz-Proteine, die eine diffuse zytoplasmatische Verteilung erkennen ließen (E, E'). A-E: FLAG; A'-E': FLAG und DNA. Die Zuordnung des full-length Baz-Proteins und der mutanten Baz-Proteine zu den verschiedenen Klassen ist der Tab. 3.6 (Seite 67) und dem Text zu entnehmen. Bei dem  $\Delta 1026-1464$  Baz-Protein konnte, aufgrund einer zu schwachen Färbung, bislang noch keine eindeutige Lokalisation festgestellt werden (apikal: oben, basal: unten).

*UAS-baz<sup>full</sup>* und die folgenden mutanten Transgen-kodierten Baz-Proteine *UAS-baz<sup>S980AS982</sup>*, *UAS-baz<sup>S980</sup>*, *UAS-baz<sup>S982</sup>*, *UAS-baz<sup>APDZ1</sup>* und *UAS-baz<sup>APDZ2</sup>* lokalisierten in den follikulären Epithelzellen vorwiegend apikal an der Plasmamembran, wie das Benton & St. Johnston, (2003a,b) für das endogene, wildtypische Baz-Protein in Follikelzellen zeigen konnten (**1. Klasse**; Abb. 3.7 s. o.). Gelegentlich zeigten die mutanten Baz-Proteine der 1. Klasse auch eine sehr leichte Färbung entlang der lateralen Membran.

Die folgenden mutanten Baz-Proteine wiesen eine apikal-laterale Membranlokalisierung auf: *UAS-baz<sup>APDZ1-2</sup>*, *UAS-baz<sup>APDZ3</sup>*, *UAS-baz<sup>APDZ2-3</sup>*, *UAS-baz<sup>APDZ1-3</sup>* und *UAS-baz<sup>ΔN</sup>* (**2. Klasse**; Abb. 3.7 s. o.). Die Membranlokalisierung des  $\Delta PDZ3$  Baz-Proteins zeigte ein punktuell Muster entlang der apikalen und lateralen Plasmamembran. Die laterale Membranlokalisierung der meisten mutanten Baz-Proteine blieb in der Regel auf die obere Hälfte der lateralen Plasmamembran beschränkt, wobei das  $\Delta PDZ1-2$  Baz-Protein nur im oberen Viertel der lateralen Membran lokalisiert war. Eine Ausnahme bildete das  $\Delta N$  Baz-Protein.

Hier war die Expression des mutanten Proteins an der gesamten lateralen Plasmamembran zu beobachten. Geringfügig war eine schwache Expression im Zytoplasma zu erkennen. Wie man auch schon bei den Epithelzellen der embryonalen Epidermis beobachten konnte, war die Intensität der Färbung des  $\Delta N$  Baz-Proteins, im Vergleich zu den übrigen mutanten Proteinen, stärker.

Eine diffuse Verteilung der mutanten Baz-Proteine im Zytoplasma zeigten *UAS-baz<sup>ΔC</sup>*, *UAS-baz<sup>3PDZ</sup>*, *UAS-baz<sup>Δ968-996</sup>* und *UAS-baz<sup>Δ737-1019</sup>* (**3. Klasse**; Abb. 3.7 s. o.).

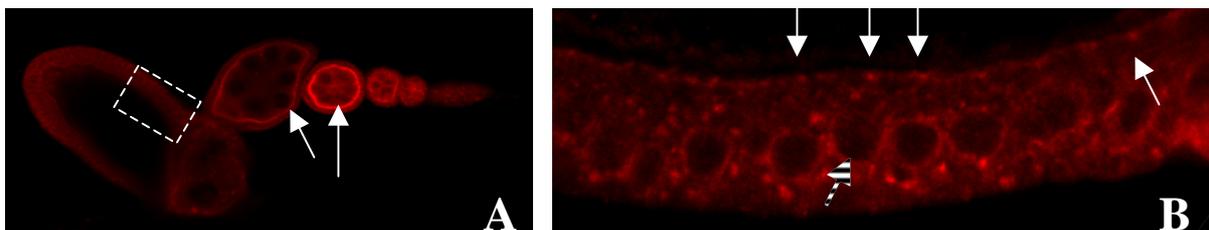
Die Lokalisation des  $\Delta 1026-1464$  Baz-Proteins konnte, aufgrund einer sehr schwachen Färbung nicht von der Hintergrundfärbung des FLAG-Antikörpers unterschieden werden.

Allgemein betrachtet, sah man bei diesen Überexpressionsexperimenten gelegentlich eine FLAG-Färbung in den Kernen der Follikelzellen. Diese Beobachtung wurde auch gemacht, wenn bei wildtypischen Eikammern der FLAG-Antikörper eingesetzt wurde (ohne Abbildung).

Neben dem Einsatz des FLAG-Antikörpers, der die mutanten Baz-Proteine und das full-length Baz-Protein erkennen kann, wurde mit einer YoYo-Färbung die DNA sichtbar gemacht. Mit dem Baz-Antikörper sollte sowohl das endogene, wildtypische Baz-Protein, als auch die meisten mutanten Baz-Proteine detektiert werden können. Die beiden Ausnahmen stellten das  $\Delta N$  Baz-Protein und das 3PDZ Baz-Protein dar. Ihnen fehlt der N-terminale Bereich (AS 1-290), an den der Baz-Antikörper binden kann.

Das wildtypische Expressionsmuster des endogenen Baz-Proteins in Eikammern, die sowohl aus dem Wildtyp, als auch aus der Kreuzung *Cu2-GAL4*-Aktivatorlinie gegen den Wildtyp stammten, wurde zur Kontrolle bei den Überexpressionsexperimenten ebenfalls untersucht. Bei beiden Eikammern zeigte sich derselbe Phänotyp, d. h. die Verwendung der *Cu2-GAL4*-Aktivatorlinie führte zu keinen mutanten Phänotypen.

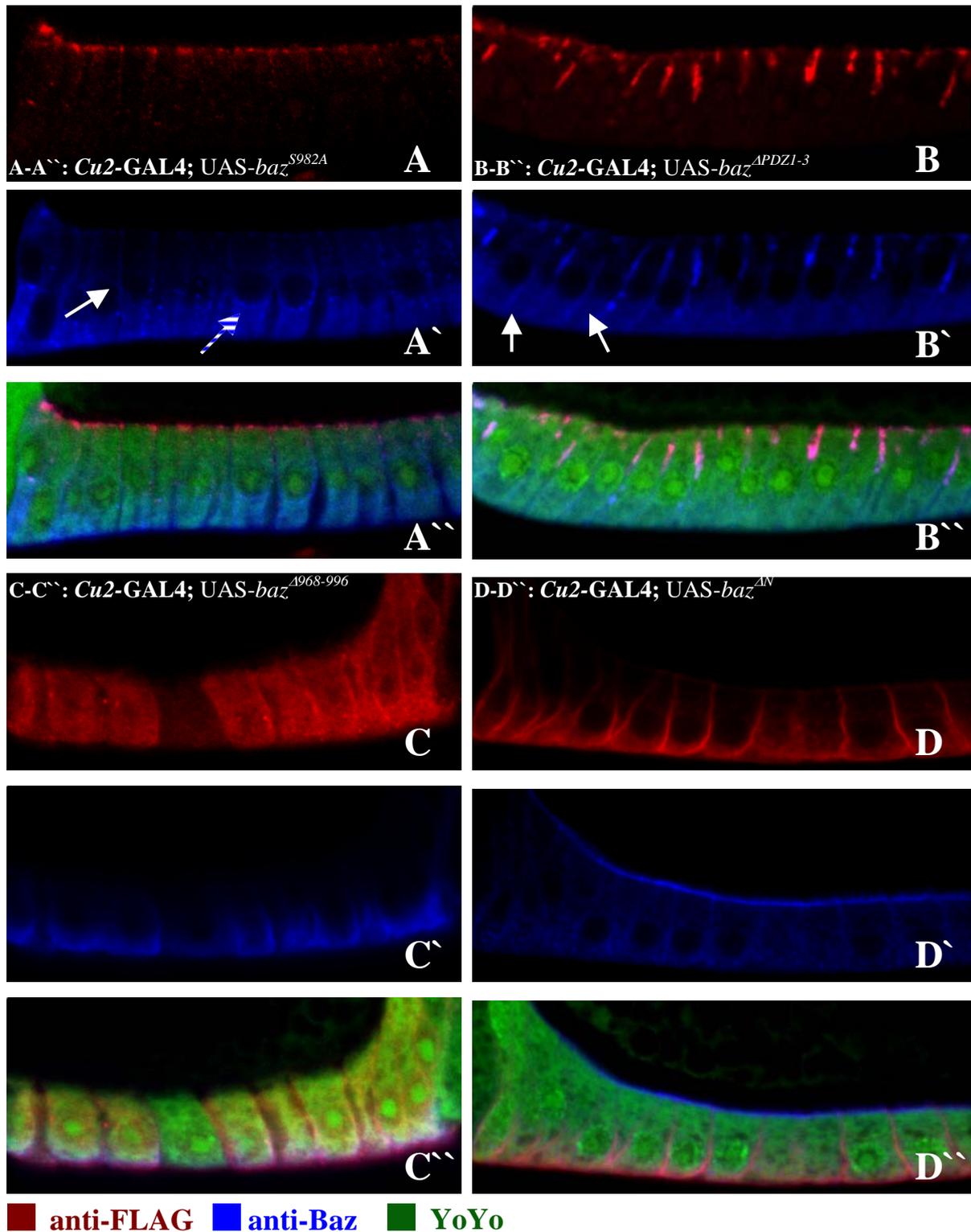
Die Baz-Färbung mit dem N-terminalen Baz-Antikörper in den Follikelzellen zeigte bis Stadium 8, dass Baz apikal an der Plasmamembran lokalisierte (Abb. 3.8) (Huynh et al., 2001; Cox et al., 2001c).



**Abb. 3.8 Baz-Lokalisation in wildtypischen Follikelzellen**

Die Abbildung zeigt (A) wildtypische Eikammern in verschiedenen Stadien (links: Stadium 10, rechts Stadium 8 und jünger). Das gestrichelte Auswahlviereck in (A) gibt den Ausschnitt aus dem Follikelepithel in (B) wieder. Die Pfeile zeigen auf die apikale Lokalisierung (weiße Pfeile) und auf die perinukleäre Färbung (gestrichelter Pfeil) des endogenen, wildtypischen Baz-Proteins.

Ab Stadium 9 nahm die Intensität der apikalen Expression von Baz stark ab und man sah ab Stadium 10 eine nicht mehr nur ausschließliche apikale Lokalisierung. Man beobachtete ein punktuell Muster, das sich über die gesamte Zelle erstreckte.



**Abb. 3.9** Das Färbemuster des full-length Baz-Proteins und der mutanten Baz-Proteine in Follikelzellen Ovarien mit Eikammern (Stadium: 9-10) aus folgenden Kreuzungen wurden mit dem FLAG -Antikörper gefärbt, um die mutanten Baz-Proteine sichtbar zu machen: *Cu2-GAL4*-Aktivatorlinie x *UAS-baz*-Effektorlinie (A-A'': *UAS-baz*<sup>S982A</sup>; B-B'': *UAS-baz*<sup>APDZ1-3</sup>; C-C'': *UAS-baz*<sup>A968-996</sup>; D-D'': *UAS-baz*<sup>ΔN</sup>). Der N-terminale Baz-Antikörper sollte sowohl das endogene als auch die mutanten Baz-Proteine detektieren können. Eine Ausnahme bilden die beiden Baz-Proteine  $\Delta N$  und 3PDZ, die, aufgrund der N-terminalen Deletion (AS: 1-290), nicht mehr über den Bereich verfügen, an den der N-terminale Baz-Antikörper binden kann. Es werden Ausschnitte aus dem Follikel-epithel gezeigt. Zur besseren Orientierung sind in Abb. 3.6 schematisch Eikammern mit der Oozyte und dem Follikel-epithel dargestellt. A-D: FLAG; A'-D': Baz; A''-D'': DNA, FLAG, Baz; weiße Pfeile zeigen auf eine leichte Membranfärbung; gestreifter Pfeil zeigt auf die perinukleäre Färbung (apikal: oben, basal: unten). Erläuterungen s. Text.

Teilweise war eine perinukleäre Färbung in den Follikelzellen zu erkennen (Abb. 3.8). Dieser beobachtete Phänotyp variierte, d. h., dass diese perinukleäre Färbung nicht immer zu beobachten war. Die Intensität der apikalen Expression des endogenen Baz-Proteins war geringer, je älter die Eikammer war.

Bei der jeweiligen Überexpression des full-length Baz-Proteins und der mutanten Versionen von Baz zeigte die parallele Färbung mit dem Baz-Antikörper folgende Lokalisierung: Bei nahezu allen UAS-*baz*-Effektorlinien zeigte sich in der basalen Hälfte der Epithelzelle eine „zytoplasmatische Färbung“ (Abb. 3.9). Die beiden Ausnahmen, das  $\Delta N$  Baz-Protein (Abb. 3.9 Bild D`) und das 3PDZ Baz-Protein (ohne Abbildung), ließen ein wildtypisches Muster erkennen, wie es in Abb. 3.8 zu sehen ist. Teilweise beobachtete man in diesen beiden Fällen auch eine relativ starke apikale Expression des endogenen Baz-Proteins (Abb. 3.9 Bild D`).

Zusätzlich zu dieser „zytoplasmatischen Färbung“ fand man bei den mutanten Proteinen der 1. und 2. Klasse oft an der gesamten lateralen Membran eine leichte Baz-Färbung (Abb. 3.9 Bilder A` und B`). Eine Kolokalisation der Proteine, die mit dem Baz- und mit dem FLAG-Antikörper detektiert wurden, war bei den mutanten Proteinen der 2. Klasse wesentlich deutlicher sowie auch viel öfter zu beobachten, als bei den mutanten Proteinen der 1. Klasse. Hier sah man nur sehr selten eine klare, apikale Kolokalisation.

Bei den mutanten Proteinen der 3. Klasse sah man eine Kolokalisation in der Regel nur in der basalen Hälfte der Follikelzellen (Abb. 3.9 Bild C`). Dafür könnte die folgende Hypothese aufgestellt werden: Es könnte sein, dass der N-terminale Baz-Antikörper die FLAG-markierten Baz-Varianten nur schlecht oder gar nicht erkennen konnte, da vermutlich der N-Terminus des Baz-Proteins frei zugänglich sein muss, um eine gute Detektierung durch den Antikörper zu gewährleisten. Gleichzeitig dimerisierten die FLAG-Varianten mit dem endogenen Baz, wodurch dieses auch nicht mehr gut erkannt werden konnte. Infolgedessen zeigte der Antikörper nur dort ein Signal, wo kein FLAG-markiertes Baz-Protein vorhanden war. Bei dem „Signal“ handelt es sich aber vermutlich um eine unspezifische Hintergrundfärbung, die in Abwesenheit eines echten Signals hochkam.

In der Tab. 3.6 werden die Ergebnisse in Bezug auf die Lokalisationen des full-length Baz-Proteins und der mutanten Baz-Proteine tabellarisch aufgelistet. Abb. 3.7 soll anhand der FLAG-Färbung die verschiedenen Klassen deutlich machen und bei der Abb. 3.9 ist der Schwerpunkt auf die Baz-Färbung gelegt.

Abschließend folgt eine **Zusammenfassung** der Ergebnisse, die aus der subzellulären Lokalisationsstudie der verschiedenen mutanten Versionen von Baz an den epithelialen

Follikelzellen in Gegenwart des endogenen, wildtypischen Baz-Proteins gewonnen wurden. Das full-length Baz-Protein und die mutanten Baz-Proteine können aufgrund ihres ektopischen Expressionmusters in drei Klassen eingeteilt werden.

UAS- <i>baz</i> -Effektorlinien	Klasse	apikal an der Membran	punktuell oder in längeren zusammenhängenden Abschnitten entlang der apikalen und lateralen Plasmamembran	diffuse Verteilung im Zytoplasma
full	1	X		
S980AS982A	1	X		
S980A	1	X		
S982A	1	X		
ΔPDZ1	1	X		
ΔPDZ2	2	X		
ΔPDZ3	2		X	
ΔPDZ1-2	2		X	
ΔPDZ1-3	2		X	
ΔPDZ2-3	2		X	
ΔN	2		X*	
ΔC	3			X
3PDZ	3			X
Δ968-996	3			X
Δ737-1019	3			X
Δ1026-1464	?	—	—	—

**Tab. 3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse der subzellulären Lokalisationsstudie des full-length Baz-Proteins und mutanter Baz-Proteine in Follikelzellen**

Das full-length Baz-Protein und die mutanten Baz-Proteine können bezüglich ihrer Lokalisation in den epithelialen Follikelzellen in drei Klassen eingeteilt werden. Die mutanten Proteine in der **1. Klasse** lokalisierten wie das endogene Baz-Protein vorwiegend apikal an der Plasmamembran. Die meisten mutanten Proteine der **2. Klasse** lokalisierten in der apikalen Hälfte der lateralen Plasmamembran, wobei das ΔN Baz-Protein als einziges mutantes Protein entlang der gesamten lateralen Membran zu finden war (X\*). Bei einigen mutanten Baz-Proteinen wies die Membranlokalisation ein punktuell Muster auf. Die mutanten Proteine der **3. Klasse** verteilten sich diffus im Zytoplasma. Bei dem Δ1026-1464 Baz-Protein konnte, wegen einer zu schwachen Antikörper-Färbung, keine eindeutige Aussage in Bezug auf die Lokalisierung gemacht werden. Erläuterungen s. Text.

Es zeigten sich hierbei Übereinstimmungen in der Klasseneinteilung im Hinblick auf die subzellulären Lokalisationsstudien an der embryonalen Epidermis und an den NB. Abweichungen zeigten das Lokalisationsmuster des ΔN Baz-Proteins, des Δ1-2 Baz-Proteins und des Δ2 Baz-Proteins.

Das ΔN Baz-Protein lokalisierte, im Gegensatz zu der wildtypischen Lokalisation in der embryonalen Epidermis und in den NB, entlang der gesamten lateralen Plasmamembran

follikulärer Epithelzellen. Das  $\Delta$ PDZ1-2 Baz-Protein zeigte ebenfalls keine wildtypische Lokalisation mehr, wie in den NB oder in der embryonalen Epidermis, sondern lokalisierte etwas lateraler an der Membran und das  $\Delta$ PDZ2 Baz-Protein zeigte hauptsächlich eine apikale Färbung und nur eine sehr schwache Färbung entlang der lateralen Membran.

Die mutanten Proteine der **1. Klasse** zeigten eine wildtypische Verteilung hauptsächlich an der apikalen Membran der Follikelzellen, die mutanten Proteine der **2. Klasse** wiesen eine unpolarierte Lokalisation entlang der Plasmamembran auf und die mutanten Proteine der **3. Klasse** waren vollständig diffus im Zytoplasma verteilt.

### **Domänen von Baz → Funktion/en in den epithelialen Follikelzellen in einem für *baz* wildtypischen Hintergrund**

**C-terminaler Bereich AS 738-1464** → notwendig für die Lokalisierung von Baz an der Follikelzellmembran in Eikammern von *Drosophila*

**DaPKC-Binde- und pot. Phosphorylierungsstelle** → war notwendig für die Lokalisierung von Baz an der Follikelzellmembran in Eikammern von *Drosophila*

**PDZ-Domänen** → erforderlich für die apikale Lokalisierung von Baz

**S980A / S982A** → die beiden AS S980 und S982 müssen für die Lokalisierung von Baz an der Membran nicht phosphoryliert werden

**N-terminale AS 1-290** → notwendig für die apikale Lokalisierung von Baz

**Tab. 3.7 Die Aufgaben der verschiedenen Domänen von Baz, hinsichtlich der subzellulären Lokalisationsstudie der mutanten Baz-Proteine in den epithelialen Follikelzellen**

Die Aufgaben der Domänen beziehen sich auf einen für *baz* wildtypischen Hintergrund. Erläuterungen s. Text.

Analog zu den Ergebnissen an der Epidermis, ergab sich auch hier, dass der C-terminale Bereich (AS: 738-1464), in einem für *baz* wildtypischen Hintergrund, für die Lokalisierung an der Plasmamembran der Follikelzellen zuständig war.

Die Baz-Konstrukte, die dazu beitragen sollten, den für die Membranlokalisierung notwendigen Bereich innerhalb dieser C-terminalen Domäne näher einzuschränken, zeigten folgendes Ergebnis: Der Austausch der potentiell phosphorylierbaren AS in nicht mehr phosphorylierbare AS hatte keine Auswirkung auf die Lokalisierung von Baz an die Follikelzellmembran. Es liegt somit auch hier die Vermutung nahe, dass Baz für seine Lokalisierung an die Membran nicht an den AS S980 und AS S982 phosphoryliert werden

muss. Das  $\Delta 968-996$  Baz-Protein, das eine Deletion der DaPKC-Bindestelle aufweist, und das  $\Delta 737-1019$  Baz-Protein, bei dem der Bereich ab den drei PDZ-Domänen bis einschließlich der DaPKC-Bindestelle fehlt, zeigten eine diffuse zytoplasmatische Lokalisation. Das  $\Delta 1026-1464$  Baz-Protein zeigte kein FLAG-Signal, wodurch insgesamt keine weitere Einschränkung, welcher Bereich dieser C-terminalen Domäne für die Membranlokalisierung notwendig ist, erfolgen konnte.

Die drei PDZ-Domänen waren in den Follikelzellen für die apikale Lokalisierung von Baz an der Membran notwendig. Allerdings zeigten die erste und die zweite PDZ-Domäne, wenn sie einzeln deletiert wurden, eine vorwiegend apikale Lokalisierung. In der Tab. 3.7 werden die hier gewonnenen Ergebnisse zusammenfassend dargestellt.

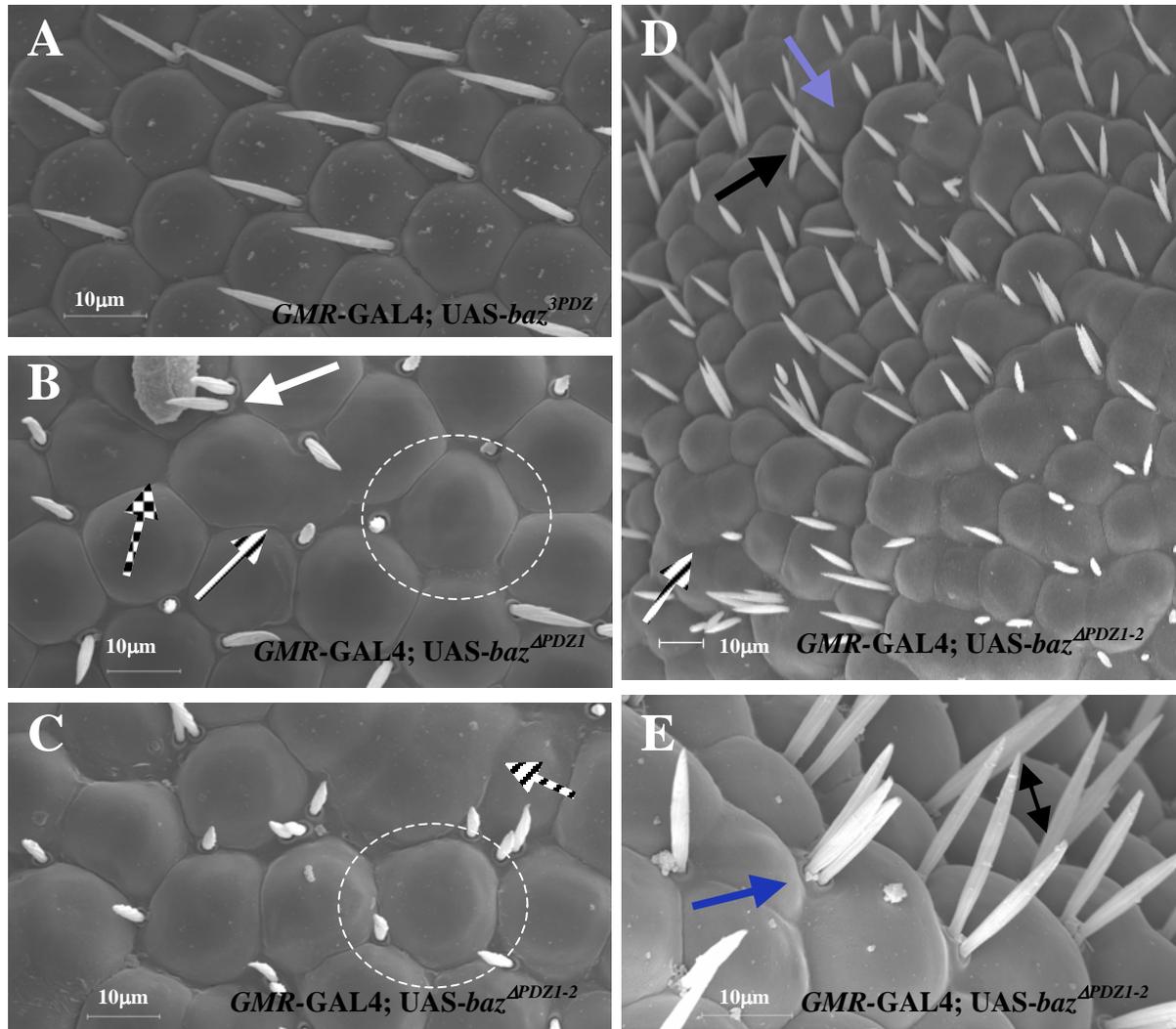
### **3.1.4 Ein dominanter Phänotyp durch Überexpression von Baz während der Augenentwicklung**

Wenn in einem für *baz* wildtypischen Hintergrund das full-length Baz und verschiedene mutante Versionen von Baz während der Augenentwicklung überexprimiert wurden, so erzeugten sie einen dominanten morphologischen Phänotyp im Auge. Hierbei erscheint aufgrund der weniger regelmäßigen Anordnung der Ommatidien das Auge rau.

Jungfrauen der *GMR-GAL4*-Aktivatorlinie, die in allen Zellen in und posterior der morphogenetischen Furche in der Augenimaginalscheibe die Expression von Proteinen ermöglichte, wurden mit Männchen, die die jeweiligen UAS-Baz-Transgene (Tab. 3.1) in sich trugen, gekreuzt. Die Weibchen der F1-Generation wurden zuerst unter dem Stereomikroskop auf ihren dominanten morphologischen Phänotyp im Auge hin vorsortiert und am Rasterelektronenmikroskop (REM) detaillierter analysiert. Da bekannt war, dass der *GMR-GAL4*-Treiberstamm allein temperaturabhängig mutante Phänotypen ausprägen kann, wurden, gemäß den Vorversuchen von Nicola Grzeschik (2003), die Kreuzungen bei 25 °C durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass *GMR-GAL4* auf erhöhte Temperatur mit einer Veränderung des Phänotyps reagierte. *GMR-GAL4* heterozygote Tiere zeigten bei 25 °C noch einen wildtypischen Augenphänotyp. Erst bei einer Temperatur von 29 °C trat ein mutanter Phänotyp auf.

Sämtliche Veränderungen, die durch die Überexpression der einzelnen mutanten Baz-Proteine entstanden, werden in der Abb. 3.10 dargestellt. Es handelte sich hierbei um Beeinträchtigungen der Ommatidien-Morphologie und verschiedene Defekte, die die Borsten betrafen. Im Anhang 5 wird der schematische Aufbau eines wildtypischen Ommatidiums

dargestellt. Die genaue Zuordnung der Defekte, die die einzelnen UAS-*baz*-Effektorlinien verursachten, enthält die Tab. 3.8. Das Ausmaß des dominanten morphologischen Phänotyps im adulten Auge variierte, je nachdem, welche UAS-*baz*-Effektorlinie überexprimiert wurde.



**Abb. 3.10** Borstendefekte und beeinträchtigte Morphologie durch Überexpression von mutanten Baz-Proteinen während der Augenentwicklung von *Drosophila*

Das full-length Baz-Protein und verschiedene mutante Baz-Proteine induzierten, wenn sie ektopisch in den Augen exprimiert wurden, einen dominanten morphologischen Phänotyp. Rasterelektronische Aufnahmen von Augen der Nachkommen folgender Kreuzungen werden exemplarisch aufgeführt, um alle möglichen Abweichungen vom Wildtyp darzustellen: *GMR-GAL4*-Aktivatorlinie x UAS-*baz*-Effektorlinie (A: UAS-*baz*<sup>3PDZ</sup> zeigte einen wildtypischen Phänotyp, bei dem auch gelegentlich einige Borsten fehlten, B: UAS-*baz*<sup>APDZ1</sup>, C-E: UAS-*baz*<sup>APDZ1-2</sup>). **Borstendefekte:** 1. die Orientierung der Borsten änderte sich [schwarzer Pfeil]; 2. es fehlten Borsten [weißer Pfeil mit Schachbrettmuster]; 3. die Zahl der Borsten erhöhte sich durch Verdopplung [weißer Pfeil] oder Verdreifachung [blauer Pfeil] der Borsten; 4. die Borstenlänge variierte [schwarzer dopp. Pfeilkopf]. Die **Ommatidien-Morphologie** war beeinträchtigt: 1. zwei oder mehr Ommatidien verschmolzen miteinander [weißer Pfeil + schwarze Streifen]; 2. Ommatidien traten aus der Oberfläche hervor [lilafarbener Pfeil]; 3. das wildtypische hexagonale Muster der Linsen änderte sich [gestrichelte Kreise]. In der Tab. 3.8 werden die 10 UAS-*baz*-Effektorlinien aufgelistet, mitsamt den dominanten Defekten, die sie bei ihrer Überexpression im Auge verursachten.

UAS- <i>baz</i> -Effektorlinien	N	dominanter morphologischer Phänotyp im Auge (Gesamteindruck)	Verdopplung / Verdreifachung der Borsten	gestörte Ausrichtung der Borsten	unterschiedliche Länge der Borsten	Beeinträchtigung der Ommatidien-Morphologie (uneben, O. traten aus der Oberfläche hervor u/o verschmolzen z.T. zus.)	Bereiche in denen Borsten fehlten
full	8	+ / 1-3	X / 1-3	X / 2-4	X / 1	X / 1-3	—
ΔPDZ1	8	+ / 3-4	X / 2	X / 2-4	X / 2	X / 3-4	—
ΔPDZ2	9	+ / 0-4	X / 0-3	X / 0-3	X / 2	X / 0-4	kleine Bereiche
ΔPDZ3	6	+ / 1	X / 3	X / 0-1	—	—	—
ΔPDZ1-2	8	+ / 3-5	X / 2-4	X / 3-4	X / 2	X / 4-5	—
ΔPDZ1-3	8	+ / 1	X / 2-3	X / 0-1	X / 1	—	—
ΔPDZ2-3	8	+ / 0-3	X / 0-4	X / 0-3	X / 2	X / 0-3	größere Bereiche
ΔN	9	+ / 0-5	—	X / 0-4	X / 2	X / 0-5	kleine Bereiche
ΔC	8	—	—	—	—	—	—
3PDZ	9	—	—	—	—	—	—

**Tab. 3.8 Überexpression einzelner mutanter Baz-Proteine verursachten einen dominanten morphologischen Phänotyp im Auge**

Tabellarische Zusammenstellung der dominanten Phänotypen, die durch die Überexpression von full-length Baz und verschiedener Baz-Deletionsmutanten unter der Kontrolle des *GMR-GAL4*-Treibers erzeugt wurden. Die 10 Kreuzungen sahen wie folgt aus: *GMR-GAL4*-Aktivatorlinie x UAS-*baz*-Effektorlinie. Der Grad der Auswirkung wird jeweils hinter dem Querstrich in der dritten Spalte von rechts vermerkt; die Bezugsskala geht von 0 bis 5 (ansteigende Beeinträchtigung). Erläuterungen befinden sich im Text (n = Anzahl der untersuchten Effektorlinien).

Im Nachfolgenden werden alle zehn Phänotypen der einzelnen UAS-*baz*-Effektorlinien beschrieben. Begonnen wird mit den Linien, die den stärksten mutanten Phänotyp verursachten.

Einige UAS-*baz*-Effektorlinien wiesen einen variablen Phänotypen auf, wenn unterschiedliche Linien ein und desselben mutanten Proteins überexprimiert wurden. UAS-*baz*<sup>AN</sup> ist eine dieser transgenen Linien, bei der dieser Effekt zu beobachten war. Es existierte eine ganze Bandbreite von unterschiedlich stark ausgeprägten Phänotypen. Zu beobachten war eine gestörte Ausrichtung der Borsten, unterschiedlich lange Borsten, das Fehlen von Borsten in kleinen Bereichen und Defekte in der Morphologie der Ommatidien.

Bei der Linie UAS-*baz*<sup>AN</sup>, die bei ihrer Überexpression den am stärksten ausgeprägten dominanten morphologischen Phänotyp zeigte, traten die einzelnen Ommatidien aus der Ebene heraus. Teilweise waren zwei oder mehr Ommatidien miteinander verschmolzen.

Diese Auswirkung auf die morphologische Gestalt ermöglichte kein wildtypisches hexagonales Muster der Linsen mehr. Die zweite UAS-*baz*-Effektorlinie, UAS-*baz*<sup>APDZ1-2</sup>, zeigte nahezu den selben starken Phänotyp, wie er für UAS-*baz*<sup>AN</sup> beschrieben wurde. Die Unterschiede lagen lediglich darin, dass der dominante morphologische Phänotyp im Auge nicht zwischen den verschiedenen Linien ein und desselben Baz-Konstrukts variierte, dass kaum Borsten fehlten und dass hier Borsten-Verdoppelungen und -Verdreifachungen vorkamen, d. h., dass die Zahl der Borsten dadurch erhöht vorlag. Ein etwas schwächerer dominanter Phänotyp zeigte sich, wenn UAS-*baz*<sup>APDZ1</sup> und UAS-*baz*<sup>APDZ2</sup> überexprimiert wurden. Bei UAS-*baz*<sup>APDZ1</sup> gab es, im Gegensatz zu UAS-*baz*<sup>APDZ2</sup>, keine großen Unterschiede in der Ausprägung des Phänotyps, wenn verschiedene Linien dieses Baz-Konstrukts eingekreuzt wurden. Die Überexpression beider Konstrukte führte zu einer Beeinträchtigung der Ommatidien-Morphologie und zu Borstendefekten. Wie auch schon bei UAS-*baz*<sup>APDZ1-2</sup> erläutert wurde, existierten hier Borsten-Verdoppelungen und -Verdreifachungen, unterschiedlich lange Borsten und eine teilweise gestörte Ausrichtung der Borsten. Das Fehlen von Borsten auf kleinen Bereichen fand man nur bei UAS-*baz*<sup>APDZ2</sup>. Einen etwas weniger stark ausgeprägten Phänotyp, im Vergleich zu den bereits aufgeführten Linien, zeigten UAS-*baz*<sup>full</sup> und UAS-*baz*<sup>APDZ2-3</sup>. Der dominante Phänotyp von UAS-*baz*<sup>full</sup> war im Prinzip derselbe wie bei UAS-*baz*<sup>APDZ1</sup>, nur etwas abgeschwächer. Der Phänotyp von UAS-*baz*<sup>APDZ2-3</sup> glich, abgesehen davon, dass er in den meisten Defekten etwas schwächer ausgeprägt vorlag, dem von UAS-*baz*<sup>APDZ2</sup>. Einen kleinen Unterschied fand man in der teilweise erhöhten Anzahl von Borsten-Verdoppelungen und -Verdreifachungen. UAS-*baz*<sup>APDZ3</sup> und UAS-*baz*<sup>APDZ1-3</sup> wiesen von allen untersuchten Linien den schwächsten

dominanten Phänotyp auf. Hier traten keine Morphologie-Defekte auf, die Länge der Borsten variierte nicht und die Ausrichtung der Borsten zeigte sich nur geringfügig gestört. Lediglich in der Borsten-Verdoppelung und -Verdreifachung konnte der milde dominante morphologische Phänotyp im adulten Auge ausgemacht werden.

Die beiden letzten UAS-*baz*-Effektorlinien, UAS-*baz*<sup>ΔC</sup> und UAS-*baz*<sup>3PDZ</sup> erzeugten keinen dominanten morphologischen Phänotyp im Auge von *Drosophila*. Die Augen der untersuchten Nachkommen waren nicht vom Wildtyp zu unterscheiden.

### **Zusammenfassung der Ergebnisse des durch Überexpression verschiedener Versionen von Baz verursachten dominanten Phänotyps**

Die Überexpression des full-length Baz-Proteins und verschiedener mutanter Versionen von Baz im Auge führte zu unterschiedlich stark ausgeprägten dominanten Phänotypen im adulten Auge. Die Defekte, die dadurch entstanden, betrafen verschiedene Aspekte der Morphologie der Ommatidien und unterschiedliche Borstenmerkmale. Eine zu den Lokalisationsstudien in Epithelien und in Neuroblasten analoge Klasseneinteilung der Baz-Konstrukte konnte in diesem experimentellen Ansatz zur Funktionsanalyse von Baz nicht vorgenommen werden. Lediglich die dritte Klasse, in der die zwei transgenen Baz-Konstrukte, UAS-*baz*<sup>ΔC</sup> und UAS-*baz*<sup>3PDZ</sup>, enthalten sind, blieb bestehen, da auch hier die funktionelle Relevanz der C-terminalen Domäne von Baz zum Ausdruck kam. Das bedeutet, dass die C-terminalen AS 738-1464 für die Ausprägung des dominanten Phänotyps essentiell sind.

Die übrigen Baz-Konstrukte, die die C-terminale Domäne von Baz (AS 738-1464) enthalten, erzeugten bei ihrer *GMR*-*GAL4* abhängigen Überexpression einen dominanten morphologischen Phänotyp, der je nach UAS-*baz*-Effektorlinie in seiner Ausprägung variierte. Besonders gravierende Defekte in der Ommatidien-Morphologie verursachten Baz-Konstrukte, die über eine Deletion des N-terminalen Bereichs von Baz (AS 1-290) verfügten und denen die erste und/oder die zweite PDZ-Domäne fehlten. War zusätzlich, oder ausschließlich die dritte PDZ-Domäne deletiert, wurde die Beeinträchtigung der Morphologie der Ommatidien abgeschwächt oder sie trat gar nicht auf. Somit konnte, ähnlich wie der C-terminalen Domäne (AS 738-1464), auch der 3. PDZ-Domäne eine funktionelle Bedeutung zugeschrieben werden. Die Baz-Konstrukte, bei denen eine stark veränderte Morphologie der Ommatidien beobachtet werden konnte, zeigten auch stärkere Defekte in der Länge und Ausrichtung der Borsten. Einen weiteren Effekt beobachtete man bei der Betrachtung der Verdoppelung oder Verdreifachung der Borsten. Hier waren es vor allem die Baz-Konstrukte,

denen eine oder mehrere PDZ-Domänen fehlten (Ausnahme: full-length Baz-Protein), die bei ihrer Überexpression im Auge zur Erhöhung der Borstenanzahl führten.

Somit kann abschließend zusammengefasst werden, dass, wenn die C-terminalen AS 738-1464 oder die 3. PDZ-Domäne deletiert wurden, bei der Überexpression kein oder nur ein sehr gering ausgeprägter dominanter Phänotyp auftrat. Im Unterschied zur Deletion der 3. PDZ-Domäne zeigte die Mutation des C-terminalen Bereichs (AS 738-1464) keinen Effekt auf die Erhöhung der Borstenzahl in Form von Duplikationen und Verdreifachungen der Borsten.

Um eine klare Aussage machen zu können, ob die AS 738-1464 allein den Bereich von Baz darstellen, der bei der Überexpression den dominanten morphologischen Phänotyp induzieren kann, müsste man ein Baz-Konstrukt herstellen, das nur diese C-terminal gelegenen AS 738-1464 enthält.

### **Domäne/n von Baz → Ergebnisse des Überexpressionsassays im Auge**

**C-terminaler Bereich (AS 738-1464) → erzeugte bei Deletion keinen dominanten morphologischen Phänotyp im Auge**

**AS 1-290 + 1. u/o 2. PDZ-Domäne → enthalten ev. regulatorische Einheiten, da der dominante morphologische Phänotyp im Auge, der von dem full-length Baz-Protein verursacht wurde, im Falle ihrer Deletion verstärkt vorlag**

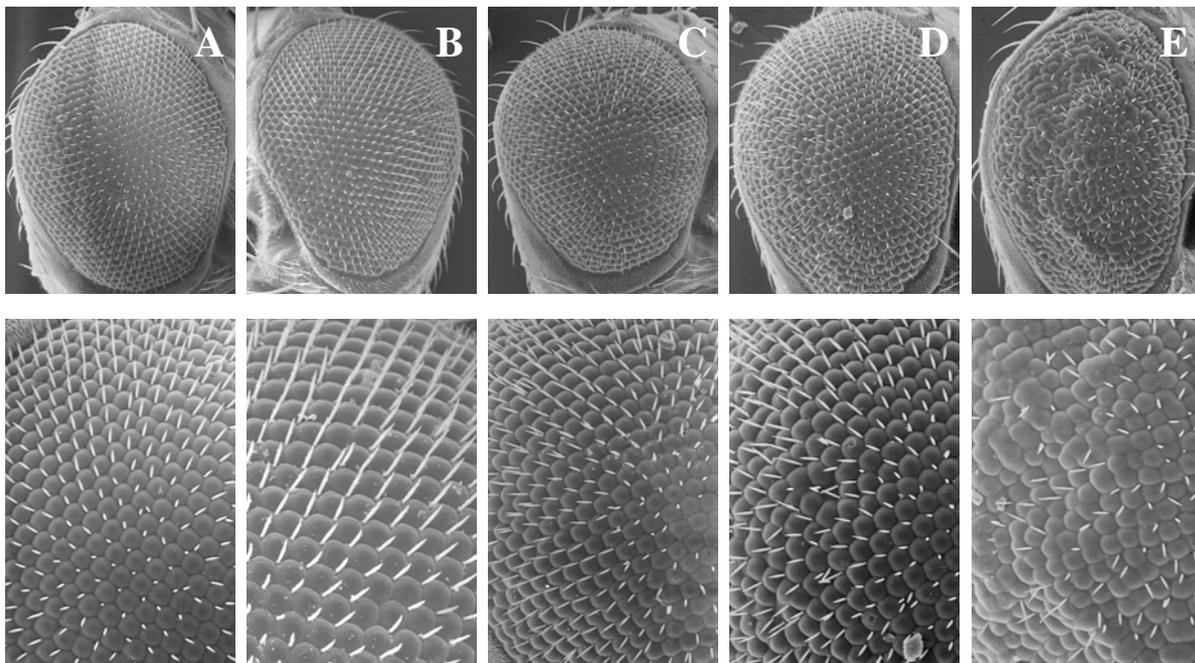
**3. PDZ-Domäne → konnte bei Deletion den vermutlich vom C-terminalen Bereich (AS 738-1464) verursachten dominanten morphologischen Phänotyp in Bezug auf die Morphologiedefekte in den Ommatidien stark abschwächen oder vollständig beheben**

**Tab. 3.9 Zusammenfassung der rasterelektronischen Untersuchungen des Überexpressionsassays**  
Erläuterungen s. Text.

Die Deletion des N-terminalen Bereichs (AS 1-290) und die Deletion der ersten und/oder zweiten PDZ-Domäne verursachten, im Vergleich zum full-length Baz-Protein, einen stärker ausgeprägten dominanten morphologischen Phänotyp. Möglicherweise beinhalten diese Bereiche von Baz regulatorische Elemente, die in diesem Assay den dominanten morphologischen Phänotyp abschwächen konnten.

Aus diesen Ergebnissen konnten allerdings keine Rückschlüsse darauf gezogen werden, ob Baz, bzw. die verschiedenen Domänen von Baz überhaupt eine Funktion in der Augenentwicklung im Wildtyp haben. Dieser experimentelle Ansatz wurde in erster Linie deshalb gewählt, da er den Vergleich einer willkürlich festgelegten Funktionalität der verschiedenen Baz-Konstrukte in einem leicht zugänglichen Testsystem erlaubte. In der Tab. 3.9 werden diese Ergebnisse tabellarisch zusammengefasst aufgeführt.

In Abb. 3.11 sind rasterelektronische Aufnahmen eines wildtypischen Komplexauges von *Drosophila* und dominanter morphologischer Phänotypen im Auge, die durch die Überexpression des full-length Baz-Proteins und von mutanten Baz-Proteinen unter der Kontrolle der *GMR*-GAL4-Treiberlinie erzeugt wurden.



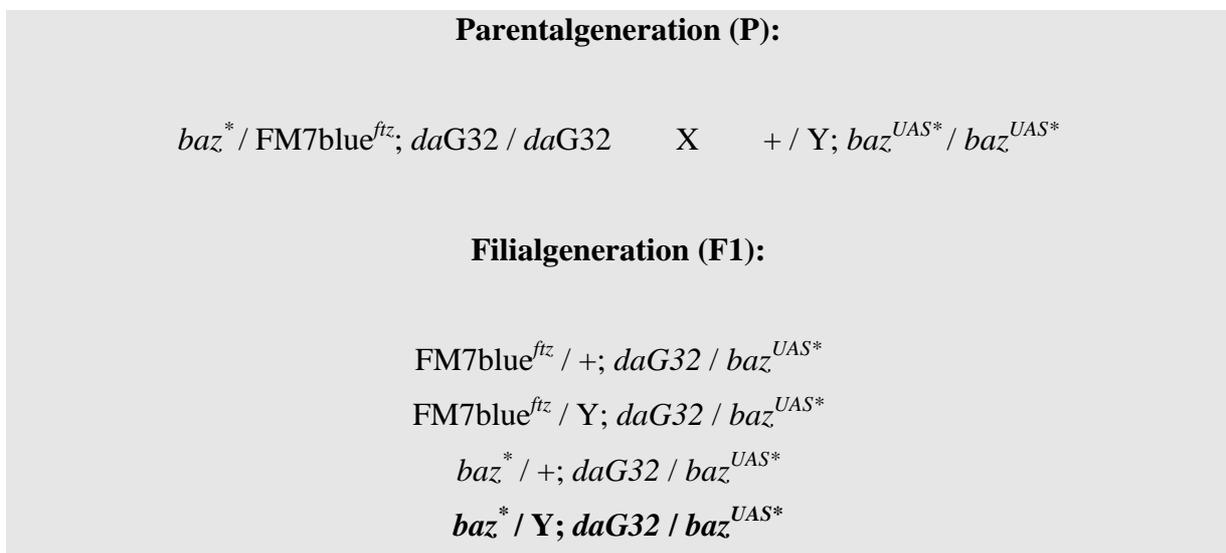
**Abb. 3.11 Überexpression von Baz während der Augenentwicklung verursachte einen dominanten Phänotyp**

Rasterelektronische Aufnahmen eines wildtypischen Komplexauges von *Drosophila* (A) und dominanter morphologischer Phänotypen, die unter der Kontrolle der *GMR*-GAL4-Treiberlinie erzeugt wurden (B-E). Folgende Kreuzungen wurden angesetzt: *GMR*-GAL4-Aktivatorlinie x *UAS-baz*-Effektorlinie (B: *UAS-baz<sup>ΔC</sup>*, C: *UAS-baz<sup>ΔPDZ1-3</sup>*, D: *UAS-baz<sup>full</sup>*, E: *UAS-baz<sup>ΔN</sup>*). Von diesen Kreuzungen, die bei 25 °C erfolgten, wurden die adulten Augen der weiblichen F1-Nachkommen verwendet. In der unteren Reihe befindet sich jeweils ein vergrößerter Ausschnitt aus der oberen Reihe. A: Wildtyp-Kontrolle: Augen von *GMR*-GAL4-Weibchen. Wildtypische Augen besitzen ein stereotypes, hexagonales Muster aus Linsen und Borsten. An jeder Linse eines Ommatidiums befinden sich drei Borsten in jeweils gleichmäßigem Abstand zueinander. Leichte Abweichungen von diesem regelmäßigen Muster kamen vor. Teilweise fehlte eine Borste, teilweise hatte eine Borste eine veränderte Orientierung und teilweise sah man die Verdoppelung einer Borste. Erläuterungen siehe Text, Tab. 3.8. und Anhang 5.

### 3.2 Untersuchungen im für *baz* mutantern Hintergrund

Um mit Hilfe des UAS-GAL4-Systems die verschiedenen Versionen von Baz in einem für *baz* mutanten Hintergrund zu analysieren, bzw. um den mutanten *baz*-Phänotyp retten zu können, wurden verschiedene Grundstämme hergestellt. Sie enthielten neben dem mutanten *baz*-Allel eine GAL4-Aktivatorlinie und ein FM7-Balancer-Chromosom mit dem *lacZ*-Gen, das unter der Kontrolle des *fushi-tarazu* (*ftz*) - Promotors exprimiert wurde (FM7blue<sup>ftz</sup>: 'Blue-Balancer'). Da mehrere mutante *baz*-Allele getestet werden sollten und verschiedene GAL4-Aktivatorlinien existierten, wurden unterschiedliche Kombinationen an Grundstämmen erzeugt (Anhang 3).

Es zeigte sich jedoch, dass nicht alle vorgesehenen Kombinationen herzustellen waren. Ein Beispiel hierfür waren die beiden *actin*-GAL4-Linien, bei deren Einkreuzung anschließend keine Männchen auftraten, oder *baz*<sup>EH171</sup>, in den das FM7blue<sup>ftz</sup>-Chromosom nicht eingekreuzt werden konnte. Die verschiedenen UAS-*baz*-Effektorlinien wurden dann gegen diese unterschiedlichen Grundstämme gekreuzt. Wie in der Abb. 3.12 ersichtlich ist, entstanden aus diesen Kreuzungen Tiere mit dem Genotyp *baz*<sup>\*</sup> / Y; *daG32* / *baz*<sup>UAS\*</sup>.



**Abb. 3.12 Kreuzungsschema der in dieser Arbeit erfolgten Rettungsexperimente**

In der Parentalgeneration war das Weibchen homozygot für den *daG32*-Treiber vor und das Männchen homozygot für das jeweilige *baz*-Effektorkonstrukt. Es entstanden in der F1-Generation vier verschiedene Genotypen (*baz*<sup>\*</sup>: mutantes *baz*-Allel; *baz*<sup>UAS\*</sup>: mutantes *baz*-Konstrukt; FM7blue<sup>ftz</sup>: Balancer-Chromosom mit *baz*<sup>+</sup>; Y: Y-Chromosom; +: Wildtyp-Chromosom; Darstellung des weiblichen Genotypen in der Parentalgeneration: 1. und 3. Chromosom und des männlichen Genotypen: 1. und je nach Effektorkonstrukt 2. oder 3. Chromosom).

Das bedeutete, sie waren hemizygot mutant für das jeweilige *baz*<sup>-</sup>-Allel und es wurde ebenfalls in diesen Tieren das entsprechende mutante Baz-Protein unter der Kontrolle des

ausgewählten Treibers exprimiert. Kuchinke et al. hatten gezeigt, dass UAS-*baz*<sup>full</sup> in der Lage war, den hemizygot letalen *baz*<sup>XR11</sup>-Phänotyp bis hin zum adulten Tier zu retten. Deswegen war das Kriterium, mit welchen Grundstämmen weiter gearbeitet werden sollte, die Tatsache, dass nicht alle Kombinationen an Grundstämmen, wenn sie mit UAS-*baz*<sup>full</sup> gekreuzt wurden, auch zu geretteten adulten Fliegen führten. Lediglich zwei der zwölf Grundstämme (*baz*<sup>XR11</sup> / FM7blue<sup>ftz</sup>; *daG32* / *daG32* und *baz*<sup>815-8</sup> / FM7blue<sup>ftz</sup>; *daG32* / *daG32*) zeigten die Rettung des hemizygot letalen *baz*-Phänotyps, wenn sie mit UAS-*baz*<sup>full</sup> gekreuzt wurden.

Die Herstellung der Grundstämme wird im Folgenden beschrieben: In die bereits existierenden mutanten *baz*-Allele wurde zunächst ein FM7blue<sup>ftz</sup>-Chromosom eingekreuzt. Vor dem Einkreuzen der GAL4-Aktivatorlinie in die einzelnen *baz*-Allele mussten zuerst entsprechende Balancer (z. B. TM3 und TM6) eingebracht werden, wodurch die Vitalität der Fliegenstämme häufig beeinträchtigt wurde. In wieweit dadurch die Lebensfähigkeit der Grundstämme vermindert wurde, wird in Kapitel 3.2.5, Tab. 3.13 wiedergegeben. Die Reduzierung der Lebensfähigkeit oder auch der Stabilität eines Stammes durch das Einkreuzen von Balancern und Treibern in die mutanten *baz*-Allele wurde vermutlich nicht von dem mutanten *baz*-Allel verursacht.

Bei den Rettungskreuzungen *baz*<sup>\*</sup> / FM7blue<sup>ftz</sup>; *daG32* / *daG32* gegen + / Y; *baz*<sup>UAS\*</sup> / *baz*<sup>UAS\*</sup> sollte als Referenz, für die durch das Einkreuzen hervorgerufene veränderte Überlebensrate, der Grundstamm *baz*<sup>\*</sup> / FM7blue<sup>ftz</sup>; *daG32* / *daG32* genommen werden. Dieser Grundstamm konnte jedoch, aufgrund der sterilen Männchen, nicht homozygot für die GAL4-Aktivatorlinie gehalten werden. Deswegen wurde alternativ der Grundstamm *baz*<sup>XR11</sup> *d3* bzw. *baz*<sup>815-8</sup> *d6* als Bezugstamm verwendet.

Da sich die Vermutung bestätigt hatte, dass nicht alle 16 UAS-*baz*-Effektorlinien den hemizygot letalen *baz*<sup>XR11</sup> - bzw. *baz*<sup>815-8</sup>-Phänotyp bis hin zum adulten Tier retten konnten, wurden immunhistochemische Untersuchungen an den Embryonen vorgenommen, die aus diesen Kreuzungen hervorgegangen waren. Um hierbei den gewünschten Genotyp selektieren und anschließend analysieren zu können, wurde eine Kombination von verschiedenen Antikörpern gewählt. Durch das FM7blue<sup>ftz</sup>-Chromosom wurde das *lacZ*-Gen unter der Kontrolle des *fushi-tarazu* (*ftz*) - Promotors exprimiert, wodurch die *ftz*-Streifen mit Hilfe des  $\alpha$ - $\beta$ -Galactosidase Antikörpers sichtbar gemacht werden konnten. Hierdurch zeigte sich, welcher Embryo das FM7blue<sup>ftz</sup>-Chromosom enthielt und welcher nicht. Eine weitere Unterscheidung, um die hemizygot mutanten Tiere mit der entsprechenden Expression des jeweiligen mutanten Baz-Proteins selektieren zu können, wurde durch die Verwendung des

Sex-lethal-Antikörpers ermöglicht, da hierbei nur die weiblichen Embryonen angefärbt wurden.

### 3.2.1 Verteilung des Baz-Proteins in hemizygoten *baz* mutanten Embryonen

Vor der experimentellen Analyse, welcher Bereich des Baz-Proteins in der Lage war, den mutanten embryonal zygotischen Phänotyp von Baz zu retten, wurde zunächst die Verteilung des Baz-Proteins in Embryonen von mutanten *baz*-Allelen mit Hilfe immunhistochemischer Methoden untersucht.

In zygotischen *baz*<sup>*Xi106*</sup>-Mutanten war weder maternales noch zygotisches Baz-Protein in den meisten Teilen des embryonalen Ektoderms während der späten Gastrulation (Stadium 9 / Campos-Ortega & Hartenstein, 1997) detektierbar (Tanentzapf & Tepass, 2003). Zuvor wurde bereits gezeigt, dass das *baz*<sup>*Xi106*</sup>-Allel sich wie ein amorphes, also ein funktionsloses Allel verhielt (Müller & Wieschaus, 1996).

Hier sollte der Frage nachgegangen werden, ob in weiteren zygotischen *baz*-Mutanten, *baz*<sup>*XR11*</sup>, *baz*<sup>*815-8*</sup>, *baz*<sup>*EH171*</sup>, *baz*<sup>*EH747*</sup> und *baz*<sup>*XK75*</sup>, ebenfalls ab Stadium 9, weder maternales noch zygotisches Baz-Protein zu erkennen war. In der Doktorarbeit von Ute Kuchinke (1998) wurde bereits die Verteilung des Baz-Proteins in den *baz*-Allelen *baz*<sup>*XR11*</sup> und *baz*<sup>*Xi106*</sup> untersucht.

Die für diesen Ansatz relevanten hemizygoten Embryonen hatten den Genotyp *baz*<sup>\*</sup> / Y; *TM3* / *TM6* (Abb. 3.2, Seite 48) und konnten folgendermaßen von den übrigen Embryonen unterschieden werden: Es wurde ein Stamm gewählt, der neben dem mutanten *baz*-Allel noch ein FM7blue<sup>*ftz*</sup>-Balancer-Chromosom enthielt. Das hatte den Vorteil, dass eine Antikörperfärbung gegen das *lacZ*-Gen, das unter der Kontrolle des *fushi-tarazu* (*ftz*)-Promotors exprimiert wurde, erfolgen konnte. Hierbei wurden die *ftz*-Streifen mit Hilfe des  $\alpha$ - $\beta$ -Galactosidase Antikörpers sichtbar gemacht. Die hemizygot mutanten Embryonen, die nicht über das FM7blue<sup>*ftz*</sup>-Balancerchromosom verfügten, zeigten somit keine *ftz*-Streifen und waren leicht von den übrigen Embryonen zu unterscheiden.

Als Ergebnis konnte festgehalten werden, dass das Baz-Protein in den mutanten *baz*-Allelen *baz*<sup>*815-8*</sup>, *baz*<sup>*Xi106*</sup>, *baz*<sup>*EH747*</sup> und *baz*<sup>*XK75*</sup> ab spätestens Stadium 9 nicht wie im Wildtyp apikal an der Membran lokalisiert war. Es konnte allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, dass das Baz-Protein vollständig verschwunden war, da es teilweise so aussah, als wäre es diffus im Zytoplasma verteilt. Hierbei muss eingeräumt werden, dass nicht ganz exakt zwischen einer möglichen unspezifischen Hintergrundfärbung und einer echten zytoplasmatischen Lokalisation unterschieden werden konnte. Insgesamt muss ebenfalls, wie in der Arbeit von

Ute Kuchinke auf die variable Ausprägung des zygotischen Phänotyps hingewiesen werden, da auch hier einige Embryonen in Stadium 9 oder höher zu finden waren, in denen das jeweilige mutante Baz-Protein noch geringfügig an der Membran zu erkennen war. In der Abb. 3.16 Bild A (Abschnitt 3.2.3) wird exemplarisch die Verteilung des Baz-Proteins in einem hemizygot mutanten  $baz^{815-8}$ -Embryo gezeigt, der sich in Stadium 9-10 befindet.

Eine andere Verteilung zeigte das Baz-Protein in hemizygot mutanten  $baz^{XR11}$ -Embryonen. Hier lokalisierte das Baz-Protein noch in weiten Teilen bis in höhere Embryonalstadien (ca. Stadium 13, Abb. 3.13 Bild A, Abschnitt 3.2.2) apikal an der Membran in der Epidermis. Abweichend von der wildtypischen Verteilung zeigte sich hierbei aber die apikale Lokalisierung des Proteins an der Plasmamembran nur an Teilen der Epidermis. Insbesondere fehlte das Baz-Protein häufiger z. B. an der ventralen Seite. Erst in höheren Stadien (ab Stadium 14-15) wurden Embryonen entdeckt, die über kein Baz-Protein in der Epidermis mehr verfügten (Abb. 3.13 Bild C, Abschnitt 3.2.2).

Die Verteilung des Baz-Proteins in dem Allel  $baz^{EH171}$  kann nicht aussagekräftig wiedergegeben werden, da die Färbung nicht richtig funktionierte.

Neben der Analyse der Verteilung des Baz-Proteins, wurde die Epidermis der hemizygot mutanten Embryonen anhand einer DE-Cadherin-Färbung auf ihre Polarität hin untersucht. Tanentzapf & Tepass (2003) zeigten, dass Crb in zygotischen  $baz^{Xi106}$ -mutanten Embryonen in der Epidermis wildtypisch lokalisiert war und, dass Arm in Stadium 11 Embryonen, bis auf lokale Unterbrechungen, eine ansonsten normale Verteilung in der Epidermis zeigte. In späten Embryonen (Stadium 17) zeigten große Regionen der Epidermis eine normale Polarität und wildtypische Morphologie (Ute Kuchinke, 1998; Tanentzapf & Tepass, 2003).

Analog zu der Lokalisation des ZA-assoziierten Arm, zeigte auch die Verteilung des ZA-assoziierten DE-Cadherins in allen hier untersuchten mutanten  $baz$ -Allelen ( $baz^{XR11}$ ,  $baz^{815-8}$ ,  $baz^{Xi106}$ ,  $baz^{EH747}$ ,  $baz^{XK75}$ ) bis auf unterschiedlich große lokale Unterbrechungen weite Bereiche mit einer relativ wildtypischen Verteilung.

### 3.2.2 Subzelluläre Analyse der Rettung des $baz^{XR11}$ mutanten Phänotyps

Wurden drei UAS- $baz$ -Effektorlinien, UAS- $baz^{full}$ , UAS- $baz^{S982A}$  und UAS- $baz^{APDZ3}$ , gegen den Grundstamm  $baz^{XR11}d3$  gekreuzt, so konnte der  $baz^{XR11}$ -mutante Phänotyp bis hin zu lebensfähigen adulten Tieren gerettet werden (Abschnitt 3.2.6). Da bei den Kreuzungen gegen die übrigen UAS- $baz$ -Effektorlinien keine geretteten Tiere schlüpften, wurden anhand von Antikörperfärbungen  $baz^{XR11}$ -mutante Embryonen untersucht. Hierbei sollte geklärt werden,

inwieweit die einzelnen mutanten Baz-Proteine zelluläre Defekte teilweise oder vollständig retten können oder nicht.

Erste Untersuchungen der zellulären Defekte, in Bezug auf epitheliale Zellen und auf NB beziehen sich hauptsächlich auf die embryonale Epidermis und auf die Verteilung des full-length Baz-Proteins und der mutanten Baz-Proteine in Metaphase-NB. Weitere Experimente stehen hierzu noch aus.

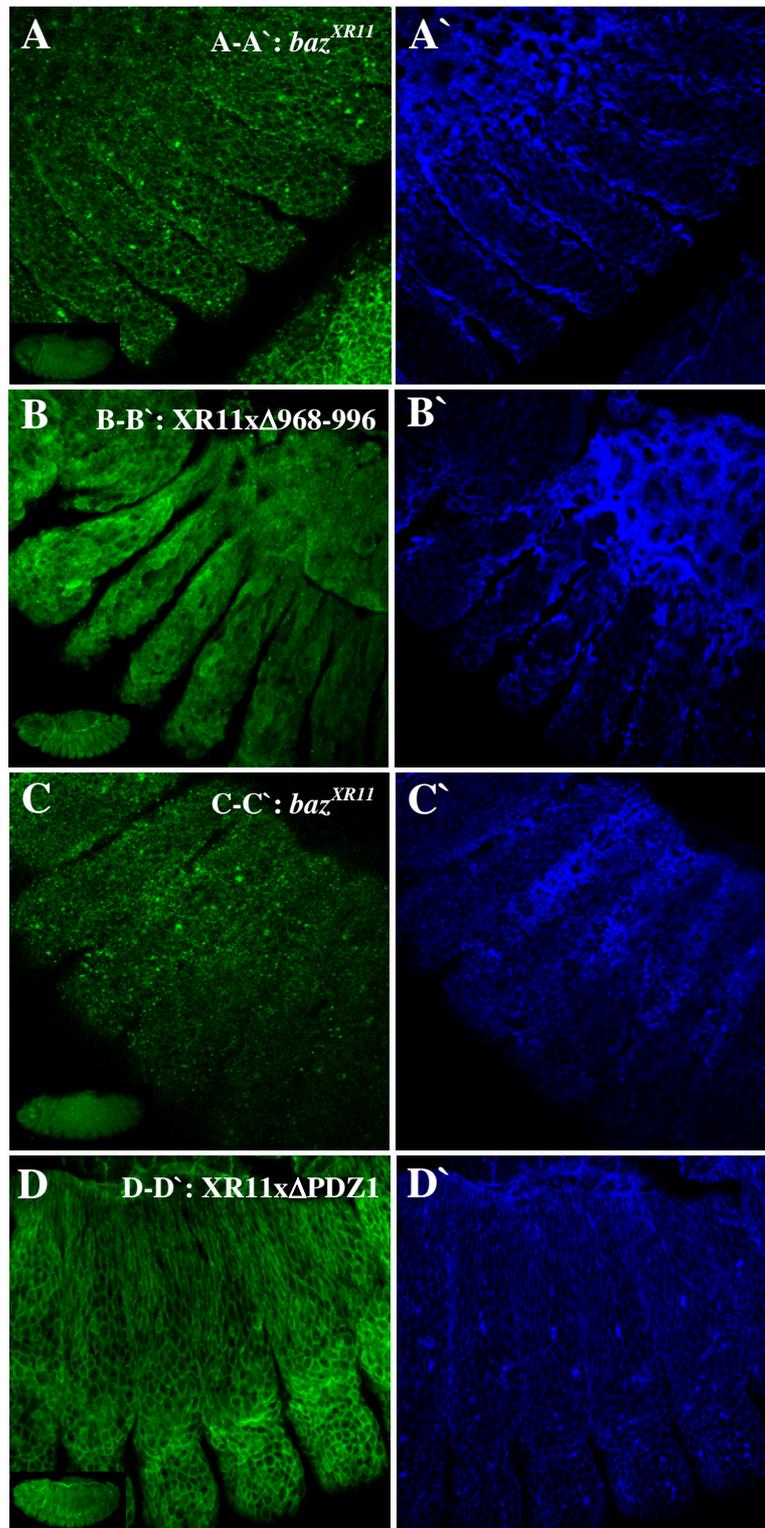
Wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, konnten in hemizygot mutanten  $baz^{XR11}$ -Embryonen das Baz-Protein noch bis in Stadium 13 apikal an der Plasmamembran in Teilen der Epidermis beobachtet werden (Abb. 3.13 Bild A). Erst in höheren embryonalen Stadien (ab Stadium 14-15, Abb. 3.13 Bild C) wurde kein Baz-Protein mehr detektiert, während die Morphologie und die Polarität in den epidermalen Zellen von Embryonen bis zum Stadium 17 nur lokale Unregelmäßigkeiten aufwies und ansonsten in großen Bereichen wildtypisch und normal aussah (Ute Kuchinke, 1998; Tanentzapf & Tepass, 2003).

Anhand der Abb. 3.12 (Seite 76) wird das Kreuzungsschema und die Genotypen wiedergegeben, die bei den Rettungskreuzungen entstehen können. Um auch hier die relevanten hemizygoten Embryonen mit dem Genotyp  $baz^{XR11} / Y; daG32 / baz^{UAS*}$  von den übrigen Embryonen, insbesondere von den Embryonen mit dem Genotyp  $baz^{XR11} / +; daG32 / baz^{UAS*}$  unterscheiden zu können, wurden neben der schon in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Färbung gegen das LacZ-Protein eine Färbung gegen das Sxl-Protein angewendet, wodurch ausschließlich weibliche Tiere angefärbt wurden.

Für die subzelluläre Analyse der hemizygot mutanten Embryonen, in denen die zusätzliche Expression der jeweiligen mutanten Baz-Proteine stattfand, wurden insgesamt drei verschiedene Kombinationen von Antikörpern gewählt. Im ersten Ansatz wurde gegen das Baz-Protein und gegen DE-Cadherin gefärbt. Im zweiten und dritten Ansatz erfolgte die Färbung jeweils gegen Mira, bzw. gegen das Baz-Protein und gegen das FLAG-Epitop, wodurch die jeweiligen mutanten Baz-Proteine sichtbar gemacht werden konnten.

Zuerst werden die Embryonen beschrieben, die gegen Baz und DE-Cadherin gefärbt wurden und die zeitlich zwischen Stadium 9 und Stadium 17 lagen, wobei insbesondere Embryonen ab Stadium 13 betrachtet wurden.

In vielen hemizygoten Embryonen, die aus den verschiedenen Rettungskreuzungen hervorgegangen waren, zeigte sich (Abb. 3.13) eine flächenmäßig gleichmäßigere Verteilung des Baz-Proteins mit weniger Unregelmäßigkeiten, als in hemizygot mutanten Embryonen, ohne die Expression der jeweiligen mutanten Baz-Proteine.



**Abb. 3.13 Hemizygot mutante  $baz^{XR11}$ -Embryonen im Vergleich zu geretteten Embryonen**

Hemizygot mutante  $baz^{XR11}$ -Embryonen (A, A': Stadium 13 und C, C': Stadium 14-15) werden mit Embryonen vergleichend dargestellt, die aus folgenden Kreuzungen hervorgegangen waren:  $baz^{XR11} / FM7blue^{fz}$ ,  $daG32 / daG32$  gegen  $+ / Y$ ;  $baz^{UAS*} / baz^{UAS*}$  ( $baz^{UAS*}$  in B, B':  $UAS-baz^{4968-996}$  / Stadium 13 und in D, D':  $UAS-baz^{APDZ1}$  / Stadium 14). Gezeigt werden Ausschnitte der einzelnen Embryonen, die in einem Inset jeweils mit abgebildet werden. Der Fokus liegt hierbei auf der embryonalen Epidermis. Es erfolgte eine Baz-Färbung gegen das Baz-Protein (A, B, C, und D) und gegen das DE-Cadherin-Protein (A', B', C' und D') (links: anterior, rechts: posterior, oben: dorsal und unten: ventral).

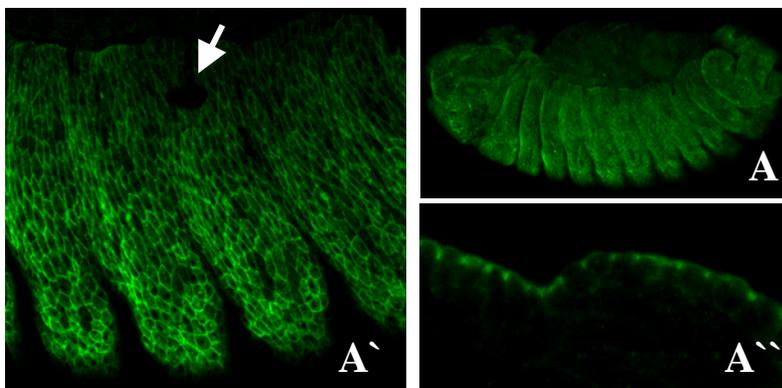
Hierbei konnte nicht zwischen dem endogenen, mutanten Baz<sup>XR11</sup>-Protein und dem Transgen-kodierten, ektopisch exprimierten FLAG-Baz-Protein unterschieden werden.

Die Kreuzungen gegen zehn UAS-*baz*-Effektorlinien, UAS-*baz*<sup>full</sup>, UAS-*baz*<sup>S980AS982</sup>, UAS-*baz*<sup>S980A</sup>, UAS-*baz*<sup>S982</sup>, UAS-*baz*<sup>APDZ1</sup>, UAS-*baz*<sup>APDZ1-2</sup>, UAS-*baz*<sup>APDZ2</sup>, UAS-*baz*<sup>APDZ3</sup>, UAS-*baz*<sup>APDZ2-3</sup> und UAS-*baz*<sup>APDZ1-3</sup>, ließen in den hemizygoten Embryonen mit der Expression der jeweiligen mutanten Baz-Proteine bis in höhere embryonale Stadien eine klare apikale Baz-Färbung an der Plasmamembran der Epidermiszellen, wie sie im Wildtyp beobachtet wird, erkennen (Abb. 3.13, Bilder C-D). Gezeigt werden Embryonen, die sich im Stadium 14-15 befinden.

Bei drei UAS-*baz*-Effektorlinien, UAS-*baz*<sup>AC</sup>, UAS-*baz*<sup>A968-996</sup> und UAS-*baz*<sup>A737-1019</sup>, wurde die Baz-Färbung im Zytoplasma der Epidermiszellen detektiert und bei UAS-*baz*<sup>A1026-1464</sup> konnte keine Baz-Färbung ausgemacht werden. Die beiden UAS-Linien UAS-*baz*<sup>AN</sup> und UAS-*baz*<sup>3PDZ</sup>, an denen der Baz-Antikörper nicht binden kann, zeigten eine nur sehr schwache apikale Baz-Färbung an der Membran, die in einigen Embryonen überhaupt nicht beobachtet werden konnte.

In der Abb. 3.13 (Bilder A bis B) wird ein *baz*<sup>XR11</sup>-Embryo (Stadium 13), in dem das  $\Delta$ 968-996 Baz-Protein exprimiert und zytoplasmatisch in den Epidermiszellen lokalisiert wurde, im direkten Vergleich neben einem hemizygot mutanten *baz*<sup>XR11</sup>-Embryo (Stadium 13) abgebildet.

Betrachtet man die Polarität und die Morphologie der epidermalen Zellen, so konnte anhand der Verteilung des ZA-assoziierten DE-Cadherins festgestellt werden, dass die generellen Unregelmäßigkeiten weniger häufig auftraten, aber nicht vollständig verschwunden waren. So waren insbesondere kleinere Löcher (Abb. 3.14 Bild A) in der Epidermis zu erkennen.



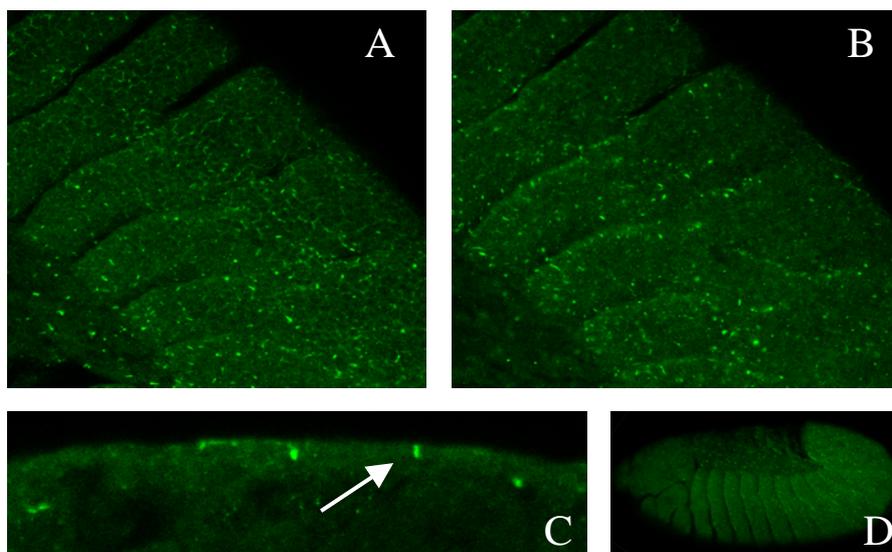
**Abb. 3.14 Verteilung des  $\Delta$ N Baz-Proteins in *baz*<sup>XR11</sup> - Embryonen**

Die Abbildung zeigt einen Embryo (A), der aus folgender Kreuzung hervorgegangen war: *baz*<sup>XR11</sup> / FM7blue<sup>itz</sup>; *daG32* / *daG32* gegen + / Y; UAS-*baz*<sup>AN</sup> / UAS-*baz*<sup>AN</sup>. In A' wird ein Ausschnitt aus dem Embryo mit dem Fokus auf die embryonale Epidermis gezeigt. Es erfolgte

eine FLAG-Färbung gegen das mutante  $\Delta$ N Baz-Protein (A – A'') (A, A': links: anterior, rechts: posterior, oben: dorsal und unten: ventral, A'': Querschnitt der ventralen Epidermis). Der weiße Pfeil zeigt auf ein kleines Loch in der Epidermis.

Da die FLAG-Färbungen auch schon bei der subzellulären Analyse der mutanten Baz-Proteine in einem für *baz* wildtypischen Hintergrund schwierig zu detektieren waren, wurden auch bei der subzellulären Untersuchung in einem für *baz* mutanten Hintergrund, wie das in diesem experimentellen Ansatz der Fall war, nur wenige Embryonen gefunden, die eine FLAG-Färbung aufwiesen. Eine Färbung an der apikalen Plasmamembran zeigten die folgenden mutanten Baz-Proteine, UAS-*baz*<sup>full</sup>, UAS-*baz*<sup>S980AS982</sup>, UAS-*baz*<sup>S982</sup>, UAS-*baz*<sup>APDZ1</sup>, UAS-*baz*<sup>APDZ1-2</sup> und UAS-*baz*<sup>ΔN</sup>. Hierbei handelt es sich um die gleichen Baz-Proteine, die auch schon bei der Überexpression eine wildtypische apikale Verteilung an der Plasmamembran in der Epidermis zeigten. Die FLAG-Färbung war, im Gegensatz zur Baz-Färbung, in der Regel nicht immer in der gesamten embryonalen Epidermis zu sehen. Eine der wenigen Ausnahmen bildete die FLAG-Färbung des ΔN Baz-Proteins. Hier zeigte sich, mit leichten Beeinträchtigungen, wie z. B. kleinere Löcher, sehr oft eine über die gesamte Epidermis verteilte Lokalisation des mutanten Transgen-kodierten ΔN Baz-Proteins an der apikalen Plasmamembran (Abb. 3.14).

Die Lokalisation der mutanten Baz-Proteine UAS-*baz*<sup>ΔPDZ2</sup>, UAS-*baz*<sup>ΔPDZ3</sup>, UAS-*baz*<sup>ΔPDZ2-3</sup> und UAS-*baz*<sup>ΔPDZ1-3</sup>, zeigte sich, wie auch schon bei den Überexpressionsexperimenten, in einem punktuellen Muster, bzw. in längeren Abschnitten entlang der apikalen und lateralen Plasmamembran (Abb. 3.15). Das mutante ΔPDZ2 Baz-Protein konnte dabei nur sehr schwach detektiert werden. Bei den verbleibenden Baz-Proteinen, UAS-*baz*<sup>S980A</sup>, UAS-*baz*<sup>ΔC</sup>, UAS-*baz*<sup>3PDZ</sup>, UAS-*baz*<sup>A968-996</sup>, UAS-*baz*<sup>A737-1019</sup> und UAS-*baz*<sup>A1026-1464</sup>, konnte bislang noch keine FLAG-Färbung sichtbar gemacht werden.



**Abb. 3.15 Verteilung des ΔPDZ2-3 Baz-Proteins in *baz*<sup>XR11</sup> - Embryonen**

In der Abbildung wird ein Embryo (ca. Stadium 12) dargestellt (D), der aus der folgenden Kreuzung hervorgegangen war: *baz*<sup>XR11</sup> / FM7blue<sup>flz</sup>; *daG32* / *daG32* gegen + / Y; UAS-*baz*<sup>ΔPDZ2-3</sup> / UAS-*baz*<sup>ΔPDZ2-3</sup>. In A wird ein Ausschnitt mit dem Blick auf die embryonale Epidermis abgebildet. Bild B zeigt eine durch die Zellen von Bild A durchfokussierte Ebene.

Es erfolgte eine FLAG-Färbung gegen das mutante ΔPDZ2-3 Baz-Protein (A - D) (A, B: links: anterior, rechts: posterior, oben: ventral und unten: dorsal, C: Querschnitt der ventralen Epidermis). Der weiße Pfeil zeigt auf die Verteilung des mutanten Transgen-kodierten ΔPDZ2-3 Baz-Proteins.

Bei der Betrachtung der Verteilung der mutanten Baz-Proteine in Metaphase-NB von hemizygot mutanten *baz<sup>XR11</sup>*-Embryonen stellte sich heraus, dass weder eine FLAG- noch eine Baz-Färbung beobachtet werden konnte.

Insgesamt konnte aufgrund der ermittelten Daten folgende Zuordnung bestimmter Aufgaben der einzelnen Domänen von Baz erfolgen: Die N-terminalen AS 1-290 sowie auch die erste PDZ-Domäne waren für die Lokalisation von Baz an der Plasmamembran in Epithelzellen der embryonalen Epidermis, in einem für *baz* mutanten Hintergrund entbehrlich. Für die polarisierte Verteilung von Baz an der Plasmamembran waren die zweite und dritte PDZ-Domäne unerlässlich.

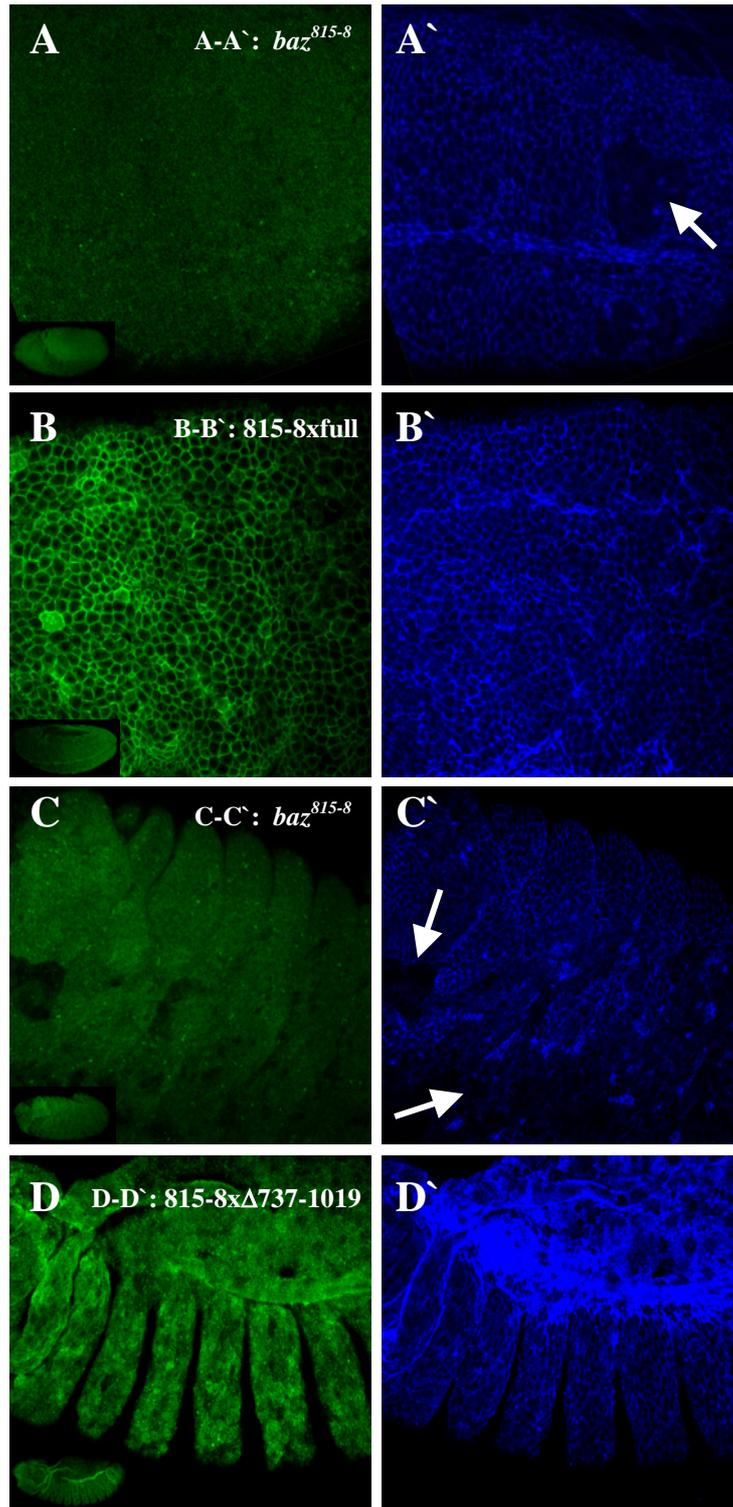
Ein weiteres Ergebnis war, dass der Austausch der potentiell phosphorylierbaren AS in nicht mehr phosphorylierbare AS keine Auswirkung auf die Verteilung von Baz an der apikalen Epidermis membran hatte, wodurch die Vermutung nahe lag, dass Baz für seine Lokalisierung an der Plasmamembran in Epithelzellen der Epidermis nicht an den AS S980 und AS S982 phosphoryliert werden muss.

### 3.2.3 Subzelluläre Analyse der Rettung des *baz<sup>815-8</sup>* mutanten Phänotyps

Eine analoge Vorgehensweise wie sie bereits bei der subzellulären Analyse der Rettung des *baz<sup>XR11</sup>*-mutanten Phänotyps beschrieben wurde, erfolgte auch für die subzelluläre Untersuchung der Rettung des *baz<sup>815-8</sup>* mutanten Phänotyps.

Da keine ausreichende Amplifizierung des Grundstamms *baz<sup>815-8</sup>d6* möglich war, im Gegensatz zur Amplifizierung des *baz<sup>XR11</sup>d3*-Grundstamms, konnten nur zwei von den 16 UAS-*baz*-Effektorlinien, UAS-*baz<sup>full</sup>* und UAS-*baz<sup>Δ737-1019</sup>* betrachtet werden.

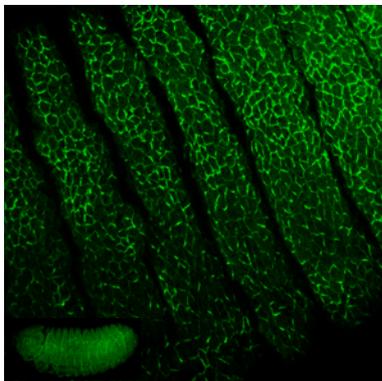
In Abschnitt 3.2.1 wurde verdeutlicht, dass in hemizygot mutanten *baz<sup>815-8</sup>*-Embryonen, im Gegensatz zu den hemizygot mutanten *baz<sup>XR11</sup>*-Embryonen, das Baz-Protein ab spätestens Stadium 9 nicht wie im Wildtyp apikal an der Plasmamembran der Epithelzellen lokalisiert war. Es konnte allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, dass das mutante *Baz<sup>815-8</sup>*-Protein noch vorhanden, aber vollständig fehllokalisiert vorlag. Hier wurde ebenfalls, anhand der Färbung gegen das ZA-assoziierte DE-Cadherin-Protein, in unterschiedlich großen Bereichen eine relativ wildtypische Morphologie und normale Polarität der embryonalen Epidermiszellen bis in höhere embryonale Stadien (bis Stadium 17) beobachtet. Lokale Unregelmäßigkeiten in der Epidermisstruktur variierten in ihrer Ausprägung. In der Abb. 3.16 wird dieser Sachverhalt sowie die Verteilung des Baz-Proteins anschaulich dargestellt. Es zeigten sich insbesondere ventrale Unregelmäßigkeiten, wie z. B. Löcher, in der embryonalen Epidermis (Abb. 3.16 Bilder A` und C`).



**Abb. 3.16 Hemizygot mutante  $baz^{815-8}$ -Embryonen im Vergleich zu geretteten Embryonen**

Hemizygot mutante  $baz^{815-8}$ -Embryonen (A, A': Stadium 9-10 und C, C': Stadium 14) werden mit Embryonen vergleichend dargestellt, die aus folgenden Kreuzungen hervorgegangen waren:  $baz^{815-8} / FM7blue^{ftz}; daG32 / daG32$  gegen + / Y;  $baz^{UAS*} / baz^{UAS*}$  ( $baz^{UAS*}$  in B, B': UAS- $baz^{full}$  / Stadium 10-11 und in D, D': UAS- $baz^{\Delta 737-1019}$  / Stadium 13). Gezeigt werden Ausschnitte der einzelnen Embryonen, die in einem Inset jeweils mit abgebildet werden. Der Fokus liegt auf der embryonalen Epidermis. Es erfolgte eine Färbung gegen das Baz-Protein (A, B, C, und D) und gegen das DE-Cadherin-Protein (A', B', C' und D'). Weiße Pfeile zeigen auf ventrale Unregelmäßigkeiten in der Epidermis (links: anterior, rechts: posterior, oben: dorsal und unten: ventral, mit Ausnahme der Abbildungen A, A' und B, B': hier wird eine ventrale Ansicht der Epidermis gezeigt).

Wird zunächst die Färbung gegen das Baz-Protein untersucht, so zeigte sich, dass in hemizygoten Embryonen mit dem Genotyp  $baz^{815-8} / Y; daG32 / baz^{UASfull}$ , in denen das full-length Baz-Protein exprimiert wurde, eine flächenmäßig gleichmäßige Verteilung des Baz-Proteins an der apikalen Plasmamembran der Epidermis zu erkennen war, wie das im Wildtyp beobachtet werden konnte (Abb. 3.16 Bilder A bis B` ). Zum Vergleich wird ein mutanter  $baz^{815-8}$ -Embryo (ca. Stadium 9-10) zusammen mit einem Embryo (ca. Stadium 10-11) abgebildet, der einen geretteten  $baz^{815-8}$ -Phänotyp aufweist. Ob es sich bei der zu beobachtenden Färbung ausschließlich um das full-length Baz-Protein handelte, das über das GAL4-System in den hemizygoten Embryonen exprimiert wurde, oder ob auch das mutante  $Baz^{815-8}$ -Protein an der apikalen Plasmamembran in den Epidermiszellen lokalisiert war, konnte hier und bei den übrigen Kreuzungen nicht unterschieden werden. Eine Färbung gegen das FLAG-Epitop zeigte, wie in der Abb. 3.17 dargestellt, dass das full-length Baz-Protein nahezu vollständig an der apikalen Membran der Epidermis lokalisiert war. Eine FLAG-Färbung in den NB konnte nicht festgestellt werden, während eine Färbung gegen das Baz-Protein eine apikale halbmondförmige Struktur am Zytokortex von Metaphase-NB sichtbar machte.



**Abb. 3.17 Verteilung des full-length Baz-Proteins in geretteten  $baz^{815-8}$ -Embryonen**

Die Abbildung zeigt einen Embryo (Inset), der aus folgender Kreuzung  $baz^{815-8} / FM7blue^{fz}; daG32 / daG32$  gegen  $+ / Y; UAS-baz^{full} / UAS-baz^{full}$  hervorgegangen war. Gezeigt wird ein Ausschnitt aus dem Embryo mit dem Blick auf die embryonale Epidermis. Es erfolgte eine FLAG-Färbung gegen das full-length Baz-Protein (links: anterior, rechts: posterior, oben: dorsal und unten: ventral).

Wurde statt dem full-length Baz-Protein das  $\Delta 737-1019$  Baz-Protein in hemizygot mutanten  $baz^{815-8}$ -Embryonen exprimiert, so fand man eine zytoplasmatische Baz-Färbung in den Epithelzellen der embryonalen Epidermis. Diese Veränderung im Phänotyp wird in der Abb. 3.16 deutlich gemacht. Es werden zum direkten Vergleich ein hemizygot mutanter  $baz^{815-8}$ -Embryo (ca. Stadium 13-14, Bilder C und C` ) und ein  $baz^{815-8}$ -Embryo (ca. Stadium 13, Bilder D und D` ) in dem das  $\Delta 737-1019$  Baz-Protein exprimiert wurde, abgebildet.

Bei einer Färbung gegen das FLAG-Epitop und somit gegen das mutante  $\Delta 737-1019$  Baz-Protein wurde in Epithelzellen und in Metaphase-NB kein Signal festgestellt.

Auch hier zeigte bei beiden Kreuzungen die Verteilung des ZA-assoziierten DE-Cadherins, dass die lokalen Unregelmäßigkeiten in der Epidermis weniger häufig auftraten, aber nicht vollständig gerettet wurden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Rettung des hemizygot letalen *baz*<sup>815-8</sup>-Phänotyps bis hin zu lebensfähigen adulten Tieren durch das full-length Baz-Protein auch in mutanten Embryonen aufgrund der Rettung des Phänotyps in der Epidermis nachvollzogen werden konnte.

### 3.2.4 Kutikula Präparate von mutanten *baz*-Allelen und von Rettungskreuzungen

Bevor die Analyse der Veränderungen im Kutikula-Phänotyp von Bazooka hinsichtlich der Rettungsexperimente erfolgen kann, werden zunächst die mutanten Kutikula-Phänotypen verschiedener *baz*-Allele beschrieben und in Klassen eingeteilt. Die verwendeten Stämme (*baz*-Allele) sind in Tab. 3.10 aufgelistet.

*baz*-Allele

<i>baz</i> <sup>XR11</sup>	<i>baz</i> <sup>815-8</sup> d6	<i>baz</i> <sup>EH747</sup>
<i>baz</i> <sup>XR11</sup> 36	<i>baz</i> <sup>Xi106</sup> FRT	<i>baz</i> <sup>EH747</sup> 36
<i>baz</i> <sup>XR11</sup> d3	<i>baz</i> <sup>Xi106</sup> FRT36	<i>baz</i> <sup>XK75</sup>
<i>baz</i> <sup>815-8</sup>	<i>baz</i> <sup>Xi106</sup>	<i>baz</i> <sup>XK75</sup> 36
<i>baz</i> <sup>815-8</sup> 36	<i>baz</i> <sup>Xi106</sup> 36	<i>baz</i> <sup>EH171</sup>

**Tab. 3.10** Verwendete *baz*-Allele für die Charakterisierung der mutanten Kutikula-Phänotypen. Weitere Erläuterungen zu den Stämmen sind den Tab. 2.8 – Tab. 2.10 und Anhang 3 zu entnehmen.

#### 3.2.4.1 Die 10 Klassen der mutanten Kutikula-Phänotypen von Bazooka

Der zygotische Kutikula-Phänotyp hemizygot *baz* mutanter Embryonen ist sehr variabel und wurde daher in 10 Klassen eingeteilt. Dabei repräsentiert Klasse 1 den stärksten Phänotyp, während die Kutikula der Klasse 10 nicht vom Wildtyp zu unterscheiden war.

Die Embryonen zeigten insgesamt einen sehr variablen Kutikula-Phänotyp. Es traten Segmentierungsdefekte auf, d. h. man fand keine Zähnchenbänder, bzw. nur ganz wenige oder zusammengeschmolzene Zähnchenbänder, verschieden große und unterschiedlich lokalisierte Löcher, Defekte im Kopfskelett und in den posterioren Spirakeln (Filzkörper) sowie kleinere Reste zusammenhängender Kutikula. Im Nachfolgenden werden die zehn Klassen der Kutikula-Phänotypen, die von den mutanten *baz*-Allelen verursacht wurden, tabellarisch (Tab. 3.11) aufgelistet. Eine zahlenmäßige Auswertung ist im Anhang aufgeführt (Anhang 6). Ergänzend dazu werden die einzelnen Klassen der Kutikula-Phänotypen in der Abb. 3.18

dargestellt. In dieser Abbildung werden zudem, um die Variabilität des *baz*-Phänotyps darzustellen, alle 8 Klassen, die bei dem Grundstamm *baz<sup>XR11</sup>d3* vorkamen, abgebildet.

Klasse	veränderte Größe des Embryos	keine embryonal strukturierte Kutikula, Reste zusammenhängender Kutikula oder Krümel	Segmentierungsdefekte	Löcher in der Kutikula	Defekte im Kopfskelett u/o in Spirakeln	Wildtyp
1	X	X				
2	X		X	X	X	
3	X			X	X	
4	X		X	X		
5	X			X		
6			X		X	
7			X	X	X	
8			X*	X	X	
9				X		
10						X

**Tab. 3.11** Tabellarische Beschreibung der 10 Klassen der Kutikula-Phänotypen von *Bazooka*

X\*: nur leichte Segmentierungsdefekte. Eine zahlenmäßige Auswertung befindet sich im Anhang (Anhang 6).

### 3.2.4.2 Zygotischer Kutikula-Phänotyp unterschiedlicher *baz<sup>-</sup>*-Allele

Das *baz*-Gen wurde bei der Suche nach zygotisch letalen Mutationen mit Defekten in der Kutikula identifiziert (Wieschaus et al., 1984). Die mutanten Embryonen zeigten hauptsächlich große dorsale und ventrale Löcher sowie Defekte im Kopfskelett. Die große Variationsbreite des *baz<sup>-</sup>*-Phänotyps wurde vermutlich durch den unterschiedlichen Einfluss der maternalen Komponente hervorgerufen (Tearle & Nüsslein-Volhard, 1987; Kuchinke, 1998; Wodarz et al., 2000).

In der Doktorarbeit von Ute Kuchinke (1998) wurden bereits vier der sechs *baz<sup>-</sup>*-Allele (*baz<sup>XR11</sup>*, *baz<sup>815-8</sup>*, *baz<sup>Xi106</sup>*, *baz<sup>EH171</sup>*) auf den kutikulären Phänotyp hin analysiert.

Ergänzend dazu erfolgte in dieser Arbeit eine detaillierte Unterscheidung des variablen Phänotyps und zusätzlicher weiterer *baz<sup>-</sup>*-Allele (Tab. 3.10). Auf diese Weise war es möglich, die Veränderungen im kutikulären Phänotyp zu dokumentieren, wenn die mutanten *baz<sup>-</sup>*-Allele gegen die UAS-*baz*-Effektorlinien gekreuzt wurden. Zudem konnte dadurch sowohl eine Reihung der *baz<sup>-</sup>*-Allele anhand der Stärke ihrer Phänotypen aufgestellt werden, als auch überprüft werden, ob sich die *baz<sup>-</sup>*-Allele signifikant voneinander unterschieden.

Da die *baz<sup>-</sup>*-Allele eine große Variabilität der Phänotypen aufwiesen, wurde auf die Darstellung der zahlenmäßigen Auswertung im Ergebnisteil verzichtet. Sie wird stattdessen im Anhang aufgeführt. Allerdings wurde sie als Kriterium benutzt, um die Reihung der mutanten *baz<sup>-</sup>*-Allele anhand der Stärke ihrer Phänotypen aufzustellen.

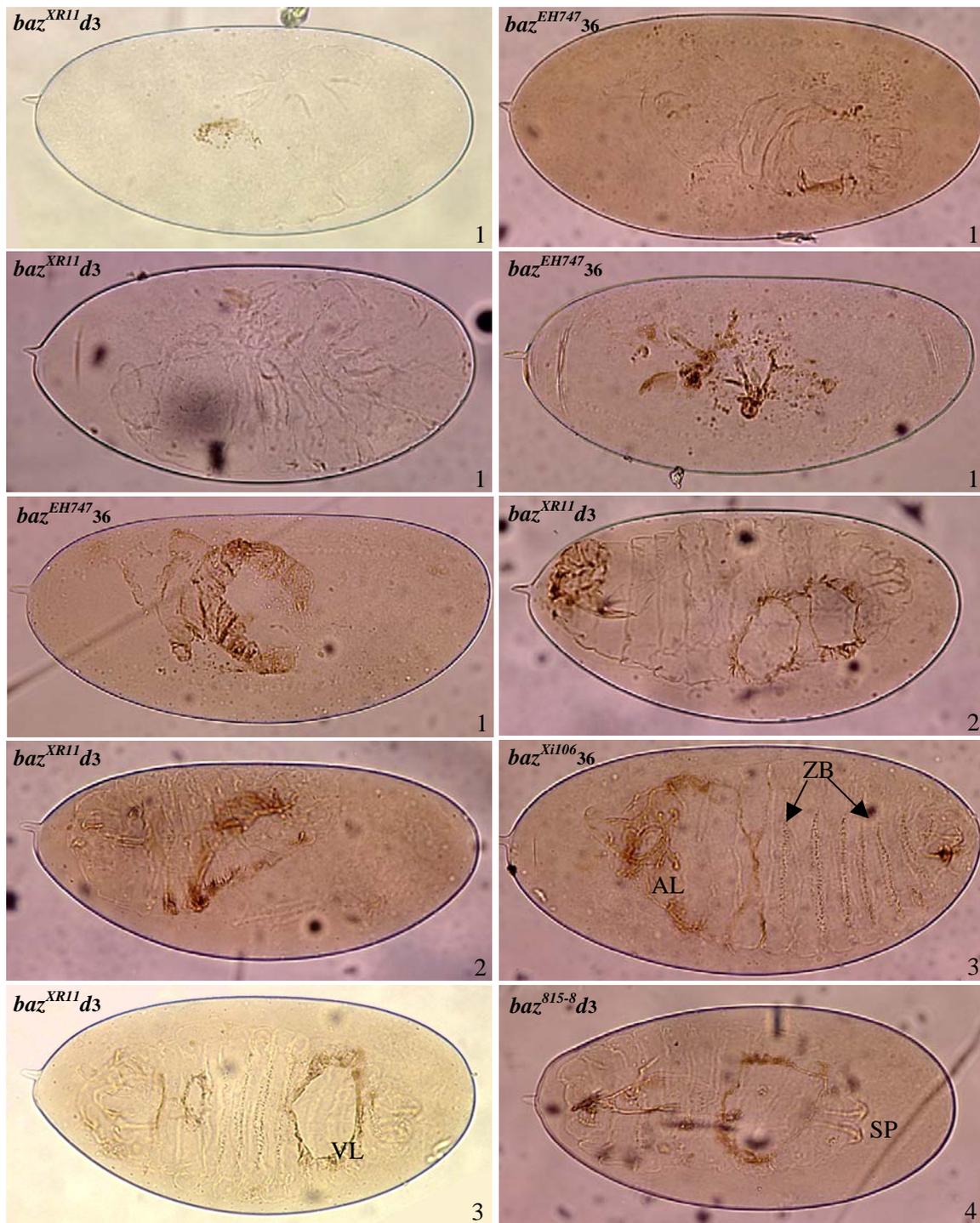
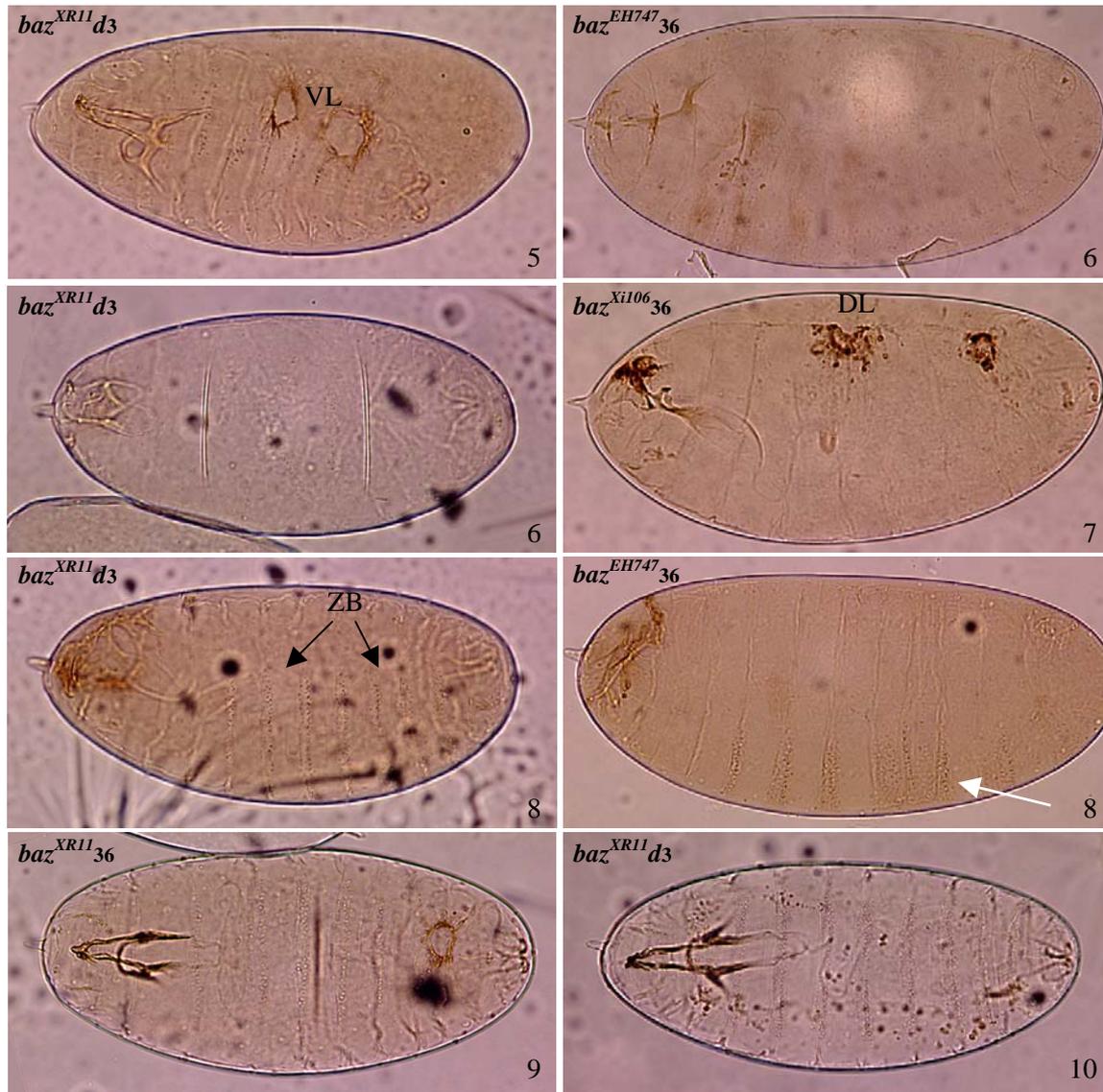


Abb. 3.18 10 Klassen der Kutikula-Phänotypen der mutanten *baz*-Allele  
Text am Ende der Abbildung.



**Abb. 3.18 10 Klassen der Kutikula-Phänotypen der mutanten *baz*-Allele**

Die Abbildung zeigt Kutikula-Präparate von abgestorbenen *Drosophila* Embryonen, die aus verschiedenen mutanten *baz*-Allelen entstanden waren. Im Besonderen werden, im Hinblick auf die Variabilität des *baz*-Phänotyps, alle 8 Klassen gezeigt, die bei dem Grundstamm *baz*<sup>XR11</sup>*d3* auftraten. Ergänzend dazu werden weitere Abbildungen dargestellt, um die 10 Klassen der verschiedenen *baz*-Allele exemplarisch aufzuführen.

Die Zahlen (1-10) in den einzelnen Abbildungen geben die Klassen wieder, in denen sich der abgebildete Embryo befindet (Genotypen: *baz*<sup>XR11</sup>*d3* = *baz*<sup>XR11</sup> / FM7blue<sup>ftz</sup>; *daG32* / TM3; *baz*<sup>EH747</sup>*36* = *baz*<sup>EH747</sup> / FM7blue<sup>ftz</sup>; TM3 / TM6; *baz*<sup>Xi106</sup>*36* = *baz*<sup>Xi106</sup> / FM7blue<sup>ftz</sup>; TM3 / TM6; *baz*<sup>XR11</sup>*36* = *baz*<sup>XR11</sup> / FM7blue<sup>ftz</sup>; TM3 / TM6; anterior: links, posterior: rechts; ventral und dorsal variieren; KS: Kopfstruktur, SP: Spirakeln, ZB: Zähnenbänder, zusammengesmolzene ZB: weißer Pfeil, DL: dorsales Loch, AL: anteriores Loch; VL: ventrales Loch). Die erste Klasse zeigte, im Gegensatz zu den übrigen Klassen, eine große Varianz. Weitere Erklärungen s. Tab. 3.11 und Anhang 6.

Folgende Aussagen wurden hierbei zur Auswertung herangezogen. Es zeigte sich, dass bei den *baz*-Allelen *baz*<sup>XK75</sup> und *baz*<sup>EH747</sup> von allen abgestorbenen Embryonen jeweils ca. 75% zu den ersten drei Klassen gehörten. Diese Klassen enthielten die Embryonen, die die stärksten kutikulären Phänotypen zeigten. Bei den *baz*-Allelen *baz*<sup>815-8</sup> und *baz*<sup>Xi106</sup> waren es ca. 50% und bei *baz*<sup>XR11</sup> und *baz*<sup>EH171</sup> ca. 30%. In der ersten Klasse waren z. B. die kutikulären

Phänotypen, die keine embryonal strukturierte Kutikula und nur Reste zusammenhängender Kutikula oder Krümel aufwiesen. Bei der zweiten Klasse und bei der dritten Klasse waren sukzessive Verbesserungen im kutikulären Phänotyp zu erkennen.

Bei dem  $baz^-$ -Allel  $baz^{EH171}$  zeigten fast 50% der Embryonen ein wildtypisches Aussehen (Klasse 10), während es bei dem Allel  $baz^{XR11}$  nur ca. 25% der Embryonen waren.

Auch  $baz^{Xi106}$  wies im Gegensatz zu  $baz^{815-8}$  eine höhere Anzahl an wildtypisch aussehenden Embryonen auf. Das  $baz^{XK75}$ -Allel zeigte den stärksten kutikulären Phänotyp, da hier zum Einen insgesamt 75% der Embryonen nur in der ersten Klasse zu finden waren und zum Anderen auch nur eine geringe Zahl an Embryonen einen wildtypischen Phänotyp zeigte. Anhand der übrigen Zahlenwerte konnten keine weiteren eindeutigen Aussagen erfolgen. Aus diesem Grund wurde folgende Reihung der  $baz^-$ -Allele anhand der Stärke ihrer Phänotypen, die mit dem schwächsten Allel anfängt und mit dem stärksten Allel aufhört, vorgenommen:  $baz^{EH171} < baz^{XR11} < baz^{Xi106} < baz^{815-8} < baz^{EH747} < baz^{XK75}$ .

### 3.2.4.3 Rettung des mutanten zygotischen $baz$ -Phänotyps durch UAS- $baz$ -Effektorlinien

Nachdem die mutanten  $baz$ -Allele hinsichtlich ihres kutikulären Phänotyps in zehn Klassen eingeteilt worden waren, erfolgte zum Einen die Kreuzung von  $baz^{XR11} dd$  gegen die 16 UAS- $baz$ -Effektorlinien und zum Anderen die Kreuzung von  $baz^{815-8} dd$  gegen zwei der 16 UAS- $baz$ -Effektorlinien. Die Kreuzungen gegen die übrigen 14 UAS- $baz$ -Effektorlinien stehen noch aus. Als Referenzstämme, um die möglichen Veränderungen, die sich durch diese Rettungskreuzungen ergeben konnten, zu erkennen, wurden jeweils  $baz^{XR11} d3$  oder  $baz^{815-8} d6$  gewählt, da  $baz^{XR11} dd$  und  $baz^{815-8} dd$  als Stämme nicht lebensfähig waren.

Die phänotypischen Kutikula-Merkmale, die bei der Analyse der mutanten  $baz$ -Allele auftraten und durch die Kreuzungen der  $baz^-$ -Allele gegen die jeweiligen UAS- $baz$ -Effektorlinien verschwanden (Rettung) oder hinzu kamen (Verschlechterung), werden in der Tab. 3.12 dargestellt. Nahezu jede UAS- $baz$ -Effektorlinie zeigte in mindestens einem Merkmal eine Rettung, d. h. es kamen in dem Fall weniger Embryonen vor, die das entsprechende phänotypische Merkmal zeigten. Die beiden Ausnahmen, in denen keine Verbesserung in einem phänotypischen Merkmal auftrat, waren UAS- $baz^{S980A}$  und UAS- $baz^{APDZ1-3}$ .

Tendenziell zeigten sich Verschlechterungen, d. h. die Zahl der Embryonen, die das entsprechende phänotypische Merkmal aufwiesen, erhöhte sich, wenn UAS- $baz$ -Effektorlinien verwendet wurden, denen Teile des C-terminalen Bereichs (AS 738-1464) von Bazooka fehlten, oder wenn dort eine AS ausgetauscht worden war.

Parentalkreuzung <i>baz<sup>XR11</sup>dd</i> x .....	variabler Phänotyp	reduz. Körper- größe	embryonal unstruktur. Phänotyp mit Resten zus. häng. Kutikula	Defekte in der Segm.	Löcher	Defekte im Kopf / SP
UAS- <i>baz<sup>full</sup></i>	R	IR	R	R		
UAS- <i>baz<sup>S980AS982A</sup></i>		R	R			R
UAS- <i>baz<sup>S980A</sup></i>	V				V	
UAS- <i>baz<sup>S982A</sup></i>	R	R	R	R		
UAS- <i>baz<sup>APDZ1</sup></i>	IR	R	R	R		
UAS- <i>baz<sup>APDZ2</sup></i>	R					
UAS- <i>baz<sup>APDZ3</sup></i>	IR	R	IR	R		
UAS- <i>baz<sup>APDZ1-2</sup></i>	R	R	R	R		
UAS- <i>baz<sup>APDZ1-3</sup></i>				V		
UAS- <i>baz<sup>APDZ2-3</sup></i>	R	R	R	R	R	R
UAS- <i>baz<sup>AN</sup></i>	IR	R	IR	R		R
UAS- <i>baz<sup>AC</sup></i>	V	IR			IV	
UAS- <i>baz<sup>3PDZ</sup></i>	V	IR		V	V	
UAS- <i>baz<sup>Δ968-996</sup></i>	IV	R	R	V	V	
UAS- <i>baz<sup>Δ737-1019</sup></i>	R		R		V	V
UAS- <i>baz<sup>Δ1026-1464</sup></i>		IV	R		IR <sup>a</sup> V <sup>d+v</sup>	R
<hr/>						
Parentalkreuzung <i>baz<sup>815-8</sup>dd</i> x .....						
UAS- <i>baz<sup>full</sup></i>	R		R	R		
UAS- <i>baz<sup>Δ737-1019</sup></i>	R	V	V			

**Tab. 3.12 Rettung des kutikulären *baz<sup>-</sup>*-Phänotyps durch UAS-*baz*-Effektorlinien**

Kutikula-Präparate von abgestorbenen Embryonen aus folgenden Rettungskreuzungen *baz<sup>XR11</sup>dd* gegen UAS-*baz*-Effektorlinien und *baz<sup>815-8</sup>dd* gegen UAS-*baz*-Effektorlinien wurden angefertigt und untersucht.

In der ersten Zeile sind die Merkmale aufgeführt, die bei der Analyse der kutikulären Phänotypen der mutanten *baz*-Allele auftraten. Welche Merkmale nach Kreuzung der mutanten *baz*-Allele gegen die UAS-*baz*-Effektorlinien modifiziert wurden, sind in dieser Tabelle dargestellt. R: Rettung, d. h. es traten weniger Embryonen mit dem entsprechenden Merkmal auf; IR: leichte Rettung; V: Verschlechterung, d. h. es erhöhte sich die Zahl der Embryonen, die das jeweilige phänotypische Merkmal hatten; IV: leichte Verschlechterung; R<sup>a</sup>: Rettung in anterioren Löchern, V<sup>d+v</sup>: Verschlechterung in dorsalen und ventralen Löchern.

### 3.2.5 Die Überlebensraten der *baz*<sup>-</sup>-Allele und der Rettungskreuzungen

Tab. 3.13 enthält die Überlebensraten der verschiedenen Fliegenstämme, die *baz*<sup>-</sup>-Allele enthalten und der Kreuzungen im Rahmen der Rettungsexperimente. Sie gibt an, welcher Prozentsatz einer bestimmten Anzahl von Embryonen ( $n \approx 500$ ) sich zu Larven entwickelte, wie viele sich verpuppten und wie viele als adulte Fliegen schlüpften. Die Tabelle zeigt deutlich, dass die Vitalität der verschiedenen Stämme sehr stark von den eingekreuzten Chromosomen abhängt und keine Aussage über die Stärke der verschiedenen *baz*<sup>-</sup>-Allele zulässt.

Stamm	zu Larven entwickelte Embryonen [%]	zu Puppen entwickelt [%]	zu Fliegen entwickelt [%]	Gerettete Männchen im Verhältnis zu geschlüpften Fliegen [%]
<i>baz</i> <sup>XR11</sup>	79,1	36,9	31,6	
<i>baz</i> <sup>XR11</sup> 36	40,2	24,0	14,9	
<i>baz</i> <sup>XR11</sup> d3	57,8	32,5	22,9	
<i>baz</i> <sup>815-8</sup>	70,8	60,5	49,8	
<i>baz</i> <sup>815-8</sup> 36	35,3	19,9	13,0	
<i>baz</i> <sup>815-8</sup> d6	30,5	17,5	8,3	
<i>baz</i> <sup>Xi106</sup> FRT	74,2	54,9	48,4	
<i>baz</i> <sup>Xi106</sup> FRT36	23,9	18,3	13,5	
<i>baz</i> <sup>Xi106</sup>	62,5	38,1	26,7	
<i>baz</i> <sup>Xi106</sup> 36	33,8	17,8	5,8	
<i>baz</i> <sup>EH747</sup>	42,0	27,0	25,0	
<i>baz</i> <sup>EH747</sup> 36	34,0	18,5	12,5	
<i>baz</i> <sup>XK75</sup>	49,0	41,0	36,0	
<i>baz</i> <sup>XK75</sup> 36	32,5	18,4	15,2	
<i>baz</i> <sup>EH171</sup>	49,5	28,4	25,4	
XR11xfull 15M/120F	81,0	50,0	36,0	12,5
XR11xS980AS982A	78,7	21,7	14,0	
XR11xS980A	71,6	45,9	41,0	
XR11xS982A 24M/217F	91,1	82,7	78,2	11,1
XR11xΔPDZ1	91,0	64,2	1,2	
XR11xΔPDZ2	64,7	46,3	38,0	
XR11xΔPDZ3 17M/198F	87,2	74,4	58,5	8,6
XR11xΔPDZ1-2	78,4	51,3	35,6	
XR11xΔPDZ1-3	85,0	65,3	60,0	
XR11xΔPDZ2-3	94,2	65,2	47,8	
XR11xΔN	86,0	56,3	15,3	
XR11xΔC	89,9	59,8	52,8	
XR11x3PDZ	72,4	63,4	54,5	
XR11xΔ968-996	80,0	46,5	34,0	
XR11xΔ737-1019	93,2	79,0	70,6	
XR11xΔ1026-1464	86,7	71,5	67,4	
815-8xfull 14M/156F	59,8	39,9	21,2	9,0
815-8xΔ737-1019	62,6	22,6	7,9	
815-8x S982A 15M/179F	—	—	—	8,4
815-8xΔPDZ3 11M/134F	—	—	—	8,2
Wildtyp	99,0	93,0	80,7	

**Tab. 3.13 Die Überlebensraten der verwendeten Fliegenstämme und der Rettungskreuzungen**

Text s. nächste Seite.

**Tab. 3.13 Die Überlebensraten der verwendeten Fliegenstämme und der Rettungskreuzungen**

Die Anzahl der Ausgangsembryonen betrug jeweils ca.  $n \approx 500$ . Diese Tabelle enthält die Prozentangaben, wie viele von den Ausgangsembryonen sich zu Larven entwickelten, wie viele sich verpuppten und wie viele als adulte Fliegen schlüpften. In der letzten Spalte steht das Verhältnis der geretteten *Drosophila* Männchen (M) zu der Gesamtzahl in der jeweiligen Kreuzung geschlüpfter Fliegen (F). Die Zahlen der M/F sind in der ersten Spalte hinter den entsprechenden Kreuzungen vermerkt. Erläuterungen zu den Stämmen und Kreuzungen: Anhang 1, Anhang 3 und Anhang 4.

**3.2.6 Rettung des hemizygot letalen *baz*-Phänotyps bis hin zum adulten Tier**

Kuchinke et al. (1998) konnten zeigen, dass das full-length Konstrukt von Baz in der Lage war, den hemizygot letalen  $baz^{XR11}$ -Phänotyp bis hin zum adulten Tier zu retten. In einem für  $baz^{XR11}$  mutanten Hintergrund wurde das full-length Baz-Protein mit einem ubiquitären Treiber (*daG32*) überexprimiert. Es entstanden dadurch Embryonen, die neben dem mutanten Baz-Protein das full-length Protein von Baz enthielten. Das eingebrachte Protein war funktionell, wodurch der mutante  $baz^{XR11}$ -Phänotyp gerettet werden konnte (Kuchinke, 1998). In dieser Arbeit stehen die einzelnen Domänen von Baz im Vordergrund. Wenn UAS- $baz^{full}$  den *baz* mutanten Phänotyp retten konnte, gibt es dann Bereiche von Baz, die diesbezüglich entbehrlich wären? Die Abb. 3.19 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung. Drei UAS-*baz*-Effektorlinien retteten den *baz* mutanten Phänotyp von jeweils zwei verschiedenen mutanten *baz*-Allelen ( $baz^{XR11} / baz^{815-8}$ ): UAS- $baz^{full}$ , UAS- $baz^{S982A}$  und UAS- $baz^{\Delta PDZ3}$ . Die Rettung durch UAS- $baz^{full}$  bestätigte das Ergebnis von Ute Kuchinke (1998).

Das Kreuzungsschema kann der Abb. 3.12 (Seite 76) entnommen werden. Die geretteten Fliegen waren nicht steril, somit keine Nondisjunction-Tiere, und sie verfügten über die Marker, die sie eindeutig als gerettete Tiere identifizierten.

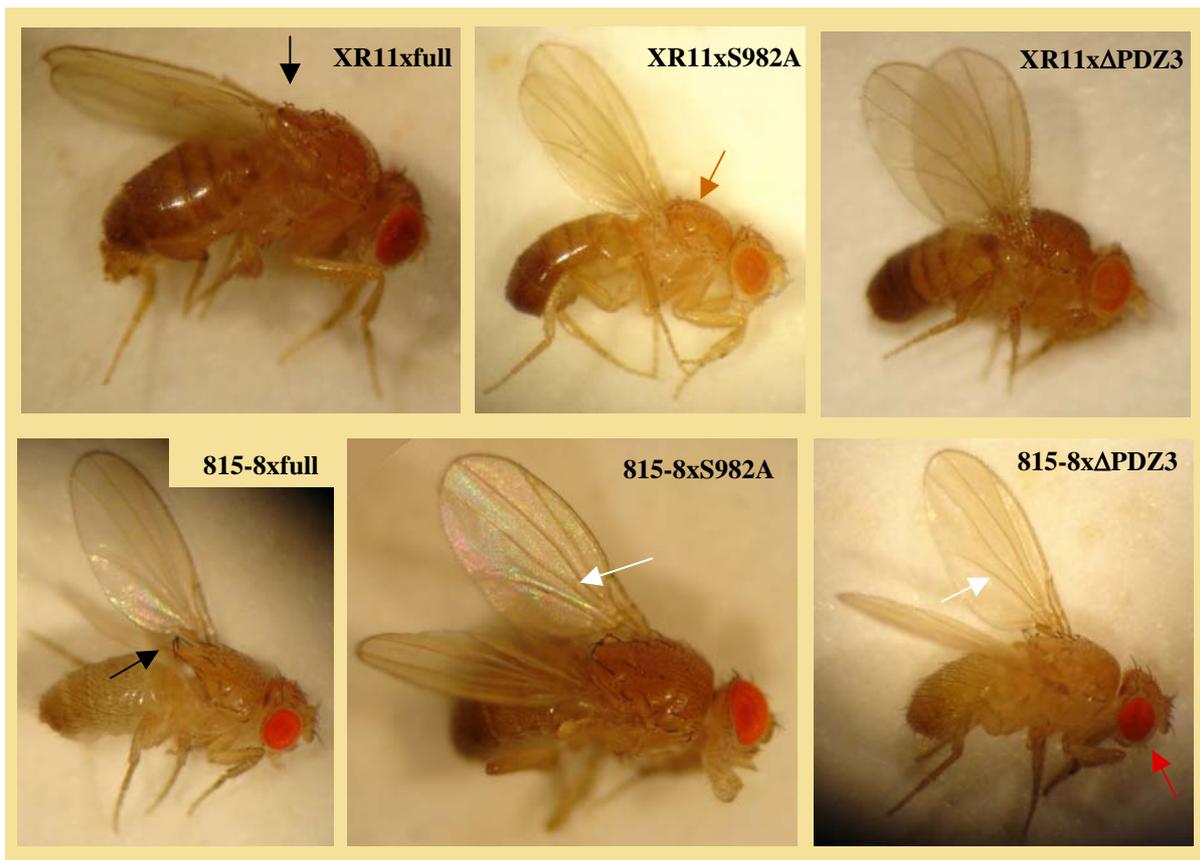
In den restlichen, ebenfalls für diese Rettungsexperimente eingesetzten mutanten *baz*-Allelen ( $baz^{Xi106}$ ,  $baz^{EH747}$ ,  $baz^{XK75}$ ), wurde keine einzige Rettung festgestellt.

Eine zusätzliche Möglichkeit zu überprüfen, ob die geschlüpften Männchen das mutante *baz*-Allel trugen, war, sie gegen attached-X-Weibchen zu kreuzen. Man erhielt dann hemizygote Männchen, die, im positiven Fall der Rettung, den *baz*-Phänotyp zeigten. Dies konnte anhand von Kutikula-Präparaten für die geretteten Männchen aus den folgenden Kreuzungen gezeigt werden: XR11xfull, 815-8xfull und 815-8x $\Delta PDZ3$  (ohne Abbildung). Der Test für die übrigen geretteten Männchen steht noch aus.

Neben den zur adulten Fliege geretteten Tieren konnten aus diesen Kreuzungen fast vollständig entwickelte adulte Fliegen aus den Puppenhüllen präpariert werden, die kurz vor dem Schlüpfen gewesen waren, aber nicht komplett gerettet wurden.

Eine weitere UAS-*baz*-Effektorlinie, UAS-*baz*<sup>APDZ1-2</sup>, brachte einige teilweise gerettete Männchen hervor, die aus der Puppenhülle präpariert wurden (2 von 137 Puppen; ohne Abbildung). Vollständig gerettete Tiere waren bei dieser Kreuzung nicht geschlüpft. Allerdings traten in diesem Fall die fast geretteten Tiere nur bei dem Allel *baz*<sup>815-8</sup> auf. In keiner weiteren Kreuzung konnten tote ausgewachsene Tiere mit den entsprechenden Markern aus der Puppenhülle präpariert werden.

Das Ergebnis war, dass die AS S982, wenn sie nicht mehr phosphoryliert werden konnte, keinen Einfluss auf die Rettung des *baz* mutanten Phänotyps hatte, wobei unbekannt ist, ob sie für die Funktion von Baz überhaupt phosphoryliert werden müsste. Ebenso nicht notwendig für die Rettung war die dritte PDZ-Domäne von Baz. Die beiden ersten PDZ-Domänen scheinen anhand dieser Untersuchung zumindest bis zum Puppenstadium entbehrlich zu sein.



**Abb. 3.19 Gerettete adulte Fliegen von *Drosophila***

Die Rettung des hemizygot letalen *baz*-Phänotyps bis zum adulten Tier konnte mit folgenden Kreuzungen erreicht werden: *baz*<sup>XR11</sup> sowie *baz*<sup>815-8</sup> x UAS-*baz*-Effektorlinie (jeweils: UAS-*baz*<sup>full</sup>, UAS-*baz*<sup>S982A</sup> und UAS-*baz*<sup>APDZ3</sup>). Die Männchen waren nicht steril und sie trugen alle Marker, die sie als gerettete Tiere auszeichneten. Die sichtbaren Marker betrafen die Augen (rote, wildtypisch runde und keine Bar-Augen (Marker für FM7) / roter Pfeil), die Körperfarbe (*y*: yellow: gelbbraune Körperfarbe / brauner Pfeil), die Borsten (*f*: forked: gespaltene/geknickte Borsten / schwarze Pfeile) und die Flügel (*cv*: crossveinless: im Flügel fehlten die zwei Querverenen / weiße Pfeile). Genotypen der *baz*-Allele: *y*, *w*, *baz*<sup>XR11</sup>, *f* und *y*, *cv*, *v*, *baz*<sup>815-8</sup>, *f*.

### 3.2.7 Sequenzierung mutanter *baz*-Allele

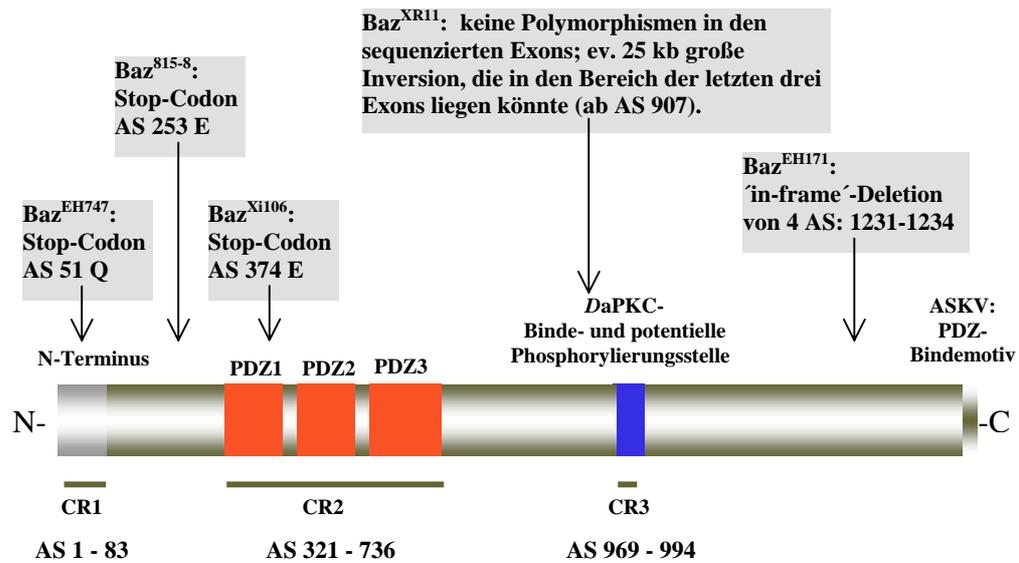
In verschiedenen experimentellen Ansätzen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Struktur und Funktion von Baz mit Hilfe verschiedener Baz-Konstrukte analysiert. Eine weitere Informationsquelle hinsichtlich der Struktur-Funktionsbeziehungen verschiedener Bereiche des Baz-Proteins sind mutante *baz*-Allele, die mittels ionisierender Strahlung (z. B. Röntgenstrahlen) oder mittels chemischer Mutagenese (z. B. durch Behandlung der Fliegen mit Ethylmethansulfonat = EMS) hergestellt wurden. Um die zugrunde liegenden molekularen Veränderungen aufzudecken, wurden im Rahmen dieser Arbeit die mutanten *baz*-Allele *baz*<sup>XR11</sup>, *baz*<sup>815-8</sup>, *baz*<sup>Xi106</sup>, *baz*<sup>EH747</sup> und *baz*<sup>EH171</sup> sequenziert.

Da diese mutanten *baz*-Allele heterozygot über ein FM7 Balancer-Chromosom gehalten werden, tragen die Fliegen neben dem mutanten immer auch ein wildtypisches Allel von *baz*. Die erhaltenen Sequenzen wurden daher auf Polymorphismen an einzelnen Basen der genomischen DNA hin untersucht. Die Ergebnisse der Sequenzierungen dieser *baz*-Allele sind in der Tab. 3.14 zusammengetragen und Abb. 3.20 gibt die schematische Abbildung der Lage der Mutationen relativ zu den bekannten Proteindomänen von Baz wieder.

<i>baz</i> -Allel	Sequenzierdaten
<i>baz</i> <sup>XR11</sup>	keine Polymorphismen in den sequenzierten Exons
<i>baz</i> <sup>EH747</sup>	Stop-Codon in AS 51 (Q: Glutamin)
<i>baz</i> <sup>Xi106</sup>	Stop-Codon in AS 374 (E: Glutaminsäure)
<i>baz</i> <sup>815-8</sup>	Stop-Codon in AS 253 (E: Glutaminsäure)
<i>baz</i> <sup>EH171</sup>	Deletion von 1H + 3Q's (AS 1231-1234) ⇒ in frame-Deletion von 4 AS

**Tab. 3.14 Sequenzdaten der mutanten *baz*-Allele**

Die genomische DNA von Baz, die aus sieben Exons und sechs Introns besteht, ist im Anhang (Anhang 7) wiedergegeben. Dort sind auch die Positionen sämtlicher PCR- und Sequenzierprimer eingetragen.



**Abb. 3.20** Schematische Abbildung der Lage der Mutationen relativ zu den bekannten Proteindomänen von Baz. Weitere Erklärungen siehe Text und Tab.3.14.

## 4 Diskussion

Baz ist eine Komponente des evolutionär konservierten PAR/aPKC-Komplexes, der in *Drosophila* für die asymmetrische Zellteilung in Neuroblasten, für die Etablierung der apikobasalen Polarität in Epithelzellen und für die Bildung von Zell-Zell-Kontaktstrukturen notwendig ist (Ohno, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene konservierte und nicht konservierte Bereiche des Baz-Proteins untersucht, um mit den gewonnenen Resultaten zu einem besseren Verständnis der Lokalisierung und Funktion von Baz, sowohl in Neuroblasten als auch in Epithelien, beizutragen. Es wurden dabei unterschiedliche Ansätze gewählt, um im Rahmen der Struktur- und Funktionsanalyse den verschiedenen Regionen des Baz-Proteins Aufgaben zuordnen zu können. Transgen-kodierte mutante Proteine von Baz sowie das full-length Baz-Protein wurden sowohl in wildtypischen, als auch in verschiedenen für *baz* mutanten Hintergründen auf ihre Lokalisation und Funktion in Epithelien und Neuroblasten hin analysiert.

Die gleichen Baz-Konstrukte wurden mit Hilfe des UAS-GAL4-Systems ektopisch im Auge von *Drosophila* exprimiert, um die Funktionalität der verschiedenen mutanten Baz-Proteine in einem gain-of-function-Experiment vergleichen zu können. Des Weiteren wurden mutante *baz*-Allele, die durch ionisierende Strahlung oder durch chemische Mutagenese erzeugt worden waren, sequenziert und phänotypisch verglichen.

### 4.1 Kontrolle der subzellulären Lokalisation von Baz in Epithelien und Neuroblasten

Während der frühen embryonalen Entwicklung wird Baz unabhängig von *DaPKC* und *DmPAR-6* im apikalen Zytokortex lokalisiert. In dieser Entwicklungsphase sind sowohl ein intaktes Zytoskelett als auch der Dynein-vermittelte Transport für die korrekte Lokalisation von Baz essentiell (Harris & Pfeifer, 2005). Während der Zellularisierung, wenn die Polarität zuerst etabliert wird, agiert Baz 'upstream' der AJ. Es zeigte sich, dass Baz für die Positionierung der *DaPKC* und der AJ während der Zellularisierung benötigt wird. Zu diesem Zeitpunkt kolokalisiert Baz mit den AJ und nicht mit *DaPKC* und *DmPAR-6*. Auch während der Gastrulation (Stadium 7-8) kann eine Kolokalisierung von *DE-Cadherin* und Baz basal der subapikalen Region, in der *DaPKC* und *DmPAR-6* lokalisiert sind, beobachtet werden (Harris & Pfeifer, 2004, 2005). Es wurde gezeigt, dass während der Gastrulation *PAR-6* für die Positionierung von Baz und den AJ und *DaPKC* für die Aufrechterhaltung von Baz und

den AJ erforderlich war (Hutterer et al., 2004; Harris & Pfeifer, 2005). Baz organisiert eine geschichtete apikale Domäne und kolokalisiert mit den AJ basal der DaPKC und DmPAR-6. Ab Stadium 11-12 beobachtet man zuerst eine Trennung von Baz und den AJ (Harris & Pfeifer, 2005). Wenn die Epithelien vollständig polarisiert sind, wird Baz ab dem embryonalen Stadium 14 apikal der AJ lokalisiert (Wodarz et al., 2000, Harris & Pfeifer, 2005). PAR-6 lokalisiert in Darmepithelien und in segmentalen Furchen der Epidermis weiterhin apikal von Baz, so dass die apikale Domäne in späteren embryonalen Stadien in drei Schichten eingeteilt vorliegt (Harris & Pfeifer, 2005). In Neuroblasten kann Baz ebenfalls ohne DaPKC und DmPAR-6 positioniert werden (Rolls et al., 2003; Kim et al. persönliche Mitteilung).

Wie die Lokalisation von Baz in embryonalen und adulten Epithelien, insbesondere in späteren embryonalen Stadien und in Follikelzellen, sowie in Neuroblasten gewährleistet wird, und welche Region von Baz dafür zuständig ist, konnte bislang noch nicht beantwortet werden. Ein Ziel dieser Arbeit war es, der Frage nachzugehen, welcher Bereich von Baz für die korrekte Lokalisation notwendig ist. Hierzu wurden Embryonen der Stadien 9-17 sowie Follikelzellen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die C-terminalen AS 738-1464 für die Lokalisation an der Plasmamembran in embryonalen Epidermiszellen, in follikulären Epithelzellen und in Neuroblasten essentiell waren.

Um die für die Membranlokalisation des Baz-Proteins notwendige Region innerhalb des C-terminalen Bereichs näher einzuschränken, wurden weitere mutante Baz-Konstrukte erzeugt. Innerhalb dieser C-terminalen Region liegt die DaPKC-Binde- und potentielle Phosphorylierungsstelle (CR3: AS 971-985), die über zwei Serine (S980/S982) verfügt, die zwischen den verschiedenen Spezies evolutionär konserviert sind. In PAR-3, dem Baz-Homolog in der Ratte, waren diese beiden Serine (S827/S829) für die Bindung der aPKC an PAR-3 wichtig, aber nur S827 (Baz S980) wurde phosphoryliert (Nagai-Tamai et al., 2002). Notwendig und ausreichend für die Bindung der aPKC an PAR-3 waren die AS 816-841 (Baz: AS 969-994). Wurde S827 phosphoryliert, führte das zur Reduzierung der Stabilität des PAR/aPKC-Komplexes. Der Austausch dieser phosphorylierbaren AS S827 in eine nicht mehr phosphorylierbare AS A827 verhinderte die Phosphorylierung dieser Sequenz, aber nicht die Bindung der aPKC an PAR-3 (Nagai-Tamai et al., 2002). Bislang ist nicht bekannt, ob auch in *Drosophila* diese Serinreste durch DaPKC phosphoryliert werden können.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde hier untersucht, ob die Phosphorylierung der konservierten Serine in der DaPKC-Binde- und Phosphorylierungsstelle für die Lokalisierung von Baz an den Zytokortex in Epithelzellen und NB erforderlich ist. Die Ergebnisse der hier

vorliegenden subzellulären Lokalisationsstudie machen deutlich, dass in Epithelzellen beide Serine (S980/S982) für die Lokalisierung von Baz an den Zytokortex entbehrlich sind. Zudem zeigte sich, dass zumindest der Austausch der AS Serin 982 gegen Alanin 982 keinen Einfluss auf die Rettung des hemizygot letalen *baz*<sup>815-8</sup> / *baz*<sup>XR11</sup>-Phänotyps bis hin zur adulten Fliege hatte. Da in Neuroblasten die Transgen-kodierten S980AS982A, S980A und S982A Baz-Proteine nicht mit dem FLAG-Antikörper detektiert wurden, kann nur aufgrund der Rettung des hemizygot letalen *baz*<sup>815-8</sup> / *baz*<sup>XR11</sup>-Phänotyps bis zum adulten Tier durch das S982A Baz-Protein schlussgefolgert werden, dass auch in NB der Austausch der AS S982 gegen A982 für die Lokalisation von Baz an den Zytokortex nicht relevant ist. Da das mutante Transgen-kodierte S980AS982A Baz-Protein in Epithelzellen der Epidermis in den embryonalen Stadien apikal an der Plasmamembran lokalisiert vorlag, in denen auch die NB in das Innere des Embryos delaminiert waren (ab Stadium 9), war es überraschend, keine Färbung in den NB zu beobachten. Der Grund könnte in der kurzen Zellzyklus-Dauer in den NB (ca. 1 h) liegen, da sowohl das GAL4-Protein als auch das GAL4-abhängige Transgen nacheinander transkribiert und translatiert werden mussten, bevor das mutante Baz-Protein, das durch das Transgen kodiert wurde, mittels immunhistochemischer Methoden detektiert werden konnte. Dieses Argument gilt ebenso für alle anderen Baz-Konstrukte, bei denen keine FLAG-Färbung in den NB detektiert werden konnte.

Bei weiteren mutanten Transgen-kodierten Proteinen, die dazu beitragen sollten, den für die Lokalisation am Zytokortex notwendigen C-terminalen Bereich weiter einzuschränken, zeigte die subzelluläre Lokalisation in Epithelzellen, dass die DaPKC-Binde- und potentielle Phosphorylierungsstelle für die Lokalisierung von Baz notwendig war. Wie oben für das mutante  $\Delta$ C Baz-Protein bereits beschrieben wurde, konnte auch bei dem mutanten Transgen-kodierten  $\Delta$ 968-996 Baz-Protein eine zytoplasmatische FLAG-Färbung im wildtypischen Hintergrund beobachtet werden. In neuroepithelialen Zellen des Neuralrohrs im Zebrafisch *Danio rerio* konnten von Trotha et al. (2006) zeigen, dass ein dem  $\Delta$ C Baz-Protein analoges Fusionsprotein von ASIP/PAR-3 so fehllokalisiert wurde, dass dem C-terminalen Bereich von ASIP/PAR-3 ähnlich wie dem C-terminalen Bereich von Baz eine Rolle in der Membranlokalisierung zugeschrieben werden konnte. Dabei zeigten sich jedoch einige Unterschiede: Die Lokalisation des mutanten ASIP/PAR-3-Proteins in den neuroepithelialen Zellen wurde sowohl apikal, als auch am gesamten Kortex festgestellt. Zusätzlich wurde eine Färbung in faserähnlichen Strukturen innerhalb des Zytoplasmas beobachtet, bei denen es sich um MT handeln könnte (von Trotha et al., 2006). Die Deletion der aPKC-Bindedomäne führte, nicht wie bei Baz, zu einer zytoplasmatischen Verteilung des entsprechenden mutanten

ASIP/PAR-3-Proteins, sondern zu einer apikalen Lokalisation, wie es beim full-length ASIP/PAR-3-Protein festgestellt wurde (von Trotha et al., 2006).

Ob die C-terminalen AS 1026-1464, die das PDZ-Bindemotiv beinhalten, ebenfalls für die Lokalisierung von Baz an die Plasmamembran in Epithelzellen verantwortlich sind, konnte nicht beantwortet werden, da bei dem entsprechenden mutanten Transgen-kodierten Protein weder eine deutliche Baz- noch eine FLAG-Färbung detektiert werden konnte. Es war auch keine Baz- oder FLAG-Färbung in den NB nachzuweisen. Ein PAR-3 Homolog der Maus, bei dem die C-terminalen AS 1025-1337 nach der aPKC-Binde- und Phosphorylierungsstelle bis zum C-terminalen Ende von PAR-3 fehlten, wurde in MDCK (Madin-Darby canine kidney) - Zellen transfiziert und auf seine Lokalisation hin untersucht. Dabei zeigte sich eine apikale Lokalisation an Zell-Zell-Kontaktstellen, wie es auch beim full-length PAR-3-Protein der Fall war. Erst bei der Deletion der C-terminalen AS 937-1337 wurde eine zytoplasmatische Lokalisation in transfizierten MDCK-Zellen beobachtet. Das bedeutet, dass die AS 937-1024 für die korrekte Lokalisation des PAR-3-Homologs der Maus in MDCK-Zellen notwendig waren (Mizuno et al., 2003). Diese AS sind identisch mit der Region des PAR-3-Homologs der Ratte, die als Bindestelle für den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF) STEF/Tiam1 identifiziert worden war (Nishimura et al., 2005). Die AS 937-1024 korrespondieren bei Baz mit den AS 1090-1177. Allerdings konnte dieser Bereich von Baz noch nicht als Bindestelle für GEFs identifiziert werden.

Baz kontrolliert zusammen mit den Komponenten des PAR/aPKC-Komplexes und weiteren Proteinkomplexen die Polarität in Epithelien und in Neuroblasten (Wodarz, 2005). Der PAR/aPKC-Komplex lokalisiert in Neuroblasten am apikalen Kortex und Mutationen in den Genen des PAR/aPKC-Komplexes führten zum Verlust der apikobasalen Polarität. Dadurch können die sonst am basalen Zytokortex lokalisierten Determinanten, wie Prospero und Numb, sowie ihre Adaptermoleküle Miranda und Partner of Numb, nicht mehr asymmetrisch verteilt werden. Zudem verliert die Spindel ihre korrekte Orientierung (Kuchinke et al., 1998; Schober et al., 1999; Wodarz et al., 1999, Wodarz et al., 2000; Petronczki & Knoblich, 2001; Rolls et al., 2003). Der PAR/aPKC-Komplex kontrolliert zusammen mit heterotrimeren G-Proteinen die Orientierung und die Geometrie der Spindel (Wodarz, 2005). Wie der PAR/aPKC-Komplex an den apikalen Kortex in Neuroblasten rekrutiert wird, ist bislang noch nicht bekannt. Hier konnte gezeigt werden, dass die C-terminalen AS 738-1464 für die Lokalisierung von Baz an den Zytokortex in Neuroblasten benötigt wurden. Das Transgen-kodierte Baz-Protein, dem die AS 738-1464 fehlen, konnte in einem für

wildtypischen Hintergrund im Zytoplasma der NB detektiert werden. Für die weiteren mutanten Transgen-kodierten Proteine, die den C-terminalen Bereich von Baz einschränken sollten, konnte in NB keine Färbung detektiert werden. Hierbei gilt der gleiche Erklärungsansatz, der schon bei dem mutanten Transgen-kodierten S980AS982A Baz-Protein in Bezug auf die fehlende FLAG-Färbung in NB diskutiert wurde.

Interessanterweise zeigte sich bei Verwendung des gegen die N-terminale Region von Baz gerichteten Antikörpers in nahezu allen Metaphase-NB bei der Überexpression des full-length Baz-Proteins und der mutanten Baz-Proteine eine wildtypische apikale halbmondförmige Verteilung, wie das Kuchinke et al. (1998) für Baz beim Wildtyp beschrieben haben. Hierbei konnte nicht unterschieden werden, ob durch die Färbung ausschließlich das endogene, wildtypische Baz-Protein oder auch das jeweilige Transgen-kodierte mutante Baz-Protein nachgewiesen wurde. Nur bei den beiden mutanten Baz-Proteinen  $\Delta N$  und 3PDZ kann diesbezüglich sicher von einer Färbung des endogenen Baz ausgegangen werden, da der Baz-Antikörper den N-terminalen Bereich von Baz erkennt, der bei den mutanten Baz-Proteinen  $\Delta N$  und 3PDZ nicht mehr vorhanden ist. Bei den übrigen mutanten Transgen-kodierten Baz-Proteinen, die eine FLAG-Färbung in den NB aufwiesen, kann nur vermutet werden, dass die mit dem Baz-Antikörper detektierte Färbung am apikalen Zytokortex die Lokalisation des endogenen Baz widerspiegelte, da der FLAG-Antikörper, der an die Transgen-kodierten Baz-Proteine binden kann, sie nicht detektierte. Lokalisiert das endogene, statt dem Transgen-kodierten Baz-Protein apikal an dem Zytokortex der NB, könnte das bedeuten, dass das endogene Baz ohne Einfluss der Transgen-kodierten mutanten Baz-Proteine an den apikalen Zytokortex lokalisiert wurde. Als einen möglichen Einfluss sollte hier die Fähigkeit von Baz zur Oligomerisierung erwähnt werden (Benton & St Johnston, 2003a). Bei den Transgen-kodierten mutanten Baz-Proteinen, die über keine FLAG-Färbung in den NB verfügten, kann keine Aussage gemacht werden, da vermutlich das jeweilige Transgen nicht in den NB überexprimiert wurde.

Es stellt sich die Frage, wie Baz in der Epidermis, in Follikelzellen und in Neuroblasten im apikalen Zytokortex lokalisiert wird. Möglichkeiten wären z. B. eine direkte oder indirekte Verbindung mit einem Transmembranprotein oder einem Protein mit einem Lipidanker. Ein als Bindungspartner in Frage kommendes Transmembranprotein wäre z. B. Crb, da es in Epithelien an der Bildung von Zell-Zell-Kontaktstrukturen sowie an der Kontrolle der Polarität beteiligt ist. Allerdings ist Crb in NB nicht exprimiert und scheidet daher in diesem Zelltyp als potentieller Bindungspartner aus. In Säugern bindet das Sdt-Homolog Pals1 gleichzeitig an das Crb-Homolog Crb3 und an PAR-6 und rekrutiert PAR-6 an die Membran

(Hurd et al., 2003). In *Drosophila* bindet Crb an Sdt (Bachmann et al., 2001). Im Hefe-Zwei-Hybridsystem und in GST-Pulldown Experimenten konnten sowohl eine direkte Interaktion zwischen Crb und *DmPAR-6*, als auch zwischen dem N-terminalen Bereich von Sdt und der PDZ-Domäne von *DmPAR-6* nachgewiesen werden (Kempkens, 2005). Da *DaPKC* an *DmPAR-6* binden kann (Petronczki & Knoblich, 2001, Egger-Adam, 2005) könnte so eine Möglichkeit bestehen, wie Baz und die Komponenten des PAR/aPKC-Komplexes an die Membran rekrutiert werden. Jedoch gilt auch hier, wie bereits oben beschrieben, dass Baz basal der *DaPKC* und *DmPAR-6* in epidermalen Epithelzellen lokalisiert war (Harris & Pfeifer, 2005). Allerdings zeigte sich, dass *DmPAR-6* während der Gastrulation für die Positionierung von Baz benötigt wurde (Hutterer et al., 2004; Harris & Pfeifer, 2005).

#### **4.2 Für die polare Verteilung von Baz entlang der Plasmamembran in Epithelien und am Zytokortex von Neuroblasten sind die zweite und dritte PDZ-Domäne von Baz erforderlich**

Wurden Transgen-kodierte mutante Baz-Proteine, die über eine Deletion der zweiten und dritten PDZ-Domäne von Baz verfügen, in Epithelien exprimiert, so zeigte sich, dass sie sowohl in einem für *baz* wildtypischen, als auch in einem *baz<sup>XR11</sup>*-mutanten Hintergrund an der apikolateralen Plasmamembran entweder in einem punktuellen Muster oder in längeren zusammenhängenden Abschnitten lokalisiert waren. In Follikelepithelzellen war das Transgen-kodierte mutante  $\Delta$ PDZ2 Baz-Protein apikal lokalisiert, während bei den übrigen Baz-Varianten mit Deletionen von PDZ-Domänen eine apikolaterale Verteilung beobachtet wurde. Somit konnte der zweiten und dritten PDZ-Domäne in der embryonalen Epidermis und teilweise auch im Follikelepithel eine Aufgabe in der Polarisierung von Baz an der Membran zugeordnet werden.

Die zweite und dritte PDZ-Domäne stellen für verschiedene Proteine eine Bindestelle dar. Es zeigte sich einerseits, dass *DaPKC* an die zweite und dritte PDZ-Domäne von Baz bindet (Wodarz et al., 2000) und andererseits, dass diese beiden PDZ-Domänen direkt an die Lipidphosphatase PTEN binden können (von Stein et al., 2005). Die Deletion der Bindestellen für diese beiden Interaktionspartner allein erklärt jedoch nicht die beobachtete Fehlverteilung des Transgen-kodierten Baz Proteins, da weder *DaPKC* noch PTEN für die korrekte Lokalisierung von Baz in frühen embryonalen Stadien erforderlich sind. Erst in späteren embryonalen Stadien wird die Lokalisierung von Baz abhängig von *DaPKC* (Wodarz et al., 2000; von Stein et al., 2005; Harris & Pfeifer, 2005). Es ist daher anzunehmen, dass

weitere, bislang nicht identifizierte Interaktionspartner dieser beiden PDZ-Domänen für die apikale Lokalisation von Baz verantwortlich sind. Alternativ könnten DaPKC und PTEN redundante Funktionen haben, die durch die Deletion der Bindestelle simultan eliminiert wurden.

### **4.3 Die erste PDZ-Domäne ist für die Lokalisation von Baz im Zytokortex von Epithelien und Neuroblasten entbehrlich**

Fehlt die erste PDZ-Domäne, wird ein entsprechendes Transgen-kodiertes mutantes Baz-Protein sowohl in Epithelien, als auch in NB wildtypisch apikal an der Plasmamembran oder in einer halbmondförmigen Struktur in Metaphase-NB verteilt. Für die Epithelien gilt dies sowohl in einem für *baz* wildtypischen als auch in einem mutanten Hintergrund. In den NB von hemizygot mutanten *baz<sup>XR11</sup>*-Embryonen war weder eine FLAG- noch eine Baz-Färbung zu sehen. Insgesamt lässt sich daraus schließen, dass die erste PDZ-Domäne für die Verankerung von Baz an die Membran in Epithelien und NB entbehrlich war. Auch hier gilt die Einschränkung, dass das endogene wildtypische Baz-Protein, bzw. das mutante Baz<sup>XR11</sup>-Protein noch vorhanden war, bzw. sein könnte und über die N-terminale Oligomerisierungsdomäne eine Bindung mit dem Transgen-kodierten  $\Delta$ PDZ1 Baz-Protein stattfinden konnte. In Vertebraten zeigte sich, dass zwei immunglobulinähnliche Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle, JAM-1 und Nectin, in epithelialen TJ, bzw. in AJ, an die erste PDZ-Domäne von PAR-3 binden und dadurch die Bindung an die Membran ermöglichten (Ebnet et al., 2001; Takekuni, 2003). In *Drosophila* sind noch keine Homologe zu JAM-1 und Nectin gefunden worden (Suzuki & Ohno, 2006).

### **4.4 Unterschiedliche Anforderungen an die N-terminalen AS 1-290 von Baz in verschiedenen Zelltypen von *Drosophila melanogaster***

Das Transgen-kodierte mutante  $\Delta$ N Baz-Protein wurde in den embryonalen Epithelzellen sowohl in einem für *baz* wildtypischen als auch in einem mutanten Hintergrund apikal an der Plasmamembran detektiert. Aufgrund der fehlenden Oligomerisierungsdomäne ist anzunehmen, dass weder im *baz<sup>XR11</sup>* mutanten Hintergrund eine Bindung mit dem Baz<sup>XR11</sup>-Protein, noch im für *baz* wildtypischen Hintergrund eine Bindung mit dem endogenen wildtypischen Baz-Protein erfolgen kann. Daraus ist zu schließen, dass die N-terminalen AS 1-290 für die apikale Membranlokalisation in embryonalen Epidermiszellen nicht benötigt

werden. In folliculären Epithelzellen hingegen wurde das Transgen-kodierte mutante  $\Delta N$  Baz-Protein entlang der gesamten Membran verteilt. Es lies sich teilweise auch eine sehr schwache zytoplasmatische Lokalisation feststellen.

Die Phosphorylierung von zwei konservierten Serinen von Baz, S151 und S1085, schuf 14-3-3 (PAR-5) - Bindestellen. Die Bindung des 14-3-3 (PAR-5) - Proteins an die phosphorylierte AS S151, die in der Nähe der evolutionär konservierten CR1-Stelle (AS 1 - 83) liegt, verhinderte die Oligomerisierung von Baz (Benton & St. Johnston, 2003b). In ähnlicher Weise blockierte die Bindung von 14-3-3 an die phosphorylierte AS S1085, die neben der CR3-Stelle (*DaPKC*-Binde- und potentiellen Phosphorylierungsstelle) lokalisiert ist, die Assoziation von Baz mit *DaPKC*. Dadurch induzierte die Kinase PAR-1 die Destabilisierung des PAR/aPKC-Komplexes, wodurch der Komplex daran gehindert wurde, sich an der basolateralen Membran der Follikelzellen anzulagern, d. h. er wurde von der lateralen Membran ausgeschlossen (Ausschlussprinzip). Baz bildete ektopisch laterale Komplexe, wenn die Serine S151 und / oder S1085, zu nicht mehr phosphorylierbaren AS (S→A) verändert wurden (Benton & St. Johnston, 2003b). Da S151 im deletierten N-terminalen Bereich liegt, wäre dies eine mögliche Erklärung, warum das Transgen-kodierte mutante  $\Delta N$  Baz-Protein in Follikelzellen lateral an der gesamten Membran zu finden war.

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass verschiedene Kombinationen von PDZ-Domänen für die apikale Lokalisierung von Baz in folliculären Epithelzellen notwendig waren, kam mit dem N-terminalen Bereich (AS 1-290) ein weiterer Teil von Baz hinzu, der in den Follikelzellen für die apikale Lokalisierung von Baz erforderlich war. Es mussten sowohl die AS 1-290 und nahezu alle Kombinationen von PDZ-Domänen vorhanden sein, damit Baz apikal lokalisiert wurde. In diesem Fall waren die AS 1-290 wesentlich kritischer für die apikale Lokalisierung von Baz als die PDZ-Domänen. Die deletierte N-terminale Sequenz enthält die CR1-Region (AS 1-83), die benötigt wird, damit Baz oligomerisieren kann (Benton & St Johnston, 2003a). Somit kann vermutet werden, dass die Oligomerisierung von Baz für die polarisierte Lokalisation von Baz notwendig ist. Dieses Resultat bestätigt das Ergebnis von Benton & St Johnston (2003a), die bereits zeigen konnten, dass die Oligomerisierung für die apikale Konzentration von Baz in Epithelzellen wichtig ist. Allerdings weicht ihr Ergebnis von den hier erfolgten Untersuchungen insoweit ab, dass das hier untersuchte  $\Delta N$  Baz-Protein entlang der gesamten lateralen Membran zu finden war. Benton & St Johnston (2003) verwendeten ein mit einem GFP-Epitop versehenes Konstrukt mit einer Deletion im N-terminalen Bereich (AS 1-312) und analysierten seine Lokalisation in den Follikelzellen. Dabei stellte sich heraus, dass das BAZ- $\Delta N$ :GFP-Protein im gesamten

Zytoplasma lokalisiert war und in einer geringen Menge auch apikal zu finden war. Eine ähnliche Verteilung zeigte sich, wenn BAZ-N:GFP in Follikelzellen überexprimiert wurde. Dieses mutante Protein besteht nur aus dem N-terminalen Bereich (AS 1-311). Es könnte daher vermutet werden, dass die AS 291-312 eine zusätzliche Sequenz darstellen, die neben den C-terminalen AS 738-1464 notwendig sind, Baz an die Membran in follikulären Epithelzellen zu lokalisieren. Diese voneinander abweichenden Ergebnisse könnten auch im unterschiedlich gewählten experimentellen Ansatz (FLAG-Protein/GFP-Protein) begründet sein.

Neben den bereits oben beschriebenen C-terminalen AS 937-1024 in PAR-3, dem Maus-Homolog von Baz, zeigte sich ebenso die im N-terminalen Bereich (AS 1-86) gelegene konservierte Oligomerisierungsdomäne für die Rekrutierung an die apikal gelegenen Zell-Zell-Kontaktstellen in MDCK-Zellen erforderlich (Mizuno et al., 2003).

Auch im Zebrafisch *Danio rerio* wurde beobachtet, dass in neuroepithelialen Zellen die Oligomerisierungsdomäne sowie die PDZ-Domänen und die oben bereits erwähnten C-terminalen AS 688-1127 für die apikale Lokalisierung des Zebrafisch-Homologs ASIP/PAR-3 an die Membran benötigt werden (von Trotha et al., 2006).

Diane Egger-Adam (2005) konnte zeigen, dass der N-terminale Bereich von Baz im Hefe-Zwei-Hybridsystem an das Aktin-Bindeprotein Dystrophin binden konnte, das in epidermalen Epithelzellen an der basalen Membran lokalisiert vorlag. Wird das basal lokalisierte Dystroglycan, ein Rezeptor für viele Moleküle der EZM, in Follikelzellen überexprimiert, reduziert das die apikale Lokalisierung von Baz. Der Verlust der Funktion von Dystroglycan resultiert in einer Ausdehnung von Baz an die basolaterale Membran (Deng et al., 2003). Die Fehllokalisierung von Baz könnte durch die in den Follikelzellen mögliche Bindung von Dystrophin an Baz begründet werden, da Dystrophin und Dystroglycan miteinander interagieren können (Deng et al., 2006; Egger-Adam, 2005). Da das  $\Delta$ N Baz-Protein aufgrund der Deletion der N-terminalen AS 1-290 nicht mehr über die Bindestelle von Dystrophin verfügt, wäre dies ebenfalls eine denkbare Erklärung für die Lokalisierung des  $\Delta$ N Baz-Proteins an der basolateralen Membran.

In Metaphase-NB wurde das Transgen-kodierte mutante  $\Delta$ N Baz-Protein in einem für *baz* wildtypischen Hintergrund apikal in einer halbmondförmigen Struktur am Zytokortex lokalisiert. Da eine mögliche Oligomerisierung mit dem endogenen Baz-Protein aufgrund der deletierten N-terminalen AS nicht erfolgen konnte, kann man davon ausgehen, dass die Lokalisierung des mutanten  $\Delta$ N Baz-Proteins an den apikalen Zytokortex unabhängig von

dem endogenem wildtypischen Baz-Protein erfolgte. Das bedeutet, dass in Metaphase-NB die N-terminalen AS 1-290 für die Verteilung von Baz an den Zytokortex entbehrlich waren.

Die Intensität der FLAG-Färbung des mutanten  $\Delta N$  Baz-Proteins war in allen Zelltypen sehr stark. Der Grund für die im Vergleich zu anderen mutanten Baz Proteinen erhöhte Färbungsintensität des  $\Delta N$  Baz-Proteins könnte in der besseren Zugänglichkeit des FLAG-Epitops liegen. PAR-1 phosphorylierte Baz an Position S151, die im deletierten N-terminalen Bereich liegt, und an der Position S1085, wodurch zwei Bindestellen für das 14-3-3-Protein geschaffen wurden (Benton & St. Johnston, 2003b). Hierdurch, und durch die potentielle Oligomerisierung von Baz, die über den N-terminalen Bereich verläuft (Benton & St. Johnston, 2003a), könnte die Zugänglichkeit des FLAG-Epitops bei Vorhandensein der N-terminalen AS 1-290 eingeschränkt sein. Ob die erhöhte Intensität der Färbung eventuell auch auf eine stärkere Expression zurückzuführen ist, müsste im Western Blot überprüft werden.

#### 4.5 Die Verteilung des Baz-Proteins in verschiedenen *baz*<sup>-</sup>-Allelen sowie kutikuläre *baz*<sup>-</sup>-Phänotypen im Kontext der Sequenzdaten

Da in den zygotischen *baz*<sup>*Xi106*</sup>-Mutanten das maternale Baz-Protein in den meisten Teilen des embryonalen Ektoderms in der späten Gastrulation (Stadium 9) nicht mehr detektierbar war (Tanentzapf & Tepass, 2002), sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob dies ebenfalls in weiteren mutanten *baz*-Allelen so beobachtet wird. Hierbei muss erwähnt werden, dass bei dieser Untersuchung nicht nur die Verteilung des maternalen Baz-Proteins beachtet wurde, sondern auch die Verteilung der jeweiligen mutanten Baz-Proteine. Bei den weiblichen Genotypen ist immer ein für *baz* wildtypisches Allel vorhanden. Daher wird die Verteilung des maternal exprimierten Baz-Proteins in allen untersuchten mutanten *baz*-Allelen vermutlich, wie Tanentzapf & Tepass (2002) das für das *baz*<sup>*Xi106*</sup>-Allel beschrieben haben, ähnlich sein. So werden die Unterschiede in der Baz-Verteilung in den jeweiligen mutanten *baz*-Allelen vermutlich an der unterschiedlichen Sequenz der mutanten Baz-Proteine liegen, die dadurch unterschiedliche Phänotypen aufweisen können. Unter dieser Annahme zeigte sich, dass die Verteilung der jeweiligen mutanten Baz-Proteine in den *baz*<sup>-</sup>-Allelen mit den Ergebnissen, die aus den Sequenzdaten gewonnen werden konnten, korreliert. Bei den mutanten *baz*-Allelen, *baz*<sup>*815-8*</sup>, *baz*<sup>*Xi106*</sup>, *baz*<sup>*EH747*</sup> und *baz*<sup>*XK75*</sup> (ohne Sequenzdaten), in denen das jeweilige mutante Baz-Protein ab spätestens Stadium 9 keine wildtypische Verteilung mehr an der apikalen Plasmamembran von Epidermiszellen aufwies, wurde anhand der Ergebnisse der Sequenzierung sichtbar, dass es sich, aufgrund von Stop-Codons,

nur um kleinere Baz-Fragmente handelte, die jeweils den N-Terminus und eine unterschiedliche Anzahl weiterer AS enthielten.

In dem Allel  $baz^{EH171}$  konnte die subzelluläre Verteilung des mutanten Proteins nicht untersucht werden, da die entsprechende Färbung nicht richtig funktionierte. In der Doktorarbeit von Ute Kuchinke (1998) wurde dieses Allel als ein schwaches Allel beschrieben. Die Sequenzierung der genomischen DNA ergab, dass in diesem Allel die AS 1231-1234 unter Erhaltung des Leserasters deletiert sind. Bei dem mutanten  $\Delta 1026-1464$  Baz-Konstrukt war keine deutliche FLAG-Färbung zu erkennen. So liegt es im Bereich des Möglichen, dass die Region ab AS 1231 oder bereits ab AS 1026 nicht für die Lokalisierung von Baz an der Membran benötigt wurde. Daraus könnte abgeleitet werden, dass das mutante  $Baz^{EH171}$ -Protein apikal an der Plasmamembran in Epidermiszellen vorlag und somit keine Unterscheidung zu einem Embryo, der über eine wildtypische Kopie verfügte, gemacht werden konnte.

Da bei  $baz^{XR11}$  keine Polymorphismen gefunden wurden, könnte es sich bei diesem Allel eventuell um eine vollständige oder teilweise Deletion des Gens oder um eine Mutation in einem Regulationselement, z. B. dem Promotor oder einem Enhancer, handeln. In der Doktorarbeit von Ute Kuchinke (1998) wurde anhand der Southern Blot Methode die genomische DNA des durch Röntgenstrahlen induzierten  $baz^{XR11}$ -Allels auf das Auftreten von RFLPs (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) hin untersucht. Die Analyse ergab, dass in diesem Allel eine ca. 25 kb große Inversion vorliegen könnte, die den Bereich der letzten drei Exons beinhaltet. Eine Inversion ist mit Hilfe der Sequenzierung nur zu erkennen, wenn sich der Bruchpunkt im sequenzierten Bereich befindet. Somit bleibt offen, welche Art von Mutation im  $baz^{XR11}$ -Allel vorliegt. Sollte es sich tatsächlich um eine Inversion im Bereich der letzten drei Exons handeln, so würde das bedeuten, dass durch die Inversion die C-terminalen AS 907-1464 eliminiert würden. Dieser Bereich beginnt kurz vor der DaPKC-Binde- und potentiellen Phosphorylierungsstelle CR3. In für  $baz^{XR11}$  hemizygot mutanten Embryonen war Baz noch bis ca. Stadium 13 im apikalen Kortex der Epidermiszellen zu detektieren. Erst ab Stadium 14-15 war das Baz Protein in Antikörperfärbungen nicht mehr detektierbar.

Insgesamt konnte bei keinem mutanten  $baz$ -Allel anhand der Antikörperfärbungen entschieden werden, ob das jeweilige mutante Baz-Protein zwar vorhanden, aber delokalisiert, oder vollständig verschwunden war. In der Doktorarbeit von Ute Kuchinke (1998) wurde gezeigt, dass einige hemizygote  $baz^{Xi106}$ -Embryonen eine zytoplasmatische Verteilung von Baz aufwiesen, während in anderen Embryonen kein Baz-Protein nachweisbar war. Bei der Betrachtung der Sequenzdaten zeigte sich, dass alle hier untersuchten mutanten Baz-Proteine

eine vollständige oder teilweise Deletion des C-terminalen Bereichs aufweisen. Basierend auf der in dieser Arbeit nachgewiesenen Funktion des C-terminalen Bereichs für die Lokalisation von Baz im Zytokortex wäre eine diffuse, zytoplasmatische Verteilung der entsprechenden mutanten Proteine zu erwarten. Da die C-terminalen Deletionen jedoch in mehreren Allelen sehr ausgedehnt sind, ist auch eine vollständige Destabilisierung der jeweiligen mutanten Proteine nicht unwahrscheinlich. Diese Frage sollte sich verhältnismäßig leicht durch Western Blots von hemizygot mutanten Embryonen klären lassen.

Kutikula-Präparate von abgestorbenen Embryonen zeigten folgende Reihung der *baz*<sup>-</sup>-Allele anhand der Stärke ihrer Phänotypen, die mit dem schwächsten Allel anfängt und mit dem stärksten Allel aufhört: *baz*<sup>EH171</sup> < *baz*<sup>XR11</sup> < *baz*<sup>Xi106</sup> < *baz*<sup>815-8</sup> < *baz*<sup>EH747</sup> < *baz*<sup>XK75</sup>.

Wie oben bereits erwähnt, korrelierte die Verteilung der jeweiligen mutanten Baz-Proteine in den *baz*<sup>-</sup>-Allelen mit den Ergebnissen, die aus den Sequenzdaten gewonnen werden konnten.

Die anhand von diesen Ergebnissen aufgestellte Reihung der *baz*<sup>-</sup>-Allele, entspricht im Wesentlichen der Reihung der *baz*<sup>-</sup>-Allele, die anhand der Stärke der Kutikula-Phänotypen aufgestellt wurde.

#### 4.6 Rettung des kutikulären *baz*<sup>XR11</sup>- und des *baz*<sup>815-8</sup>-Phänotyps

Wurden von den abgestorbenen Embryonen der Rettungskreuzungen Kutikula-Präparate hergestellt, so zeigte sich, dass sowohl Rettungen, als auch Verschlechterungen in einem phänotypischen kutikulären Merkmal vorkamen. Tendenziell zeigten sich dann Verschlechterungen, d. h. die Zahl der Embryonen, die das entsprechende phänotypische Merkmal aufwiesen, erhöhte sich, wenn UAS-*baz*-Effektorlinien verwendet wurden, denen Teile des C-terminalen Bereichs (AS 738-1464) von Bazooka fehlten oder, wenn in der DaPKC-Binde- und potentiellen Phosphorylierungsstelle eine AS ausgetauscht worden war. Bei der Betrachtung der kutikulären phänotypischen Merkmale konnte festgehalten werden, dass der embryonal unstrukturierte Phänotyp mit Resten zusammenhängender Kutikula sowie auch die reduzierte Körpergröße in den meisten Fällen gerettet wurde. Weniger häufig wurden der variable zygotische Phänotyp und die Defekte in der Segmentierung gerettet. Vier UAS-*baz*-Effektorlinien retteten Defekte im Kopfskelett und / oder in den Spirakeln. In den wenigsten Fällen wurden Embryonen gefunden, bei denen die für *baz*-Mutanten typischen Löcher in der Epidermis gerettet wurden. Die An- oder Abwesenheit einer Domäne wirkte sich nicht nur auf die Ausprägung eines Merkmals sondern auf mehrere aus. Somit können, in Bezug auf die Domänen von Baz, keine aussagekräftigen Schlüsse gezogen werden.

## 4.7 Die Rettung des hemizygot letalen $baz^{XR11}$ - und des $baz^{815-8}$ -Phänotyps bis hin zur adulten Fliege

Die Expression des Transgen-kodierten, mit einem N-terminalen FLAG-Epitop versehenen full-length Baz-Proteins führte zur vollständigen Rettung des hemizygot letalen  $baz^{XR11}$ - und des  $baz^{815-8}$ -Phänotyps bis hin zur adulten Fliege (Kuchinke et al., 1998; diese Arbeit).

Ein Ziel der Struktur- und Funktionsanalyse von Baz war die Untersuchung, welche Bereiche oder Domänen von Baz für die Rettung des hemizygot letalen  $baz^{XR11}$ - und des  $baz^{815-8}$ -Phänotyps bis hin zur adulten Fliege entbehrlich oder erforderlich waren.

Hierbei zeigte sich, dass der Austausch der AS Serin 982 in Alanin 982 keinen Einfluss auf die Rettung des hemizygot letalen  $baz^{XR11}$ - und des  $baz^{815-8}$ -Phänotyps bis hin zur adulten Fliege hatte.

Ebenso nicht notwendig für die Rettung der beiden verwendeten  $baz$ -Allele war die dritte PDZ-Domäne von Baz. Das Ergebnis überraschte, da das mutante Transgen-kodierte  $\Delta PDZ3$  Baz-Protein in einem  $baz^{XR11}$ -mutanten Hintergrund nicht wie im Wildtyp apikal an der Plasmamembran lokalisiert wurde.

Das Konstrukt mit einer Deletion der ersten und zweiten PDZ-Domäne war in der Lage, eine Rettung des  $baz^{815-8}$ -Allels bis zum Puppenstadium zu gewährleisten. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis wurde eine wildtypische Lokalisierung des Baz  $\Delta PDZ1-2$  Proteins an der apikalen Plasmamembran der Epidermiszellen in einem  $baz^{XR11}$ -mutanten Hintergrund beobachtet.

Bei den mutanten  $baz$ -Allelen  $baz^{Xi106}$ ,  $baz^{EH747}$  und  $baz^{XK75}$  zeigte sich selbst mit dem full-length Baz-Konstrukt keine Rettung des jeweiligen hemizygot letalen  $baz$ -Phänotyps bis hin zur adulten Fliege. Möglicherweise befinden sich auf den entsprechenden Chromosomen weitere Letalmutationen, die durch das Transgen-kodierte Baz-Protein nicht komplementiert werden können. Um die Rettung dieser Allele zu testen, müssten durch Auskreuzen und meiotische Rekombination Chromosomen erzeugt werden die außer für das mutante  $baz$ -Allel vollständig wildtypisch wären. Für  $baz^{EH171}$  konnte erst gar kein Grundstamm erzeugt werden, was wahrscheinlich ebenfalls auf die Anwesenheit weiterer Mutationen auf diesem Chromosom zurückzuführen ist.

## 4.8 Erzeugung dominanter Phänotypen durch Überexpression von Baz während der Augenentwicklung

Im Rahmen einer Struktur- und Funktionsanalyse kann die Funktionalität einer mutanten Protein-Version anhand der Analyse seiner subzellulären Lokalisation und durch sein Vermögen, die loss-of-function-Mutation in dem Gen retten zu können, untersucht werden. Sie kann darüber hinaus auch durch die Fähigkeit der mutanten Protein-Version, einen dominanten Phänotyp durch Überexpression induzieren zu können (gain-of-function-Experiment), analysiert werden.

In Analogie zu weiteren bekannten Proteinen mit PDZ-Domänen ist anzunehmen, dass Baz eine Funktion als Gerüstprotein ausübt, sowohl in der Kontrolle der Zellpolarität als auch in der asymmetrischen Teilung von NB. Proteine mit PDZ-Domänen sind meist am Aufbau von Multiproteinkomplexen beteiligt, deren Funktion oft darin besteht, mehrere Komponenten eines Signalweges zusammenzubringen und eine räumliche Kompartimentierung der Signaltransduktion zu gewährleisten. PDZ-Domänen ermöglichen es, an spezifische Zielproteine zu binden oder ein verzweigtes Netzwerk durch Oligomerisierung zu bilden. Damit Baz seine Funktion als Gerüstprotein ausüben kann, bedarf es einer starken Regulierung. So könnte vermutet werden, dass die Überexpression eines stark regulierten Proteins zu einer Zugewinnmutation führen könnte, dass also das Gen aktiver ist, als das Wildtypallel. Solche gain-of-function-Allele sind zwangsläufig dominant gegenüber dem Wildtypallel. So wäre eine Überlegung, dass die Überexpression von Baz die normale Funktion von Baz in der Signaltransduktion stören könnte, indem Komponenten des Signaltransduktionsweges an Baz binden können und dadurch wegtitriert werden. Zudem könnte es auch möglich sein, dass der Zusammenbau des PAR/aPKC-Komplexes an ektopischen Orten erfolgt. Ein Gewebe, das im *Drosophila*-System routinemäßig genutzt wird, um einen dominanten Überexpressionsphänotyp zu detektieren, ist das adulte Auge.

Durch den von Simon et al. (1991) erstmalig eingeführten 'Screen' nach Mutationen, bei denen die Wirksamkeit des Tyrosin-Kinase (Produkt des *sevenless* Gens) - Signaltransduktionsweges vermindert wurde, konnten verschiedene Komponenten (z. B. das Produkt des *ras* Gens) gefunden werden, die im Wildtyp für den Signalweg von *sevenless* notwendig waren (Simon et al., 1991). Weiterhin wurde diese Methode erfolgreich angewendet, um Genprodukte anderer Signaltransduktionswege zu erhalten, wie das z. B. bei DIAP1/2 der Fall war (Hay et al., 1995).

Nahezu jeder Signaltransduktionsweg, der in der Entwicklung von *Drosophila*-Embryonen involviert ist, besitzt auch eine Funktion in der Augenentwicklung.

In dieser Arbeit stellte sich heraus, dass die Überexpression des full-length Baz-Proteins die Augenentwicklung von *Drosophila* so beeinträchtigte, dass ein dominanter morphologischer Phänotyp festgestellt wurde. Dies konnte an Veränderungen der hoch geordneten Struktur des Auges ausgemacht werden (Stereomikroskop/REM). Diese Methode ermöglichte es, sämtliche in dieser Arbeit beschriebenen mutanten Versionen von Baz auf Modifikationen des Augenphänotyps hin zu 'screenen'. Der dominante morphologische Phänotyp im Auge, der durch die mutanten Transgen-kodierten Baz-Proteine verursacht wurde, zeichnete sich durch zwei phänotypische Hauptmerkmale aus. Einerseits waren Defekte in den Borsten festzustellen, d. h. die Orientierung der Borsten änderte sich, es fehlten Borsten oder die Zahl der Borsten erhöhte sich durch Verdopplung und Verdreifachung. Andererseits zeigte sich eine Beeinträchtigung der Ommatidien-Morphologie, d. h. zwei oder mehr Ommatidien verschmolzen miteinander, die Ommatidien traten aus der Oberfläche hervor und das wildtypische hexagonale Muster der Linsen änderte sich.

Bei der Auswertung der durch die jeweiligen mutanten Baz-Versionen erzeugten dominanten morphologischen Phänotypen stellte sich heraus, dass die hierbei erzielten Ergebnisse sehr gut mit denen der subzellulären Lokalisation der mutanten Baz-Proteine *in vivo* korrelierten. Das bedeutet, die mutanten Transgen-kodierten Baz-Proteine, die apikal an der Plasmamembran in embryonalen Epidermiszellen sowie in Follikelzellen oder am apikalen Zytokortex in NB lokalisiert waren, erzeugten einen starken dominanten morphologischen Phänotyp im Auge. Hierbei fiel besonders auf, dass die drei mutanten  $\Delta N$ ,  $\Delta PDZ1$  und  $\Delta PDZ1-2$  Baz-Proteine einen stärkeren mutanten dominanten morphologischen Phänotyp aufwiesen, als das full-length Baz-Protein. Daraus könnte geschlossen werden, dass die deletierten Regionen in diesen Baz-Versionen regulatorische Funktionen innehaben, die nicht für die Lokalisierung von Baz notwendig sind, sondern vielmehr seine biologische Aktivität regulieren. Des Weiteren zeigten die mutanten Baz-Proteine, die ein punktuelltes Muster sowohl in Epithelien, als auch in NB aufwiesen, keinen, oder nur einen schwachen dominanten morphologischen Phänotyp im adulten Auge. Bei dem  $\Delta PDZ2$  Baz-Protein konnten darüber hinaus auch Augen mit einem stärkeren dominanten Phänotyp gefunden werden. Die Baz-Konstrukte, die die C-terminale Domäne von Baz (AS 738-1464) enthalten, erzeugten also meist bei ihrer *GMR-GAL4* abhängigen Überexpression einen dominanten morphologischen Phänotyp. Erst die zusätzliche Deletion der dritten PDZ-Domäne konnte den vermutlich vom C-terminalen Bereich (AS 738-1464) verursachten dominanten morphologischen Phänotyp in Bezug auf die

Defekte in der Morphologie der Ommatidien stark abschwächen oder vollständig beheben. Somit kommt der dritten PDZ-Domäne bei der Erzeugung des dominanten morphologischen Augenphänotyps eine wichtige Rolle zu. Um festzustellen, ob die AS 738-1464 allein den Bereich von Baz darstellen, der bei der Überexpression den dominanten morphologischen Phänotyp induzieren kann, müsste ein Baz-Konstrukt hergestellt werden, das nur diese C-terminal gelegenen AS 738-1464 enthält.

Die mutanten Baz-Proteine, die in den embryonalen und follikulären Epithelien und ebenso in den NB vollständig diffus im Zytoplasma lokalisiert waren, zeigten keine Aktivität in diesem Überexpressionsassay. Dies bedeutet, dass die C-terminalen AS 738-1464 essentiell für die Lokalisierung von Baz an der Membran in Epithelzellen und in NB sind sowie für seine biologische Aktivität bei der Überexpression im Auge.

Diese Ergebnisse lassen allerdings keine Rückschlüsse zu, ob Baz, bzw. die verschiedenen Domänen von Baz überhaupt eine Funktion in der Augenentwicklung im Wildtyp haben. Um diese Frage zu klären, müssten Klone von loss-of-function-*baz*-Allelen während der Augenentwicklung induziert und phänotypisch analysiert werden.

## 5 Zusammenfassung

Die Etablierung und Aufrechterhaltung der Polarität ist von elementarer Bedeutung für die Funktion der Epithelien und von neuronalen Zellen. Bazooka (Baz), das *Drosophila* Homolog von *C. elegans* PAR-3, ist für die Etablierung der apikobasalen Polarität in Epithelien und Neuroblasten, den Stammzellen des ZNS, notwendig. In den Epithelien lokalisiert Baz apikal an der Plasmamembran und in den Neuroblasten (NB) apikal am Zytokortex, wo es für die asymmetrische Lokalisierung von Zellschicksalsdeterminanten und für eine korrekte Orientierung der mitotischen Spindel erforderlich ist.

Baz, eine Komponente des evolutionär konservierten PAR/aPKC-Komplexes, enthält 3 PDZ-Domänen (CR2), konservierte N-terminale AS 1-83 (CR1), eine DaPKC-Binde- und potentielle Phosphorylierungsstelle (CR3) und ein nicht konserviertes potentielles PDZ-Bindemotiv.

Bei den PDZ-Domänen handelt es sich um Protein-Protein-Interaktionsmodule, die vermuten lassen, dass Bazooka eine Funktion als Gerüstprotein, sowohl in der Kontrolle der Zellpolarität, als auch in der asymmetrischen Teilung von Neuroblasten, ausübt. In dieser Arbeit wurde mit einer Struktur- und Funktionsanalyse der Frage nachgegangen, welche Aufgaben den einzelnen konservierten und nicht konservierten Bereichen und Domänen von Baz für seine Funktion und Lokalisation zugeordnet werden konnten. Hierzu wurden Transgen-kodierte mutante Baz-Proteine und das full-length Baz-Protein in einem für *baz* wildtypischen und mutanten Hintergrund auf ihre subzelluläre Lokalisation und Funktion hin untersucht. Des Weiteren wurden verschiedene mutante *baz*-Allele, die durch Röntgenstrahlung oder durch EMS-Mutagenese entstanden waren, analysiert und sequenziert. Rettungsexperimente gaben Aufschluss darüber, welcher Bereich ausreicht, den loss-of-function-Phänotyp von Bazooka zu retten. Die Erzeugung eines dominant morphologischen Phänotyps durch die Überexpression von Transgen-kodierten Proteinen im Auge von *Drosophila* stellte eine bewährte Methode dar, durch eine willkürlich festgelegte Funktionalität, die mutanten Baz-Proteine vergleichen zu können. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die C-terminalen AS 738-1464, insbesondere die DaPKC-Binde- und potentielle Phosphorylierungsstelle, für die Lokalisierung von Baz an der Plasmamembran in embryonalen Epithelien und Follikelzellen sowie am apikalen Zytokortex von NB notwendig waren. Es stellte sich heraus, dass die erste PDZ-Domäne für die Verankerung an der Plasmamembran von Epithelzellen und am Zytokortex von NB entbehrlich war. Die N-terminalen AS 1-290, die die Oligomerisierungsdomäne enthalten, waren in embryonalen

Epithelzellen der Epidermis und in NB für die Verankerung von Baz am Zytokortex gleichermaßen nicht relevant. In follikulären Epithelzellen hingegen waren sie für die Polarisierung von Baz an der Membran unerlässlich. Die zweite und dritte PDZ-Domäne waren ebenfalls für die Polarisierung von Baz wichtig. Um den hemizygot letalen *baz<sup>XR11</sup>*- und *baz<sup>815-8</sup>*-Phänotyp bis hin zur adulten Fliege zu retten, zeigte sich, dass die AS S982 in der DaPKC-Binde- und potentiellen Phosphorylierungsstelle, wenn sie nicht mehr phosphoryliert werden konnte, keinen Einfluss auf die Rettung des *baz* mutanten Phänotyps hatte. Auch die dritte PDZ-Domäne war für die Rettung nicht weiter erforderlich. Die beiden ersten Domänen zeigten in dieser Untersuchung, dass sie zumindest bis zum Puppenstadium entbehrlich waren. Die Expression des Transgen-kodierten full-length Baz-Proteins führte zur vollständigen Rettung des hemizygot letalen *baz<sup>XR11</sup>*- und des *baz<sup>815-8</sup>*-Phänotyps bis hin zur adulten Fliege.

## 6 Literatur

- Albertson, R. & Doe, C. Q.** (2003). Dlg, Scrib and Lgl regulate neuroblast cell size and mitotic spindle asymmetry. *Nature Cell Biol.* **5**, 166-170.
- Bachmann, A., Schneider, M., Theilenberg, E., Grawe, F. & Knust, E.** (2001). *Drosophila* Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity. *Nature* **414**, 638-643.
- Baker, N. E. Yu, S. & Han, D.** (1996). Evolution of proneural Axonal expression during distinct regulatory phases in the developing *Drosophila* eye. *Curr. Biol.* **6**, 1290-1301.
- Bellaiche, Y., Radovic, A., Woods, D. F., Hough, C. D., Parmentier, M. L., O'Kane, C. J., Bryant, P. J. & Schweisguth, F.** (2001). The Partner of Inscuteable / Discs-large complex is required to establish planar polarity during asymmetric cell division in *Drosophila*. *Cell* **106**, 355-366.
- Benton, R., Palacios, I. M. & St. Johnston, D.** (2002). *Drosophila* 14-3-3/PAR-5 is an essential mediator of PAR-1 function in axis formation. *Dev. Cell* **3**, 659-671.
- Benton, R., & St. Johnston, D.** (2003a). A conserved oligomerization domain in *Drosophila* Bazooka/PAR-3 is important for apical localization and epithelial polarity. *Curr. Biol.* **13**, 1330-1334.
- Benton, R., & St. Johnston, D.** (2003b). *Drosophila* PAR-1 and 14-3-3 inhibit Bazooka/PAR-3 to establish complementary cortical domains in polarized cells. *Cell* **115**, 691-704.
- Betschinger, J., Mechtler, K. & Knoblich, J. A.** (2003). The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl. *Nature* **422**, 326-330.
- Betschinger, J. & Knoblich, J. A.** (2004). Dare to be different: Asymmetric cell division in *Drosophila*, *C. elegans* and vertebrates. *Curr. Biol.* **14**, R674-R685.
- Betschinger, J., Eisenhaber, F. & Knoblich, J. A.** (2005). Phosphorylation-induced autoinhibition regulates the cytoskeletal protein Lethal (2) giant larvae. *Curr. Biol.* **15**, 276-282.
- Bilder, D., Schober, M. & Perrimon, N.** (2003). Integrated activity of PDZ protein complexes regulates epithelial polarity. *Nature* **5**, 53-58.
- Böhm, H., Brinkmann, V., Drab, M., Henske, A. & Kurzchalia, T. V.** (1997). Mammalian homologues of *C. elegans* PAR-1 are symmetrically localized in epithelial cells and may influence their polarity. *Curr. Biol.* **7**, 603-606.
- Bossing, T., Udolph, G., Doe, C. Q. & Technau, G. M.** (1996). The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. I. Neuroblast lineages derived from the ventral half of the neuroectoderm. *Dev. Biol.* **179**, 41-64.

- Boyd, L., Guo, S., Levitan, D., Stinchcomb, D. T. & Kemphues, K. J.** (1996). PAR-2 is asymmetrically distributed and promotes association of P granules and PAR-1 with the cortex in *C. elegans* embryos. *Dev.* **122**, 3075-3084.
- Brand, A. H. und Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Dev.* **118**, 401-15.
- Brown, N. H., Gregory, S. L. & Martin-Bermudo, M. D.** (2000). Integrins as mediators of morphogenesis in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **223**, 1-16.
- Bryant, P. J.** (1997). Junction genetics. *Dev. Genet.* **20**, 75-90.
- Cagan, R. L. & Ready, D. F.** (1989). The emergence of order in the *Drosophila* pupal retina. *Dev. Biol.* **136**, 346-362.
- Campos-Ortega, J.A.** (1993). Early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. In: Bate, M., Martinez-Arias, A. (Eds.), The development of *Drosophila melanogaster*, vol. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1091-1129.
- Campos-Ortega, J. A. and Hartenstein, V.** (1997). The embryonic development of *Drosophila melanogaster*, 2<sup>nd</sup> Edition (Springer, Berlin).
- Chen, X. & Macara, I. G.** (2005). Par-3 controls tight junction assembly through the Rac exchange factor Tiam1. *Nature Cell Biology* **7**, 262-269.
- Cox, R. T., Kirkpatrick, C., & Mark Pfeifer** (1996a). Armadillo is required for adherens junction assembly, cell polarity and morphogenesis during *Drosophila* embryogenesis. *The Journal of Cell Biol.* **134**, 133-148.
- Cox, D. N., Lu, B., Sun, T. Q., Williams, L. T. & Jan, Y. N.** (2001b). *Drosophila par-1* is required for oocyte differentiation and microtubule organization. *Curr. Biol.* **11**, 75-87.
- Cox, D. N., Abdelilah-Seyfried, S., Jan, L. Y. & Jan, Y. N.** (2001c). Bazooka and atypical protein kinase C are required to regulate oocyte differentiation in the *Drosophila* ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**, 14475-14480.
- Cuenca, A. A., Schetter, A., Aceto, D., Kemphues, K. & Seydoux, G.** (2003). Polarization of the *C. elegans* zygote proceeds via distinct establishment and maintenance phases. *Dev.* **130**, 1255-1265.
- de Arcangelis, A. & Georges-Labouehesse, E.** (2000). Integrin and ECM functions: roles in vertebrate development. *Trends Genet.* **16**, 389-395.
- Deng, Wu-Min, Schneider, M., Frock, R., Castillejo-Lopez, C., Gaman, E. A., Baumgartner, S. & Ruohola-Baker, H.** (2003). Dystroglycan is required for polarizing the epithelial cells and the oocyte in *Drosophila*. *Dev.* **130**, 173-184.
- Doe, C., Q. & Bowermann, B.** (2001). Asymmetric cell Division: fly neuroblast meets worm zygote. *Curr. Opinion in Cell Biol.* **13**, 68-75.

- Doerflinger, H., Benton, R., Shulman, J. M. & St Johnston, D.** (2003). The role of PAR-1 in regulating the polarised microtubule cytoskeleton in the *Drosophila* follicular epithelium. *Dev.* **134**, 133-148.
- Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W. J. & Weis, W. I.** (2005).  $\alpha$ -Catenin is a molecular switch that binds E-Cadherin- $\beta$ -Catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* **123**, 903-915.
- Drubin, D. G. & Nelson, W. J.** (1996). Origins of cell polarity. *Cell* **84**, 335-344.
- Eaton, S. & Simons, K.** (1995). Apical, basal, and lateral cues for epithelial polarization. *Cell* **82**, 5-8.
- Eberl, D. F. & Hilliker, A. J.** (1988). Characterization of X-linked recessive lethal mutations affecting embryonic morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **118**, 109-120.
- Egger-Adam, Diane** (2005). Identifikation neuer Interaktionspartner des Bazooka Proteins in *Drosophila melanogaster*. Inaugural-Dissertation. Düsseldorf.
- Etemad-Moghadam, B., Guo, S. & Kempfues, K. J.** (1995). Asymmetrically distributed PAR-3 Protein contributes to cell polarity and spindle alignment in early *C. elegans* embryos. *Cell* **83**, 743-752.
- Fischer, N.** (2001). Struktur-Funktions-Analyse des Bazooka Proteins aus *Drosophila*. Diplomarbeit. Düsseldorf.
- Fu, H., Subramanian, R. R. & Masters, S. C.** (2000). 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 617-647.
- Fuse, N., Hisata, K., Katzen, A. L. & Matsuzaki, F.** (2003). Heterotrimeric G proteins regulate daughter cell size asymmetry in *Drosophila* neuroblast divisions. *Curr. Biol.* **13**, 947-954.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S. & Tsukita, S.** (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* **123**, 1777-1788.
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiiragi, T., Fujimoto, K. & 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**, 1539-1550.
- Garrard, S. M., Capaldo, C. T., Gao, L., Rosen, M. K., Macara, I. G. & Tomchick, D. R.** (2003). Structure of Cdc42 in a complex with the GTPase-binding domain of the cell polarity protein, Par6. *EMBO Journal* **22**, 1125-1133.
- Goldstein, B. & Hird, S.N.** (1996). Specification of the anteroposterior axis in *Caenorhabditis elegans*. *Dev.* **122**, 1467-1474.
- Goodman, C.S., Doe, C.Q.** (1993). Embryonic development of *Drosophila* central nervous system. In: Bate, M., Martinez-Arias, A. (Ed.), *The development of Drosophila melanogaster*, vol. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1131-1206.

- Gotta, M., Abraham, M. C. & Ahringer, J.** (2001). CDC-42 controls early cell polarity and spindle orientation in *C. elegans*. *Curr. Biol.* **11**, 482-488.
- Grawe, F., Wodarz, A., Lee, B., Knust, E. & Skaer, H.** (1996). The *Drosophila* genes *crumbs* and *stardust* are involved in the biogenesis of adherens junctions. *Dev.* **122**, 951-959.
- Grzeschik, Nicola** (2003). Suche nach funktionellen Interaktionspartnern von *crumbs* mit Hilfe eines *crumbs*-induzierten rauhen Augenphänotyps. Inaugural-Dissertation. Düsseldorf.
- Gumbiner, B. M.** (1996). Cell adhesion: The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**, 345-357.
- Guo, S. & Kemphues, K. J.** (1995). *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr Kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* **81**, 611-620.
- Hao, Y., Boyd, L. & Seydoux, G.** (2006). Stabilization of cell polarity by the *C. elegans* RING protein PAR-2. *Dev. Cell* **10**, 199-208.
- Harris, B. & Lim, W. A.** (2001). Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J. Cell Science* **114**, 3219-3231.
- Harris, T. J. C. & Pfeifer, M.** (2004). Adherens junction-dependent and -independent steps in the establishment of epithelial cell polarity in *Drosophila*. *J. Cell Biology* **167**, 135-147.
- Harris, T. J. C. & Pfeifer, M.** (2005). The positioning and segregation of apical cues during epithelial polarity establishment in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* **170**, 813-823.
- Harrison, S. C.** (1996). Peptide-surface association: the case of PDZ and PTB domains. *Cell* **86**, 341-343.
- Hay, B. A., Wassarman, D. A. & Rubin, G. M.** (1995). *Drosophila* homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death. *Cell* **83**, 1253-1262.
- 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.
- Horvitz, H. R., & Herskowitz, I.** (1992). Mechanisms of asymmetric cell division: two Bs or not two Bs, that is the question. *Cell* **68**, 237-255.
- Hung, T. J. & Kemphues, K. J.** (1999). PAR-6 is a conserved PDZ domain-containing protein that colocalizes with PAR-3 in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Dev.* **126**, 127-135.
- Hunter, C. & Wieschaus, E.** (2000). Regulated expression of *nullo* is required for the formation of distinct apical and basal adherens junctions in *Drosophila* blastoderm. *J. Cell Biol.* **150**, 391-401.
- Hurd, T. W., Gao, L., Roh, M. H., Macara, I. G. & 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. & Knoblich, J. A.** (2004). Sequential roles of Cdc-42, Par-6, aPKC, and Lgl in the establishment of epithelial polarity during *Drosophila* embryogenesis. *Dev. Cell* **6**, 845-854.
- Huynh, J. R., Petronczki, M. Knoblich, J. A. & St. Johnston, D.** (2001). Bazooka and PAR-6 are required with PAR-1 for the maintenance of oocyte fate in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **11**, 901-906.
- Hynes, R. O.** (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11-25.
- Izumi, Y., Hirose, T., Tamai, Y., Hirai, S., Nagashima, Y., Fujimoto, T., Tabuse, Y., Kempfues, K. J. & Ohno, S.** (1998). An atypical PKC directly associates and colocalizes at the epithelial tight junction with ASIP, a mammalian homologue of *Caenorhabditis elegans* polarity protein PAR-3. *J. Cell Biol.* **143**, 95-106.
- Izumi, Y., Ohta, N., Itoh-Furuya, A., Fuse, N., & Matsuzaki, F.** (2004). Differential functions of G protein and Baz-aPKC signaling pathways in *Drosophila* neuroblast asymmetric division. *J. Cell Biol.* **164**, 729-738.
- Joberty, G., Petersen, C., Gao, L. & Macara, I. G.** (2000). The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nature Cell Biology* **2**, 531-539.
- Johnson, K. & Wodarz, A.** (2003). A genetic hierarchy controlling cell polarity. *Nature* **5**, 12-14.
- Kaltschmidt, J. A., Davidson, C. M., Brown, N. H., Brand, A. H.** (2000). Rotation and asymmetry of the mitotic spindle direct asymmetric cell division in the developing central nervous system. *Nature Cell Biology* **2**, 7-12.
- Kempfues, K. J., Priess, J. R., Morton, D. G. & Cheng, N. S.** (1988). Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell* **52**, 311-320.
- Kempfues, K. J. & Strome, S.** (1997). Fertilization and establishment of polarity in the embryo. In *C. elegans II*. (ed. D.L. Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer and J. R. Priess) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 335-359.
- Kempkens, Özlem** (2005). Funktion und Wechselwirkungen der Crumbs und Bazooka Komplexe in Epithelien von *Drosophila melanogaster*. Inaugural-Dissertation. Düsseldorf.
- Knust, E. & Bossinger, O.** (2002). Composition and formation of intercellular junctions in epithelial cells. *Science* **298**, 1955-1959.
- Kraut, R., Chia, W., Jan, L. Y., Jan, Y. N. & Knoblich, J. A.** (1996). Role of inscuteable in orienting asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Nature* **383**, 50-55.
- Kraut, R. & Campos-Ortega, J. A.** (1996). Inscuteable, a neural precursor gene of *Drosophila*, encodes a candidate for a cytoskeleton adaptor protein. *Dev. Biol.* **174**, 65-81.

- Kuchinke, U.** (1998). Genetische und molekularbiologische Untersuchungen zur Struktur, Expression und Funktion des Gens *bazooka* von *Drosophila melanogaster*. Inaugural-Dissertation. Köln.
- 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**, 1357-1365.
- Levitani, D. J., Boyd, L., Mello, C. C., Kempfues, M. J. & Stinchcomb** (1994). *par-2*, a gene required for blastomere asymmetry in *Caenorhabditis elegans*, encodes zinc-finger and ATP-binding motifs. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* **91**, 6108-6112.
- Lin, D., Edwards, A. S., Fawcett, J. P., Mbamalu, G., Scott, J. D. & Pawson, T.** (2000). A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nature Cell Biology* **2**, 540-547.
- Lindsley, D. L. & Zimm, G. G.** (1992). The Genom of *Drosophila melanogaster*. Academic Press Inc. San Diego.
- Liu, Y., Nusrat, A., Schnell, F. J., Reaves, T. A., Walsh, S., Pochet, M. & Parkos, C. A.** (2000). Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J. Cell Sci.* **113**, 2363-2374.
- Luo, L., Liao, Y. J., Jan, L. Y. & Jan, Y. N.** (1994). Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: *Drosophila* Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Genes Dev.* **8**, 1787-1802.
- Macara, I. G.** (2004a). Par proteins: partners in polarization. *Curr. Biol.* **14**, R160-R162.
- Macara, I. G.** (2004b). Parsing the polarity code. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **5**, 220-231.
- Martin, S. G. & St. Johnston, D.** (2003). A role for *Drosophila* LKB1 in anterior-posterior axis formation and epithelial polarity. *Nature* **421**, 379-384.
- Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A., Simmons, D. & Dejana, E.** (1998). Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J. Cell Biol.* **142**, 117-127.
- Matter, K.** (2000). Epithelial polarity: Sorting out the sorters. *Curr. Biol.* **10**, R39-R42.
- McKim, K. S., Dahmus, J. B. & Hawley, R. S.** (1996). Cloning of the *Drosophila melanogaster* meiotic recombination gene *mei-218*: A genetic and molecular analysis of intervall 15E. *Genetics* **144**, 215-228.
- Mizuno, K., Suzuki, A., Hirose, T., Kitamura, K., Kutsuzawa, K., Futaki, M., Amano, Y. & Ohno, S.** (2003). Self-association of PAR-3 is important for apical localization and epithelial polarity. *The Journ. of Biol. Chem.* **278**, 31240-31250.

- Morita, K., Furuse, M., Fujimoto, K. & Tsukita, S.** (1999). Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* **96**, 511-516.
- Morton, D. G., Shakes, D. C., Nugent, S., Dichoso, D., Wang, W., Golden, A. & Kemphues, K. J.** (2002). The *Caenorhabditis elegans par-5* gene encodes a 14-3-3 protein required for cellular asymmetry in the early embryo. *Dev. Biol.* **241**, 47-58.
- Müller, H. A. J. & 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.
- Nagai-Tamai, Y., Mizuno, K., Hirose, T., Suzuki, A. & Ohno, S.** (2002). Regulated protein-protein interaction between aPKC and PAR-3 plays an essential role in the polarization of epithelial cells. *Genes Cells* **7**, 1161-1171.
- Nishimura, T., Yamaguchi, T., Kato, K., Yoshizawa, M., Nabeshima, Y., Ohno, S., Hoshino, M. & Kaibuchi, K.** (2005). PAR-6-PAR-3 mediates Cdc42-induced Rac activation through the Rac GEFs STEF/Tiam1. *Nature Cell Biol.* **7**, 270-277.
- Ohno, S.** (2001). Intercellular junctions and cellular polarity: the PAR-aPKC complex, a conserved core cassette playing fundamental roles in cell polarity. *Curr. Opinion in Cell Biol.* **13**, 641-648.
- Oshiro, T., Yagami, T., Zhang, C. & Matsuzaki, F.** (2000). Role of cortical tumour-suppressor proteins in asymmetric division of *Drosophila* neuroblast. *Nature* **408**, 593-600.
- Peng, C. Y., Manning, L., Albertson, R. & Doe, C. Q.** (2000). The tumour-suppressor genes *lgl* and *dlg* regulate basal protein targeting in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* **408**, 596-600.
- Petronczki, M. & Knoblich, J. A.** (2001). DmPAR-6 directs epithelial polarity and asymmetric cell division of neuroblasts in *Drosophila*. *Nature Cell Biol.* **3**, 43-49.
- Pinheiro, E., M. & Montell, D., J.** (2004). Requirement for Par-6 and Bazooka in *Drosophila* border cell migration. *Dev.* **131**, 5243-5251.
- Qiu, R. G., Abo, A. & Martin, S. G.** (2000). A human homolog of the *C. elegans* polarity determinant Par-6 links Rac and Cdc42 to PKC $\xi$  signaling and cell transformation. *Curr. Biol.* **10**, 697-707.
- Rolls, M. M., Albertson, R., Shih, H.-P., Lee, C.-Y. & Doe, C. Q.** (2003). *Drosophila* aPKC regulates cell polarity and cell proliferation in neuroblasts and epithelia. *J. Cell Biol.* **163**, 1089-1098.
- Schaefer, M., Shevchenko, A. & Knoblich, J. A.** (2000). A protein complex containing Inscuteable and the G $\alpha$ -binding protein Pins orients asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **10**, 353-362.

- Schaefer, M., Petronczki, M., Dorner, D., Forte, M. & Knoblich, J. A.** (2001). Heterotrimeric G proteins direct two modes of asymmetric cell division in the *Drosophila* nervous system. *Cell* **107**, 183-194.
- Schmidt, (1997).** The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. II. Neuroblast lineages derived from the dorsal part of the neuroectoderm. *Dev. Biol.* **189**, 186-204.
- Schober, M., Schaefer, M. & Knoblich, J. A.** (1999). Bazooka recruits Inscuteable to orient asymmetric cell divisions in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* **402**, 548-551.
- Shulman, J. M., Benton, R. & St Johnston, D.** (2000). The *Drosophila* homolog of *C. elegans* PAR-1 organizes the oocyte cytoskeleton and directs oskar mRNA localization to the posterior pole. *Cell* **101**, 377-388.
- Siegrist, S. E. & Doe, C. Q.** (2005). Microtubule-induced Pins/Gai cortical polarity in *Drosophila* neuroblasts. *Cell* **123**, 1323-1335.
- Simon, M. A., Bowtell, D. D., Dodson, G. S., Laverly, T. R. & Rubin, G. M.** (1991). Ras1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the sevenless protein tyrosine kinase. *Cell* **67**, 701-716.
- Simons, K.** (1995). Biogenesis of epithelial cell surface polarity. *Harvey Lect.* **89**, 125-146.
- Spradling, A. C.** (1986). P-element mediated transformation. *Drosophila*, a practical approach, 175-197. Oxford, IRL Press.
- Spradling, A. C.** (1993). Developmental genetics of oogenesis. In: The development of *Drosophila melanogaster*. (eds Bate, M. & Martinez Arias, A.), pp 1-70. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY.
- Stein, W. von, Ramrath, A., Grimm, A., Müller-Borg, M. & Wodarz, A.** (2005). Direct association of Bazooka/PAR-3 with the lipid phosphatase PTEN reveals a link between the PAR/aPKC complex and phosphoinositide signaling. *Dev.* **132**, 1675-1686.
- Suzuki, A., Yamanaka, T., Hirose, T., Manabe, N., Mizuno, K., Shimizu, M., Akimoto, K., Izumi, Y., Ohnishi, T. & Ohno, S.** (2001). Atypical protein kinase C is involved in the evolutionarily conserved par protein complex and plays a critical role in establishing epithelia-specific junctional structures. *J. Cell Biol.* **152**, 1183-1196.
- Suzuki, A., Akimoto, K. & Ohno, S.** (2003). Protein Kinase C  $\lambda/\iota$  (PKC $\lambda/\iota$ ): A PKC isotype essential for the development of multicellular organisms. *The Japanese Biochemical Society*, Tokyo **133**, 9-16.
- Suzuki, A. & Ohno, S.** (2006). The PAR-aPKC system: lessons in polarity. *Journal of Cell Science* **119**, 979-987.
- Tabuse, Y., Izumi, Y., Piano, F., Kempfues, K. J., Miwa, J. & Ohno, S.** (1998). Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Dev.* **125**, 3607-3614.

- Tanentzapf, G. & Tepass, U.** (2003). Interactions between the *crumbs*, *lethal giant larvae* and *bazooka* pathways in epithelial polarization. *Nature* **4**, 46-52.
- Tearle, R. & Nüsslein-Volhard** (1987). Tübingen mutants and stock list. *Drosophila Inf. Serv.* **66**, 209-269.
- Tepass, U.** (1997). Epithelial differentiation in *Drosophila*. *BioEssays* **19**, 673-682.
- Trotha, J. W. von, Campos-Ortega, J. A. & Reugels, A. M.** (2006). Apical localization of ASIP/PAR-3:EGFP in zebrafish neuroepithelial cells involves the oligomerization domain CR1, the PDZ domains, and the C-terminal portion of the protein. *Dev. Dynamics* **235**, 967-977.
- Watts, J. L., Etemad-Moghadam, B., Guo, S., Boyd, L., Draper, B. W., Mello, C. C., Priess, J. R. & Kemphues, K. J.** (1996). *par-6*, a gene involved in the establishment of asymmetry in early *C. elegans* embryos, mediates the asymmetric localization of PAR-3. *Dev.* **122**, 3133-3140.
- Watts, J.L., Morton, D. G., Bestman, J & Kemphues, K. J.** (2000). The *C. elegans par-4* gene encodes a putative serin-threonine kinase required for establishing embryonic asymmetry. *Dev.* **127**, 1467-1475.
- Wheeler, W. M.** (1891). Neuroblasts in the arthropod embryo. *J. Morphol.* **4**, 337-343.
- Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C. & Jürgens, G.** (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. III. Zygotic loc on the X-chromosome and the fourth chromosome. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **193**, 296-307.
- Wodarz, A.** (1993). Untersuchung zur Funktion des Gens *crumbs* bei der Entwicklung von Epithelien in *Drosophila melanogaster*. Inaugural-Dissertation. Köln.
- Wodarz, A., Ramrath, A., Grimm, A. & Knust, E.** (2000). *Drosophila* atypical protein kinase C associates with Bazooka and controls polarity of epithelia and neuroblasts. *Journal Cell Biol.* **150**, 1361-1374.
- Wodarz, A.** (2002). Establishing cell polarity in development. *Nature Cell Biol.* **4**, E39-E40.
- Wodarz, A. & Huttner, W.B.** (2003). Asymmetric cell division during neurogenesis in *Drosophila* and vertebrates. *Dev.* **120**, 1297-1309.
- Wodarz, A.** (2005). Molecular control of cell polarity and asymmetric cell division in *Drosophila* neuroblasts. *Curr. Opinion in Cell Biol.* **17**, 1-7.
- Wolff, T. & Ready, D. F.** (1991). The beginning of pattern formation in the *Drosophila* compound eye: the morphogenetic furrow and the second mitotic wave. *Dev.* **113**, 841-850.
- Woods, D. F. & 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.
- Yamada, S., Pokutta, S., Drees, F., Weis, W. I., & Nelson, W. J.** (2005). Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* **123**, 889-901.

**Yoffe, K. B. Manoukian, A. S., Wilder, E. L. Brand, A. H. & Perrimon, N.** (1995). Evidence for *engrailed*-independent *wingless* autoregulation in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **170**, 636-650.

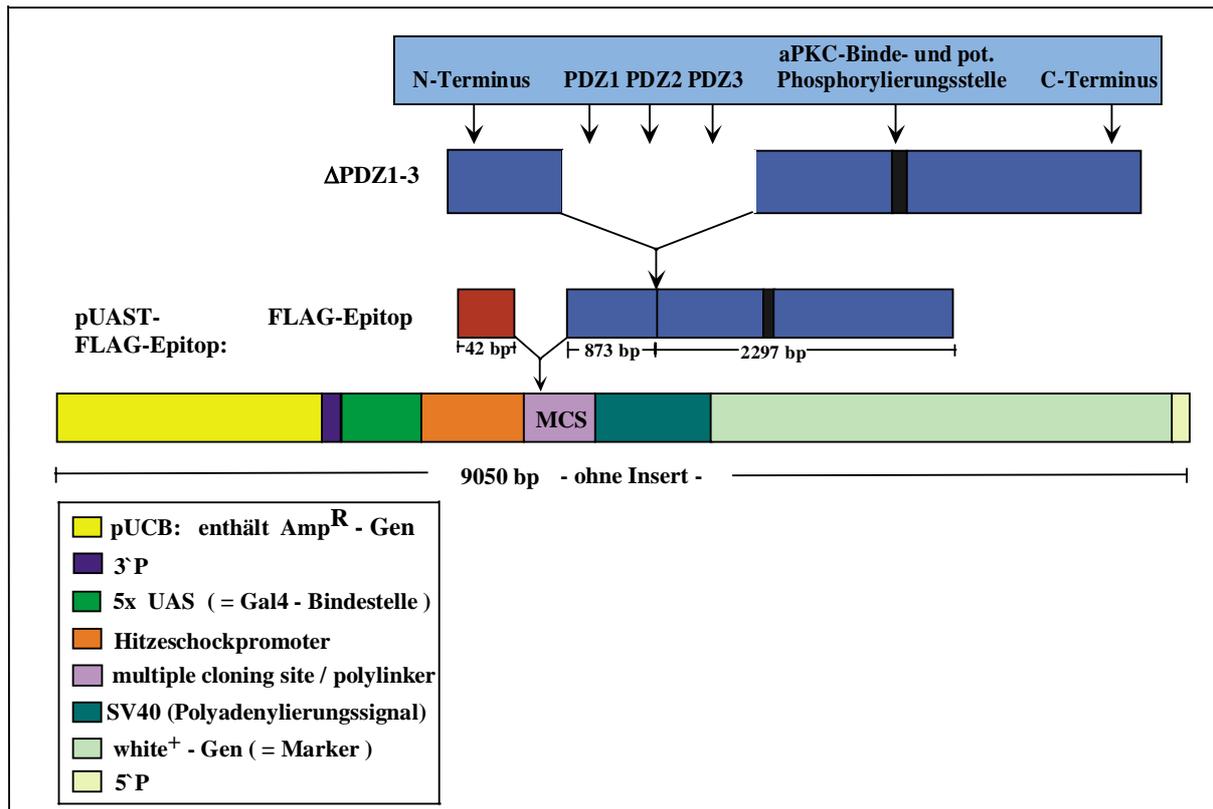
**Yu, F., Cai, Y., Kaushik, R., Yang, X., & Chia, W.** (2003). Distinct roles of G $\alpha$ i and G $\beta$ 13F subunits of the heterotrimeric G protein complex in the mediation of *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions. *J. Cell Biol.* **162**, 623-633.

## 7 Anhang

Stamm	Bemerkungen	Referenz
UAS- <i>baz</i> <sup>full</sup>	full-length - Transkript* von Baz; [N:1044-5561]	Fischer, 2001
UAS- <i>baz</i> <sup>S980AS982</sup>	full-length -Transkript* von Baz [N:1044-5561]; AS-Austausch: AS 980 S→A: [N:3981-3983 = AGC→GCC] und AS 982 S→A: [N:3987-3989 = TCT→GCT]	diese Arbeit
UAS- <i>baz</i> <sup>S980A</sup>	full-length -Transkript* von Baz [N:1044-5561]; AS-Austausch: AS 980 S→A: [N:3981-3983 = AGC→GCC]	diese Arbeit
UAS- <i>baz</i> <sup>S982</sup>	full-length -Transkript* von Baz [N:1044-5561], AS-Austausch: AS 982 S→A: [N:3987-3989 = TCT→GCT]	diese Arbeit
UAS- <i>baz</i> <sup>APDZ1</sup>	[N:1044-1916 + 2244-5561]; Deletion: AS: 292-400	Fischer, 2001
UAS- <i>baz</i> <sup>APDZ2</sup>	[N:1044-2264 + 2859-5561]; Deletion: AS: 408-605	Fischer, 2001
UAS- <i>baz</i> <sup>APDZ3</sup>	[N:1044-2687 + 3264-5561]; Deletion: AS: 549-740	Fischer, 2001
UAS- <i>baz</i> <sup>APDZ1-2</sup>	[N:1044-1916 + 2859-5561]; Deletion: AS: 292-605	Fischer, 2001; diese Arbeit
UAS- <i>baz</i> <sup>APDZ1-3</sup>	[N:1044-1916 + 3264-5561]; Deletion: AS: 292-740	Fischer, 2001
UAS- <i>baz</i> <sup>APDZ2-3</sup>	[N:1044-2264 + 3264-5561]; Deletion: AS: 408-740	Fischer, 2001; diese Arbeit
UAS- <i>baz</i> <sup>AN</sup>	[N:1914-5561]; Deletion: AS 1-290	Fischer, 2001
UAS- <i>baz</i> <sup>AC</sup>	[N:1044-3254]; Deletion: AS 738-1464	Fischer, 2001; diese Arbeit
UAS- <i>baz</i> <sup>3PDZ</sup>	[N:1914-3254]; Deletionen: AS 1-290 + AS 738-1464	Fischer, 2001; diese Arbeit
UAS- <i>baz</i> <sup>A968-996</sup>	[N:1044-3944 + 4032-5561]; Deletion: AS 968-996	diese Arbeit
UAS- <i>baz</i> <sup>A737-1019</sup>	[N:1044-3254 + 4101-5561]; Deletion: AS 737-1019	diese Arbeit
UAS- <i>baz</i> <sup>A1026-1464</sup>	[N:1044-4118]; Deletion: AS 1026-1464	diese Arbeit

### Anhang 1 Kodierender Bereich der verwendeten UAS-Effektorlinien

\*Das full-length-Transkript von Baz besitzt 1464 AS + einen kleinen Überhang an AS am C-terminalen Ende. Alle Konstrukte (Ausnahme: 3PDZ, ΔC und Δ1026-1464) besitzen den kleinen Überhang an AS, verursacht durch die Primerkonstruktion. Die genauen Angaben zu den Primern und Nukleotiden befinden sich in Tab. 2.1 (N: Nukleotid, AS: Aminosäure; N:1044 = Start von Baz; [...]: kodierender Bereich in Nukleotiden).



## Anhang 2 Exemplarische Darstellung der Herstellung von UAS-*baz*-Effektorlinien

Die Herstellung der 16 UAS-*baz*-Effektorlinien wird anhand eines Beispiels (UAS-*baz*<sup>ΔPDZ1-3</sup>) dargestellt. Der pUAST-FLAG-Epitop-Vektor ermöglicht die in-frame-Klonierung der einzelnen Konstrukte von Baz. Die Konzipierung des FLAG-Epitops wird im Material und Methodenteil (Abb. 2.1) erläutert. Für die Klonierung des FLAG-Epitops in den pUAST-Vektor (Kapitel 2.2.1.1) wurden die überhängenden Enden so gewählt, dass sie den Schnittstellen von Restriktionsenzymen entsprechen, die sich in der 'Multiple Cloning Site' (MCS) (Abb. 2.2) des pUAST-Vektors befinden. Sie mussten zudem so ausgesucht werden, dass ein anschließendes Klonieren der einzelnen Konstrukte gewährleistet war. In diesem Fall wurden die zwei Restriktionsenzyme EcoRI und NotI gewählt. Die verwendeten Primer sind im Material und Methodenteil (Tab 2.1) aufgelistet und die Konstrukte mitsamt ihrem kodierenden Bereich sind im Anhang 1 vermerkt.

Stamm	Name	Bemerkungen
<u>1.+ 3. Chromosom</u>		
<i>y w f baz</i> <sup>XR11</sup> / FM7blue <sup>ftz</sup>	<i>baz</i> <sup>XR11</sup>	Balancer FM7 wird durch FM7blue <sup>ftz</sup> ersetzt
<i>y w f baz</i> <sup>XR11</sup> / FM7blue <sup>ftz</sup> ; TM3 / TM6	<i>baz</i> <sup>XR11</sup> 36	Einkreuzung: 2 Balancer-Chromosome
<i>y w f baz</i> <sup>XR11</sup> / FM7blue <sup>ftz</sup> ; TM3 / <i>daG32</i>	<i>baz</i> <sup>XR11</sup> <i>d3</i>	Einkreuzung: <i>daG32</i> -Treiber
<i>y w f baz</i> <sup>XR11</sup> / FM7blue <sup>ftz</sup> ; <i>daG32</i> / <i>daG32</i>	<i>baz</i> <sup>XR11</sup> <i>dd</i>	<b>Ausgangsstamm für Rettungskreuzungen</b>
<i>y w f baz</i> <sup>XR11</sup> / FM7blue <sup>ftz</sup> ; TM3 / <i>arm</i> -GAL4	<i>baz</i> <sup>XR11</sup> <i>arm3</i>	Einkreuzung: <i>arm</i> -GAL4-Treiber
<i>y cv v f baz</i> <sup>815-8</sup> / FM7blue <sup>ftz</sup>	<i>baz</i> <sup>815-8</sup>	FM7 P[ <i>ftz</i> :: <i>lacZ</i> ] wird durch FM7blue <sup>ftz</sup> ersetzt

**Anhang 3 Grundstämme mit verschiedenen *baz*-Allelen**  
Legende am Ende der Tabelle.

Stamm	Name	Bemerkungen
$y\ cv\ v\ f\ baz^{815-8} / FM7blue^{ftz};$ TM3 / TM6	$baz^{815-8}36$	Einkreuzung: 2 Balancer-Chromosome
$y\ cv\ v\ f\ baz^{815-8} / FM7blue^{ftz};$ TM6 / daG32	$baz^{815-8}d6$	Einkreuzung: daG32-Treiber
$y\ cv\ v\ f\ baz^{815-8} / FM7blue^{ftz};$ <b>daG32 / daG32</b>	$baz^{815-8}dd$	<b>Ausgangsstamm für Rettungskreuzungen</b>
$y\ cv\ v\ f\ baz^{815-8} / FM7blue^{ftz};$ TM6 / arm-GAL4	$baz^{815-8}arm3$	Einkreuzung: arm-GAL4-Treiber
$y\ baz^4 / FM7blue^{ftz} =$ $y\ baz^{Xi106} / FM7blue^{ftz}$	$baz^{Xi106}$	Balancer FM7 wird durch FM7blue <sup>ftz</sup> ersetzt
$y\ baz^{Xi106} / FM7blue^{ftz};$ TM3 / TM6	$baz^{Xi106}36$	Einkreuzung: 2 Balancer-Chromosome
$y\ baz^{Xi106} / FM7blue^{ftz};$ TM3 / daG32	$baz^{Xi106}d3$	Einkreuzung: daG32-Treiber
$y\ baz^{Xi106} / FM7blue^{ftz};$ TM3 / arm-GAL4	$baz^{Xi106}arm3$	Einkreuzung: arm-GAL4-Treiber
$baz^{Xi106} FRT18D / FM7blue^{ftz}$	$baz^{Xi106}FRT$	Balancer FM7 wird durch FM7blue <sup>ftz</sup> ersetzt
$baz^{Xi106} FRT18D / FM7blue^{ftz};$ TM3 / TM6	$baz^{Xi106}FRT36$	Einkreuzung: 2 Balancer-Chromosome
$baz^{Xi106} FRT18D / FM7blue^{ftz};$ TM3/ daG32	$baz^{Xi106}FRTd3$	Einkreuzung: daG32-Treiber
$baz^{Xi106} FRT18D / FM7blue^{ftz};$ TM3/ arm-GAL4	$baz^{Xi106}FRTarm3$	Einkreuzung: arm-GAL4-Treiber
$baz^{EH747}y / FM7blue^{ftz}$	$baz^{EH747}$	Balancer FM7 wird durch FM7blue <sup>ftz</sup> ersetzt
$baz^{EH747}y / FM7blue^{ftz};$ TM3 / TM6	$baz^{EH747}36$	Einkreuzung: 2 Balancer-Chromosome
$baz^{EH747}y / FM7blue^{ftz};$ TM3 / daG32	$baz^{EH747}d3$	Einkreuzung: daG32-Treiber
$baz^{EH747}y / FM7blue^{ftz};$ TM3 / arm-GAL4	$baz^{EH747}arm3$	Einkreuzung: arm-GAL4-Treiber
$baz^{XK75} / FM7blue^{ftz}$	$baz^{XK75}$	Balancer FM7 wird durch FM7blue <sup>ftz</sup> ersetzt
$baz^{XK75} / FM7blue^{ftz};$ TM3 / TM6	$baz^{XK75}36$	Einkreuzung: 2 Balancer-Chromosome
$baz^{XK75} / FM7blue^{ftz};$ TM3 / daG32	$baz^{XK75}d3$	Einkreuzung: daG32-Treiber
$baz^{XK75} / FM7blue^{ftz};$ TM3 / arm-GAL4	$baz^{XK75}arm3$	Einkreuzung: daG32-Treiber
$baz^{EH171} / FM7blue^{ftz}$	$baz^{EH171}$	Balancer FM7 wird durch FM7blue <sup>ftz</sup> ersetzt

### Anhang 3 Grundstämme mit verschiedenen *baz*-Allelen

Die Tabelle zeigt die sukzessive Veränderung verschiedener Stämme mit unterschiedlichen *baz*-Allelen (Erläuterungen s. Kapitel 2, Tab. 2.8 - Tab. 2.10). Dadurch entstanden Grundstämme, die in Rettungsexperimenten eingesetzt wurden (farblich hervorgehoben). Zwei Grundstämme zeigten eine Rettung des hemizygot letalen *baz*-Phänotyps bis zur adulten Fliege (fett). Zur Vereinfachung werden den Stämmen in dieser Arbeit abkürzende Namen gegeben.

Parentalgeneration	Name
$y\ w\ f\ baz^{XR11} / FM7blue^{ftz}; daG32 / daG32$ X $FM7blue^{ftz} / Y; UAS-baz^{full} / UAS-baz^{full}$	XR11xfull
$y\ w\ f\ baz^{XR11} / FM7blue^{ftz}; daG32 / daG32$ X $FM7blue^{ftz} / Y; UAS-baz^{S980AS982} / UAS-baz^{S980AS982A}$	XR11xS980AS982A
$y\ w\ f\ baz^{XR11} / FM7blue^{ftz}; daG32 / daG32$ X $FM7blue^{ftz} / Y; UAS-baz^{S980A} / UAS-baz^{S980A}$	XR11xS980A
$y\ w\ f\ baz^{XR11} / FM7blue^{ftz}; daG32 / daG32$ X $FM7blue^{ftz} / Y; UAS-baz^{S982A} / UAS-baz^{S982}$	XR11xS982A
$y\ w\ f\ baz^{XR11} / FM7blue^{ftz}; daG32 / daG32$ X $FM7blue^{ftz} / Y; UAS-baz^{APDZ1} / UAS-baz^{APDZ1}$	XR11xAPDZ1
$y\ w\ f\ baz^{XR11} / FM7blue^{ftz}; daG32 / daG32$ X $FM7blue^{ftz} / Y; UAS-baz^{APDZ2} / UAS-baz^{APDZ2}$	XR11xAPDZ2
$y\ w\ f\ baz^{XR11} / FM7blue^{ftz}; daG32 / daG32$ X $FM7blue^{ftz} / Y; UAS-baz^{APDZ3} / UAS-baz^{APDZ3}$	XR11xAPDZ3
$y\ w\ f\ baz^{XR11} / FM7blue^{ftz}; daG32 / daG32$ X $FM7blue^{ftz} / Y; UAS-baz^{APDZ1-2} / UAS-baz^{APDZ1-2}$	XR11xAPDZ1-2
$y\ w\ f\ baz^{XR11} / FM7blue^{ftz}; daG32 / daG32$ X $FM7blue^{ftz} / Y; UAS-baz^{APDZ1-3} / UAS-baz^{APDZ1-3}$	XR11xAPDZ1-3
$y\ w\ f\ baz^{XR11} / FM7blue^{ftz}; daG32 / daG32$ X $FM7blue^{ftz} / Y; UAS-baz^{APDZ2-3} / UAS-baz^{APDZ2-3}$	XR11xAPDZ2-3
$y\ w\ f\ baz^{XR11} / FM7blue^{ftz}; daG32 / daG32$ X $FM7blue^{ftz} / Y; UAS-baz^{AN} / UAS-baz^{AN}$	XR11xAN
$y\ w\ f\ baz^{XR11} / FM7blue^{ftz}; daG32 / daG32$ X $FM7blue^{ftz} / Y; UAS-baz^{AC} / UAS-baz^{AC}$	XR11xAC
$y\ w\ f\ baz^{XR11} / FM7blue^{ftz}; daG32 / daG32$ X $FM7blue^{ftz} / Y; UAS-baz^{3PDZ} / UAS-baz^{3PDZ}$	XR11x3PDZ
$y\ w\ f\ baz^{XR11} / FM7blue^{ftz}; daG32 / daG32$ X $FM7blue^{ftz} / Y; UAS-baz^{A968-996} / UAS-baz^{A968-996}$	XR11xΔ968-996
$y\ w\ f\ baz^{XR11} / FM7blue^{ftz}; daG32 / daG32$ X $FM7blue^{ftz} / Y; UAS-baz^{A737-1019} / UAS-baz^{A737-1019}$	XR11xΔ737-1019
$y\ w\ f\ baz^{XR11} / FM7blue^{ftz}; daG32 / daG32$ X $FM7blue^{ftz} / Y; UAS-baz^{A1026-1464} / UAS-baz^{A1026-1464}$	XR11xΔ1026-1464

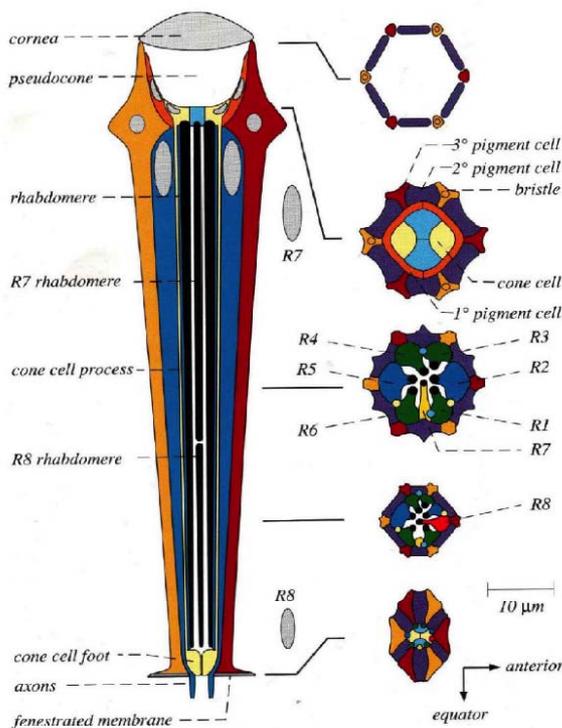
**Anhang 4 Parentalkreuzungen sämtlicher Rettungsexperimente**

Legende am Ende der Tabelle.

Parentalgeneration	Name
$y\ cv\ v\ f\ baz^{815-8} / FM7blue^{ftz}; TM6 / daG32$ X $FM7blue^{ftz} / Y; UAS-baz^{full} / UAS-baz^{full}$	815-8xfull
$y\ cv\ v\ f\ baz^{815-8} / FM7blue^{ftz}; TM6 / daG32$ X $FM7blue^{ftz} / Y; UAS-baz^{A737-1019} / UAS-baz^{A737-1019}$	815-8xΔ737-1019

#### Anhang 4 Parentalkreuzungen sämtlicher Rettungsexperimente

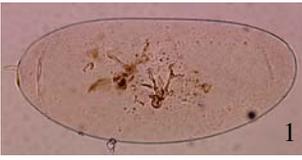
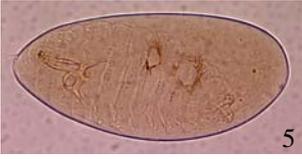
Das *Drosophila* Weibchen lag homozygot für den *daG32*-Treiber vor und das Männchen homozygot für das jeweilige *UAS-baz*-Effektorkonstrukt. Das allgemeingültige Kreuzungsschema ist in Abb. 3.12 wiedergegeben. Detaillierte Angaben zu den *UAS-baz*-Effektorkonstrukten befinden sich in Abb. 3.1, in der Tab. 3.1 und im Anhang 1 und zu den Grundstämmen im Anhang 3. Zur Vereinfachung werden den Kreuzungen in dieser Arbeit abkürzende Namen gegeben



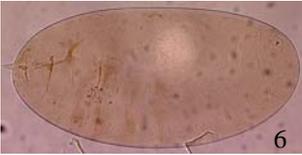
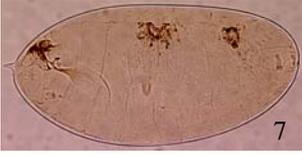
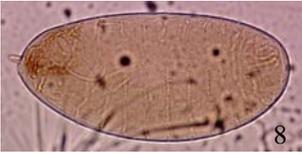
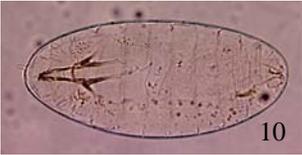
#### Anhang 5 Schematische Darstellung eines Ommatidiums von *Drosophila melanogaster*.

Links befindet sich ein einzelnes Ommatidium im Längsschnitt und rechts sieht man einzelne Querschnitte des Ommatidiums. Das Komplexauge von *Drosophila melanogaster* entwickelt sich aus der Augenimaginalscheibe, die aus dem Blastoderm entstanden ist und zu den primären Epithelien zählt. Während des Larvenstadiums vermehren sich ihre Zellen durch mitotische Teilungen, d. h. es laufen zwei Wellen mitotischer Aktivität von posterior nach anterior über die Imaginalscheibe. Zwischen den beiden Wellen läuft die morphogenetische Furche. In der ersten Welle finden nur Zellteilungen statt und in der zweiten, die direkt hinter der morphogenetischen Furche beginnt, differenzieren sich die ommatidialen Vorläuferzellen. Sie formieren sich zu Gruppen, um die Ommatidien zu bilden. Das Komplexauge setzt sich aus ungefähr 700-800 einzelnen Ommatidien zusammen, die in einem regelmäßigen Muster hexagonal angeordnet sind. Jedes Ommatidium besteht aus 8 Photorezeptorzellen, die jeweils über ein Rhabdomer (R1-R8; Reizaufnahme), 4 Semperzellen (= 'cone cells' /

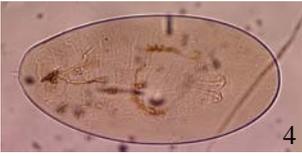
linsensezernierende Zellen) und verschiedene Pigmentzellen (primäre, sekundäre und tertiäre) verfügen. Zusätzlich zu den ommatidialen Zellen existieren noch 4 weitere Zellen pro Ommatidium, die die Borsten bilden. Jedes Ommatidium besitzt eine interommatidiale Borste (Mechanorezeptor) (entnommen: Cagan & Ready, 1989, Wolff & Ready, 1991).

Angaben in %	G ZB K SP	<i>baz<sup>XR11</sup></i>	<i>baz<sup>XR11</sup> 36</i>	<i>baz<sup>XR11</sup> d3</i>	<i>baz<sup>815-8</sup></i>	<i>baz<sup>815-8</sup> 36</i>	<i>baz<sup>815-8</sup> d6</i>	<i>baz<sup>Xi106</sup></i> FRT	<i>baz<sup>Xi106</sup></i> FRT36
Leere Hüllen*:		27,5	49,2	40,4	21,8	32,5	63,2	14,6	13,2
	1/4 0 0 0 - 1	11,4	29,0	25,4	9,7	16,8	17,9	2,9	48,5
	1/4 - - ± - 3/4 Löcher	11,3	19,4	5,1	43,2	10,1	9,3	44,3	9,1
	1/2 + - ± -3/4 Löcher	6,3	0	20,3	0	13,4	4,6	12,8	27,3
	1/2 0/- ± ± -3/4 Löcher	1,3	0	0	23,0	1,6	1,5	5,7	3,0
	1/2 ± ± ± -3/4 Löcher	3,8	0	3,4	0	2,1	3,9	2,9	0

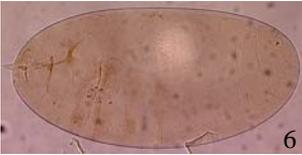
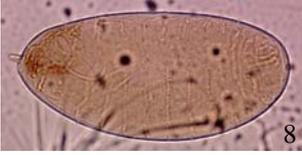
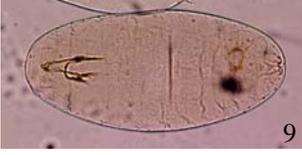
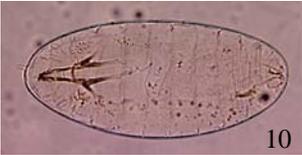
Anhang 6 Prozentuale Einteilung mutanter Kutikula-Phänotypen der *baz*-Allele und der Rettungskreuzungen. Text am Ende der Tabelle.

Angaben in %	G ZB K SP	<i>baz<sup>XR11</sup></i>	<i>baz<sup>XR11</sup> 36</i>	<i>baz<sup>XR11</sup> d3</i>	<i>baz<sup>815-8</sup></i>	<i>baz<sup>815-8</sup> 36</i>	<i>baz<sup>815-8</sup> d6</i>	<i>baz<sup>Xi106</sup> FRT</i>	<i>baz<sup>Xi106</sup> FRT36</i>
	1 0/- - -	6,3	16,1	5,1	1,0	10,0	7,8	0	6,1
	1 0/- - - Löcher	2,6	0	0	4,8	0,8	1,5	8,6	3,0
	1 ± ± ±/ Löcher	30,4	9,7	20,4	11,6	16,3	21,6	18,6	3,0
	1 + + + Löcher	0	3,2	0	4,8	3,8	3,9	0	0
	1 + + +	26,6	22,6	20,3	1,9	25,1	28,0	4,2	0

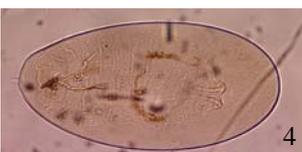
Anhang 6 Prozentuale Einteilung mutanter Kutikula-Phänotypen der *baz*-Allele und der Rettungskreuzungen. Text am Ende der Tabelle.

Angaben in %	G ZB K SP	<i>baz<sup>XR11</sup></i> d3	<i>baz<sup>Xi106</sup></i>	<i>baz<sup>Xi106</sup></i> 36	<i>baz<sup>EH747</sup></i>	<i>baz<sup>EH747</sup></i> 36	<i>baz<sup>XK75</sup></i>	<i>baz<sup>XK75</sup></i> 36	<i>baz<sup>EH171</sup></i>
Leere Hüllen*:		40,4	9,6	28,6	50,9	26,6	29,7	32,1	54,7
	1/4 0 0 0 - 1	25,4	2,7	30,0	25,4	46,6	74,7	39,7	20,9
	1/4 - - ± - 3/4 Löcher	5,1	13,3	23,3	49,1	8,3	3,6	14,1	4,5
	1/2 + - ± -3/4 Löcher	20,3	40,6	3,3	1,8	2,1	1,2	5,0	6,0
	1/2 0/- ± ± -3/4 Löcher	0	0	0	1,8	2,1	2,4	2,0	1,5
	1/2 ± ± ± -3/4 Löcher	3,4	0	0	0	0,8	0	1,0	0

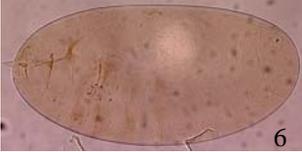
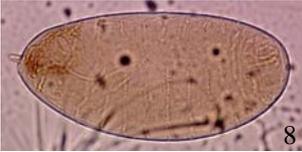
Anhang 6 Prozentuale Einteilung mutanter Kutikula-Phänotypen der *baz*-Allele und der Rettungskreuzungen. Text am Ende der Tabelle.

Angaben in %	G ZB K SP	<i>baz</i> <sup>XR11</sup> d3	<i>baz</i> <sup>Xi106</sup>	<i>baz</i> <sup>Xi106</sup> 36	<i>baz</i> <sup>EH747</sup>	<i>baz</i> <sup>EH747</sup> 36	<i>baz</i> <sup>XK75</sup>	<i>baz</i> <sup>XK75</sup> 36	<i>baz</i> <sup>EH171</sup>
	1 0/- - -	5,1	0	6,7	0	7,4	1,2	3,0	3,0
	1 0/- - - Löcher	0	0	0	1,8	2,1	0	1,0	0
	1 ± ± ±/- Löcher	20,4	27,4	16,7	5,5	9,1	4,8	10,6	14,9
	1 + + + Löcher	0	1,3	3,3	1,8	1,7	0	1,0	3,0
	1 + + +	20,3	14,7	16,7	12,8	19,8	12,1	22,6	46,2

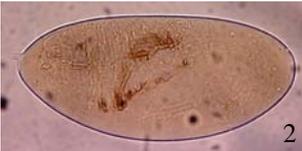
**Anhang 6** Prozentuale Einteilung mutanter Kutikula-Phänotypen der *baz*-Allele und der Rettungskreuzungen. Text am Ende der Tabelle.

Angaben in %	G	ZB	K	SP	<i>baz<sup>XR11</sup></i> <i>d3</i>	XR11 x full	XR11x S980A S982A	XR11x S980A	XR11x S982A	XR11x $\Delta$ PDZ1	XR11x $\Delta$ PDZ2	XR11 x $\Delta$ PDZ3	XR11x $\Delta$ PDZ1-2	XR11x $\Delta$ PDZ1-3
Leere Hüllen*:					40,4	20,9	28,1	20,3	26,3	20,8	38,7	14,3	48,2	33,3
	1/4	0	0	0	25,4	0,8	4,8	7,8	0	9,6	21,1	11,1	0	17,8
	1/4	-	-	$\pm$	5,1	0,8	5,7	19,6	0	1,2	0	5,6	0	0
Löcher														
	1/2	+	-	$\pm$	20,3	42,2	8,6	11,8	28,6	17,8	36,8	22,1	31,1	23,2
Löcher														
	1/2	0/-	$\pm$	$\pm$	0	0	0	11,8	0	0	0	0	0	7,2
Löcher														
	1/2	$\pm$	$\pm$	$\pm$	3,4	0	1,0	0	0	0	0	0	0	0
Löcher														

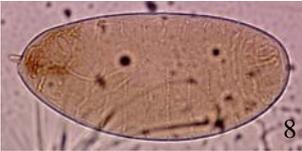
Anhang 6 Prozentuale Einteilung mutanter Kutikula-Phänotypen der *baz*-Allele und der Rettungskreuzungen. Text am Ende der Tabelle.

Angaben in %	G	ZB	K	SP	<i>baz</i> <sup>XR11</sup> <i>d3</i>	XR11 x full	XR11x S980A S982A	XR11x S980A	XR11x S982A	XR11x $\Delta$ PDZ1	XR11x $\Delta$ PDZ2	XR11x $\Delta$ PDZ3	XR11x $\Delta$ PDZ1-2	XR11x $\Delta$ PDZ1-3
 6	1	0/-	-	-	5,1	0	0	0	0	0	0	0	0	14,3
 7	1	0/-	-	-	0	0	0	9,8	0	0	0	0	0	0
 8	1	$\pm$	$\pm$	$\pm$ /-	20,4	43,0	25,7	25,4	50,0	61,9	15,8	55,6	65,5	23,2
 9	1	+	+	+	0	0	0	2,0	7,1	0	0	0	0	0
 10	1	+	+	+	20,3	13,2	54,2	11,8	14,3	9,5	26,3	5,6	3,4	14,3

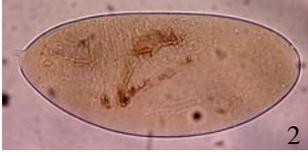
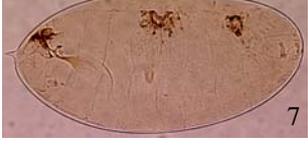
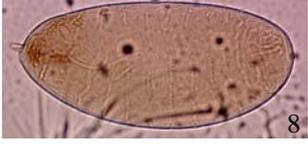
**Anhang 6** Prozentuale Einteilung mutanter Kutikula-Phänotypen der *baz*-Allele und der Rettungskreuzungen. Text am Ende der Tabelle.

Angaben in %	G ZB K SP	<i>baz</i> <sup>XR11</sup> d3	XR11 x Δ2-3	XR11 x ΔN	XR11 x ΔC	XR11 x 3PDZ	XR11 x Δ968-996	XR11 x Δ737-1019	XR11x Δ1026 - 1464
Leere Hüllen*:		40,4	46,7	4,0	37,4	11,7	45,8	46,9	36,4
	1/4 0 0 0 - 1	25,4	0	8,3	14,6	12,8	2,5	0	2,9
	1/4 - - ± -3/4 Löcher	5,1	0	4,2	7,3	17,3	20,5	29,4	20,0
	1/2 + - ± -3/4 Löcher	20,3	0	8,4	9,8	0,4	10,3	23,5	2,9
	1/2 0/- ± ± - 3/4 Löcher	0	0	0	6,1	1,7	0	0	37,1
	1/2 ± ± ± -3/4 Löcher	3,4	0	0	7,3	1,2	7,7	0	0

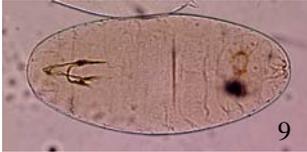
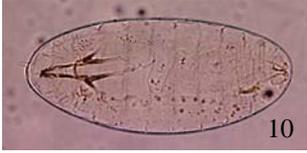
Anhang 6 Prozentuale Einteilung mutanter Kutikula-Phänotypen der *baz*-Allele und der Rettungskreuzungen. Text am Ende der Tabelle.

Angaben in %	G ZB K SP	<i>baz<sup>XR11</sup></i> <i>d3</i>	XR11 x $\Delta$ 2-3	XR11 x $\Delta$ N	XR11 x $\Delta$ C	XR11 x 3PDZ	XR11 x $\Delta$ 968-996	XR11 $\Delta$ 737-1019	x XR11x $\Delta$ 1026 - 1464
	1 0/- - -	5,1	0	0	2,5	1,7	0	0	0
	1 0/- - - Löcher	0	0	0	7,4	60,7	12,8	0	5,7
	1 ± ± ±/ Löcher	20,4	37,5	25,0	18,2	0,4	25,7	35,3	17,1
	1 + + + Löcher	0	0	0	14,6	2,1	7,7	11,8	0
	1 + + +	20,3	62,5	54,1	12,2	1,7	12,8	0	14,3

**Anhang 6** Prozentuale Einteilung mutanter Kutikula-Phänotypen der *baz*-Allele und der Rettungskreuzungen. Text am Ende der Tabelle.

Angaben in %	G ZB K SP	<i>baz</i> <sup>815-8</sup> d6	815-8 x full	815-8 x Δ737-1019
Leere Hüllen*:		63,2	26,7	31,5
	1/4 0 0 0 - 1	17,9	4,4	27,0
	1/4 - - ± -3/4 Löcher	9,3	0	8,1
	1/2 + - ± -3/4 Löcher	4,6	34,4	13,6
	1/2 0/- ± ± - 3/4 Löcher	1,5	0	0
	1/2 ± ± ± -3/4 Löcher	3,9	0	0
	1 0/- - -	7,8	0	0
	1 0/- - - Löcher	1,5	0	0
	1 ± ± ±/- Löcher	21,6	44,6	21,6

**Anhang 6** Prozentuale Einteilung mutanter Kutikula-Phänotypen der *baz*-Allele und der Rettungskreuzungen. Text am Ende der Tabelle.

Angaben in %	G ZB K SP	<i>baz</i> <sup>815-8</sup> d6	815-8 x full	815-8 x Δ737-1019
	1 + + + Löcher	3,9	0	0
	1 + + +	28,0	16,6	29,7

### Anhang 6 Prozentuale Einteilung mutanter Kutikula-Phänotypen der *baz*-Allele und der Rettungskreuzungen.

Die erste Spalte zeigt die zehn Klassen, in die die mutanten *baz*-Allele eingeteilt worden waren (Bild 1-10). In der zweiten Spalte wird der Phänotyp jeder einzelnen Klasse direkt daneben abkürzend wiedergegeben. Das bedeutet, es finden folgende Angaben statt, über a) die Größe (G) der Embryonen in der äußeren Eihülle (0-1, wobei 1 die wildtypische Körpergröße meint), b) Löcher, die in der Kutikula zu sehen waren c) Defekte in den Zähnchenbändern (ZB), die von 0 bis + variieren konnten, d) Defekte in den Kopfstrukturen (K), die von 0 bis + variieren konnten und e) Defekte in den Spirakeln (SP), die ebenfalls von 0 bis + variieren konnten [0: keine, +: rel. wildtypisch oder zumindest gut erkennbar, -: defekt, nur als Rest vorhanden, bei den ZB: nur sehr wenige, ±: liegt zwischen + und -; ±/-: variiert von leichten bis hin zu schweren Defekten]. In der ersten Zeile sind die Parentalkreuzungen angegeben, von denen die abgestorbenen Embryonen auf ihren kutikulären Phänotyp hin untersucht worden waren und in den jeweiligen Spalten sind die Prozentzahlen angegeben, wie häufig jede einzelne Klasse vorkam. Bei den Parentalkreuzungen handelt es sich sowohl um die mutanten *baz*-Allele als auch um die Kreuzungen der mutanten *baz*-Allele in den Grundstämmen gegen die jeweiligen UAS-*baz*-Effektorlinien. So sollen die Veränderungen in den kutikulären Phänotypen der mutanten *baz*-Allele, die durch die Kreuzung gegen die UAS-*baz*-Effektorlinien entstanden, direkt ersichtlich und mit den kutikulären Phänotypen der *baz*-Allele vergleichbar sein. Zudem wurden die beiden Grundstämme, *baz*<sup>XR11</sup> d3 und *baz*<sup>815-8</sup> d6, auf jeder Seite wiederholt aufgeführt, um einen direkten Vergleich zu gewährleisten. Wie vorher bereits erwähnt, konnten diese beiden Grundstämme nicht homozygot für den Treiber gehalten werden, weswegen der Bezug alternativ zu diesen beiden Grundstämmen, *baz*<sup>XR11</sup> d3 und *baz*<sup>815-8</sup> d6, angewandt wurde. Die Berechnung der Prozentangaben ergab sich aus Folgendem: Sämtliche Embryonen und leere Hüllen, bei denen keine Unterscheidung möglich war, ob es sich um unbefruchtete Eier oder auch um Embryonen ohne eine Differenzierung kutikulärer Strukturen handelte, ergaben zunächst 100 %. Die Angabe, wie viele wie leere Hüllen aussahen, ist in der zweiten Zeile vermerkt. Da es sich vermutlich doch um unbefruchtete Eier handelte, sind sie letztendlich nicht in die Berechnung eingegangen. Das bedeutet, die Prozentzahl sämtlicher, als eindeutig erkennbare Embryonen, wurde dann als 100% gesetzt.

## Anhang 7 Bazooka Gensequenz

A

GAATTCGAACTCGAAGCGCAGTAATCAACGCGCTGCTCGTGGATTTTTTTTGCATTTTTTTTGAGTTCAAATAGTTCGTTAATAAGAGTGGCGGTCAACGA 1  
 -----

G I R T R S A V I N A L L V D F F C I F L S S N S S L I R V A V N D  
 -----

TACTATTCCACTTGCAATCGAAATATGAATAGTTGAAAGTGATAAAACAACAAGAAAGAAGCGACGCCAACGGGCGAAAAAGGAGATAACCGAAAAACGAAA 2  
 -----

T I P L A I E I . I V E S D K Q Q E R S D A N G R K R R . P K T K  
 -----

AACACGACAAAAGCAACGTTAAAAGAGAGTAACAGAAAAGATATAAAAAACGATGATCGAACCGTAAATTTAAAACCATGCAATCTACAGCGCATAATATA 3  
 -----

N T T K A T L K E S N R K D I K T M I E P . I . N H A I Y S A . Y  
 -----

TAATAATTTGACAAAACAAATGCCAAGTTTGCAGCGAGAGCGAAGAACGTTAAAAAAGAAGTAAATAAATGATCTTGGCCCGCTGTTTGTGTCTT 4  
 -----


  
 -----

I I I . P K Q M P S L R A R A K N V K K R S K . M I L A R C L L F L  
 -----

GTTATTATGGTTGCCGTTGTTGTAACCTCGTTTTTTTTTAATGCGCGCGTGTATGAATCACACAACACAACAAAACAACAATAACAACGATGCGGTACGG 5  
 -----

L L W L P L L . L V F F N A R V Y E S H K H N K T N N N N D A V R  
 -----

## Anhang 7 Bazooka Gensequenz

Text am Ende der Sequenz.

## B

TGAAATATGCTAAGTAAATAGCAAAAGAGAGTTCCAGTTTCCAGAGACCGACAGAGAGGGAGAGCGCGGAGAGCGACTACAAGTACATACTGGAAGCG 60  
 . N M L S K . Q K R V P V S R D R Q R G R A R E S D Y K Y I L E S  
 ATCCCGATCCTTTTTCCAGGCACGCAGCCATCTCGCTCGCACCCATGCCGCCCTAGACCAACTTTTGTTCAGCTGCCTAACCAACCAACAATACAGCAAC 70  
 D P D P F S R H A A I S L A P M P P . T N F C C S C L T T N N T A T  
 AACAAGCGCACTGTGCACGCGAAAGGAGCAACAAGGATGGCGATAGCTGGAAGCGACGACGATGATGATGATGCGGTTCGTAACAACAACAGCAACAAGA 80  
 T S A L C T R K E Q Q G W R . L E S D D D D D D A V V T T T A T R  
 ACAAACAAAAGCTGCTGCAGGCAGACGAGCATAGCGTTAAAAAAAAGTAGCTGCATACAAAATAGTAATAGGAAAAATCCGAAAAATTCGAGAAAAAAA 90  
 T T K S C C R Q T S I A L K K S S C I Q N S N R K K S E K F E K K  
 TAAGTTAAAGAAACGATCGCCCAATTTAATCAAGTGCATATATGTGTGTGCAAAAATAAAAAGTCATTGCAGCAGTCAAAAATACATACTTATTATCGCA 10  
 I S . R N D R P I . S S A Y M C V Q N K K C I A A V K N T Y L L S Q


  
 bazexon1seq1for

### Anhang 7 Bazooka Gensequenz

Text am Ende der Sequenz.

C

GATCGAAGACGATAATAGTTATTGTTAACACGAAAAGTACGAAATGAAGGTCACCGTCTGCTTCGGCGACGTTTCGCATTCTGGTTCCTGTGGTTCCGGC 11

☞ Start-Codon - Beginn von Baz

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

GAACTCCTCGTCCGCGATCTCGTCAAGGAGGCCACGCGACGCTACATCAAGGCGCGCGCAAGGTAAGGGGATATACCTGATATATATGATATAGTATTA 12

1. Intron

E L L V R D L V K E A T R R Y I K A A G K V R G Y T . Y I . Y S I

TAAAGTATTACTTTACCCATCGATAGTAATTTTGATGGATAACACTTCTGGAGTTACGGGAGGTACTATGTAAGTATATAATAAATACATTAATTATAA 13

1. Intron

bazexon1rev

I K Y Y F T H R . . F . W I T L L E L R E V L C N . Y N K Y I N Y K

AGAACATTTAGTAAACCCATAATGAAATGTTGATCTAAGATTTGTAAAATCTCCTCCAGTCTTGCTAGAATTTCTCCAAGTGAGTCGTTGTTGGTGGT 14

1. Intron

E H L V N P . . N V D L R F V K S P P V L A R I F S K . V V V G G

GGTCGGCATTGGCATTGTTGTGGAATCCATCGGAATGCCAAAAGCAACACCGCCAGCAGCTCCTTGCTGCTTAGCTCAGCTCGACGAGAAGAGTAGA 15

1. Intron

G R H L A F V V E S I G M P K A T P P A A P W L L S S A R R E E .

## Anhang 7 Bazooka Gensequenz

Text am Ende der Sequenz.

## D

TTGCAATTGGGGCGCTGGAGGTCGTCGGTCTTATTAGGCTTATTAGGCGTCGCTCAGGGAGTTCAAGTTGATGATGAGCCCACGTGAGCGATGGAGT 16

1. Intron

I A I W G A G G R R G L I R L I R R R S G S S S . . . A H V S D G V

GACTCAACACGTAGCGGTTGCTCCATGCGGAAGCACAGATGTGCAGATGGTCAAATGGGATGTGAGAAGCGAGTCCGCGAGACGATGCGTCGTCCTCTC 17

1. Intron

T Q H V A V A P C G S T D V Q M V Q M G C E K R V R E T M R R L L

TATTGGCCTTTCAGATTGAAGATTGCAGTTACGAGATTGGGGGAGGGCTTGAATGGATGTTGGGAAAGAGTCCGCGACTTCCACGGCCCCAGTCT 18

1. Intron

bazexon2for

Y W P F Q I E D L Q L R D L G E G L N G C W E R V P R L P R P P V

AATGGAATAACAGATGCAAGAGATGCACGTCTTACTGTTTCGTTGCTGGGGAGATACAGTGCATACTCTATAATGTGAACTAATAAAATATATTTAAT 19

1. Intron

→  
-ba<sup>1</sup>

. W K . Q M Q E M H V L L F R C W G D T V H T L . C E L I K Y I L I

TTGCTCAGCAATAATAGATGTAAACTCAAACATGATATTTGTATTTTAACTTACAGCCGATTCTGGGTGACCGTGACGCATCTCCAGACA 20

1. Intron

C S A I I D V N S K L I D I L Y F L N L Q P D S W V T V T H L Q T

### Anhang 7 Bazooka Gensequenz

Text am Ende der Sequenz.





## G

CAGAGTTGAGAGTTCGAGTGTGCGCGGTGATCGCAATCGCCGCCAACAGCGTGACTCTAAGGTGGCCGACATGGTGGAGGTGGCTACGGTGTCAACCAC 31  
 S E L R V R V L R G D R N R R Q Q R D S K V A D M V E V A T V S P T  
 CCGCAAACCACATGCTGCTCCGGTGGGCACCTCGCTGCAGGTGGCCAATACCCGTAAACTGGGCAGGAAAATCCAAATTATGCTCAAGAAGGACCCAAC 32  
 R K P H A A P V G T S L Q V A N T R K L G R K I Q I M L K K G P N | baz -  
 GGTCTGGGCTTTTCGGTCACAACACGCGATAATCCCGCCGGTGGCCACTGTCCCATCTACATCAAGAATATCTGCCACGAGGTGCGGCCATCGAGGATG 33  
| baz exon2bseq1fo | baz e -  
 G L G F S V T T R D N P A G A H C P I Y I K N I L P R G A A I E D  
 GACGCCTGAAGCCCGCGATCGTTTGCTCGAGGTGGATGGCACTCCAATGACTGGTAAAAACACAAACGGATGTGGTGGCAATCTTGAGGGGCATGCCAGC 34  
| baz exon2bseq1rev |  
 G R L K P G D R L L E V D G T P M T G K T Q T D V V A I L R G M P A  
 GGGAGCAACCGTAAGGATTGTGGTCTCCCGCCAGCAGGAGTTGGCGGAGCAGGCTGACCAGCCGGCGGAGAAAAGTGTGGTGTGGCGGTGGCGCCCTCA 35  
 G A T V R I V V S R Q Q E L A E Q A D Q P A E K S A G V A V A P S

### Anhang 7 Bazooka Gensequenz

Text am Ende der Sequenz.

## H

GTTGCTCCACCAGCTGTTCTGCAGCTGCAGCTCCAGCGCCTCCCATTCGGGTACAAAAATCCAGCAGCGCACGTTCTCTGTTCACTCATCAGCAGCAAT 36  
 -----  
 V A P P A V P A A A A P A P P I P V Q K S S S A R S L F T H Q Q Q  
 -----  
 CGCAGCTCAACGAATCTCAGCACTTTATTGATGCGGGCAGCGAGTCCGGCGCTTCAAATGTAAGTTTAATCACAATCTTTGAAGGATTTGGAACATATGCT 37  
 -----  
  
 S Q L N E S Q H F I D A G S E S A A S N V S L I T I F E G F G T M L  
 -----  
 AATCTTTTATGTTCTTAAACACACAGGACAGCCTGCCGCCAGCAGCAACAGTTGGCACTCCCGCGAGGAGCTGACCCTGCACATTCCCGTACACGACA 38  
 -----  
  
 I F L C S . T H R T A C R P A A T V G T P A R S . P C T F P Y T T  
 -----  
 CCGAAAAGGCCGACTGGGTGTCAAGTGTGAAGGAAAGACGTGCTCGAATCTGAACGCTTCCGGATCGAGTGCCTCCAGCGGCAGCAATGGACTGATGAA 39  
 -----  
  
 P K R P D W V S V . R E R R A R I . T L P D R V P P A A A M D . .  
 -----  
 GCATGACGGTGACTTGGGTATATTCGTGAAGAATGTAATTCATGGCGGTGCTGCATCCCGCGATGGTCGCTTCCGGATGAATGATCAACTGCTGAGCGTG 40  
 -----  
 S M T V T W V Y S . R M . F M A V L H P A M V A C G . M I N C . A .  
 -----

**Anhang 7 Bazooka Gensequenz**  
 Text am Ende der Sequenz.

## I

AATGGAGTATCGCTGCGTGGGCAAACAATGCCGAGGCCATGGAGACACTACGTCCGGCAATGGTCAACACGCCCGCAAACATCCGGGAACCATAACCC 41  
 M E Y R C V G K T M P R P W R H Y V G Q W S T R P A N I R E P . P

TGCTGGTAGGCCGCAAGATCTTGCGATCGGCCAGTTCAGTGACATTCTGGACCACAGTAAACAGTACAGTCATAGCCATAGCAATAGTAGCGGTGGCAG 42  
 C W . A A R S C D R P V P V T F W T T V T V T V I A I A I V A V A

CAATTCAAATGGTAGCGCAATAACAACAATAGCAGCTCGAATGCCAGCGATAATTCTGGAGCCACGGTCATATATTTGAGTCCGGAGAAGAGGGAGCAG 43  
 A I Q M V A A I T T I A A R M P A I I L E P R S Y I . V R R R G S S

CGCTGCAATGGCGCGGAGGTGGTGGCAGTCTGGCAATGAGATGAATAGGTGGGTAGATTACTCGATATATGTAGTACAACCTAGTACAACCTAAGCGTA 44  
 A A M A A E V V A V L A M R . I G G . I T R Y M . Y N L V Q L S V

TTGTCTTACAGATGGAGCAATCCCGTTTTGGATCGCCTAACCGGTGGCATTGCTCCTCGAATTCAGCGCAGCCATCCTCTCAGCAGTCTCACCAGCAGC 45  
 L S Y R W S N P V L D R L T G G I C S S N S A Q P S S Q Q S H Q Q

Diagrammatic annotations:  
 - Red arrow above line 43: bazexon3-4seq1for  
 - Red arrow above line 43: bazexon3-41rev-  
 - Red bracket on line 44: -ba  
 - Green box on line 44: 3. Intron  
 - Green box on line 45: 3. Intron

**Anhang 7 Bazooka Gensequenz**  
 Text am Ende der Sequenz.

J

AGCCGCATCCTTCGCAGCAGCAACAGCAGCAACGTCGCCTGCCTGCAGCGCCGTTTGCAGCAGTGCAGCTCTGAGAAACGAGAGCTACTACATGGCCAC 46

Q P H P S Q Q Q Q Q R R L P A A P V C S S A A L R N E S Y Y M A T

CAATGACAACCTGGTCGCCGCGCAGATGCACCTTAATGACTGCTCATGGCAACACGGCGCTGCTTATCGAGGACGATGCCGAGCCGATGTCTCCGTGAGTC 47

N D N W S P A Q M H L M T A H G N T A L L I E D D A E P M S P . V

TGATAGCTAGATATCTCTCAAAGGCACQTTTAACTCACTTTATTCCTTATTCTTTCAAACACTACCGGCACGTCCGCATGATGGGCAGCACTGCAAC 48

. . L D I S Q R H L L T H F I P Y F F Q N T T G T S A . W A A L Q

ACGAGCAGTGCATCCATCGCAGAACTTGGCCGTCGGCAATCAGGGGCCACCCATAAATACCGTGCCTGGTACTCCGTCGACATCCAGCAACTTTGATG 49

H E Q C . S I A E L G R R Q S G A T H K Y R A W Y S V D I Q Q L . C

CCACCTACTCCTCGCAACTGAGCTTGGAGACAACTCGGGCGTGGAGCATTTCTCGCGCATGCTTTGGGACGACGAGCATCTCTGAGAAGCACCATGC 50

H L L L A T E L G D K L G R G A F L A R C F G T T Q H L . E A P C

**Anhang 7 Bazooka Gensequenz**  
Text am Ende der Sequenz.

GGCGCTGGATGCCCGGAAACTGGCACCTATCAGCGGAATAAGAAGTTACGCGAGGAGCGGAACGCGAGCGTCGCATTTCAGCTGACCAAATCGGCTGTG  
 51  
 G A G C P R N W H L S A E . E V T R G A R T R A S H S A D Q I G C  
 TATGGTGGTTCCATTGAGTCCCTTACGCTCGCATAGCCAGTGCTAATGCCAGTTTTCGGGATATAAACATGCCAAGACTGCATCCAGTATCGAGCAA  
 52  
 V W W F H . V P Y G S H S Q C . C P V F G I . T C Q D C I Q Y R A K  
 GAGAGACGCAGCAGCAATTGGCCGCTGCGGAGGCGGAGGCAAGGGATCAGCTGGGCGATCTGGGTCCATCGCTGGGCATGAAGAAGTCCTCGTCGTTGGA  
 53  
 R D A A A I G R C G G G G K G S A G R S G S I A G H E E V L V V G  
 GTCGCTCCAGACTATGGTGCAGGAGCTGCAGATGTCGGATGAGCCGCGTGGTCATCAGGCGTTGCGCGCACCGCGTGGGCGTGGCAGGGAGGACAGTCTG  
 54  
 V A P D Y G A G A A D V G . A A W S S G V A R T A W A W Q G G Q S  
 CGGGCGCGGTGGTCAGCGAACC GGATGCGAGCAGTAAGTTTTGGATAATAAACAGATATTTCTGGAATTGTGAATAATTTGTATGCGCTTATCTTTTT  
 55  
 A G G G G Q R T G C E Q . V F G . . T D I S G I V N N L Y A L I F F  
 bazexon5seq1for  
 bazexon5seq1rev  
 bazexon6for  
 5. Intron

### Anhang 7 Bazooka Gensequenz

Text am Ende der Sequenz.

## L

TAGAGCCCCGCAAGACCTGGCTTTTGGAGGATGGCGATCACGAGGTGGTTTTGCCTCGCAGCGCAATGGACC GTTCCAGAGTTCCTCTGAACGATGGCAA 56

 bazexon5rev

 -5.

R A P Q D L A F G G W R S R G W F C L A A Q W T V P E F P E R W Q

ACACGGCTGCAAGTCGTCGCGGGCCAAGAAGCCAAGCATACTGCGCGGTATCGGTACATGTTCCGCTTTGGCAAGAATCGCAAGGATGGCGTGGTGCCA 57

T R L Q V V A G Q E A K H T A R Y R S H V P L W Q E S Q G W R G A

GTGGATAACTATGCGGTAAACATTTGCCCCCTACATCGGTGGTTTCCACAGCCACATCGCCGAGCTGCAGCAGCAGCAACAGCAGCAGTTGCAGCAAC 58

S G . L C G K H F A P Y I G G F H S H I A A A A A A A T A A V A A T

ATCAGCAGCAACAACAGATACCAACCGCTGCATTTGGCTGCTCTGGAGAGAAATGGCAAACCGCCGGGTATCAGCCACCGCCACCGCTGCCTGCTCCAAA 59

 bazexon6seq1for

 bazexon6seq1rev

S A A T T D T N R C I G C S G E K W Q T A G V S A T A T A A C S K

TGGAGTGGGTAGCAATGGTATCCATCAGAACGACATCTTCAACCATCGCTATCAGCATTATGCCAACTACGAGGACCTCCACCAGCAGCACCAGCAACAC 60

W S G . Q W Y P S E R H L Q P S L S A L C Q L R G P P P A A P A T

## Anhang 7 Bazooka Gensequenz

Text am Ende der Sequenz.

## M

CAGATTAGGTGAGAGCGGTCCCGCACCTTCTTTGCATCCTTCACTTTGCCGGTGTCCGGATATTGTTTGTTTAACCCAGTTTATTAGCCATTTAACAC 61

-----6. Intron-----  
 P D . V R A V P H L L C I L S L C R C R D I C L F N P V Y . P F N T

AACATTGTGTACATATGTGTCGTATATCTCTTTCTCGCCCTTTTTTCTCTCTCTGTTCGGGTGTCTGTGTATCTATGTTGTTGTCATGTGTTAACAC 62

-----6. Intron-----  
 T L C T Y V S Y I S F S P F F L S L F R V S V Y L C C C Q C V N H

CCATCATCACACGCAAACCTCACCCACACAAACACACACCACACAATAACAATTCACTGGTAAAAACAAATATATCGAAGCAGTGGAGGCGATTCCAC 63

-----6. Intron-----  
 bazexon6rev  
 P S S H A N S P T Q T H T P H N N N Y T G K N K Y I E A V E A I P

CACATCGATTCGGAACGCTTTCGGAGTCAACACTCGAGTGCATGCGACAGCAGGTCATCCGTCAGCGCATCAAGGTCGAGGCGGAAAGGTAACCCACC 64

-----6. Intron-----  
 P H R F R K R F R S Q H S S A C D S R S S V S A S R S R R K G N P P

CACCTACACCAACACCCGCATCCACTCACACCCCCACCCACAACCTCACCCATCACTCAGATAGCACAGTGCAGTGCAGGTTTCGTAGATATAAAGCGG 65

-----6. Intron-----  
 T Y T N T R I H T H T P H P Q P H P S L R . H S A V R F V D I K R

## Anhang 7 Bazooka Gensequenz

Text am Ende der Sequenz.

N

GTTTTCGGTAATAGGCTTTTAGAGCTTCAGTTAATTAAGTAAACTTTAGGTGTGCTAGAGATTAGATTTTACAAAACAGAATATTGCAATCAATAAAT 66

6. Intron

V F G N R L F R A S V N . V K L . V C . R L D F T K Q N I A I N K

AACATTTAAAAAAGGTTATGGGTTGAAAATATTTAATACAATTACAATGACATGATCTTTATAGTGTTCGTAGATATCATAAAATGTAAATAAAATATT 67

6. Intron

. H L K K G Y G L K I F N T I T M T . S L . C S . I S . N V N K I L

AACATGTAGTTATAGTTAACACTCGAATTGCACTGTATCTCATCACAAAACACATGAATTTGGCTGGCTACTTGTAATTTTACATTTTCGTTTTTGC 68

6. Intron

bazexon7for

T C S Y S L T L E L H C I S S Q N T . I L A G Y L . I L H F R F C

CGACAAAACACAACAATCATAATATCTGCATTTTGTAAATTACTCATGGACATTCCCGCTTGCTTTCGCAGTCGCCGCATCAGCATTACCATTTCGCAGC 69

6. Intron

R Q N T T I I I S A F C K L L M D I P A C F R S R R H Q H Y H S Q

GCAGTGCCCGCTCGCAGGATGTGAGCATGCACTCGACGAGCTCCGGATCCCAGCCAGGATCCCTGGCTCAGCCGCAAGCGCAATCAGACGGCGTTTCGTCC 70

R S A R S Q D V S M H S T S S G S Q P G S L A Q P Q A Q S D G V R P

## Anhang 7 Bazooka Gensequenz

Text am Ende der Sequenz.

## O

CATGAGCAGTTACTACGAGTACGAGACGGTTCAACAGCAACGGGTGGGCAGCATCAAGCATAGCCACAGCAGCAGCGCCACGTCGTCCTCCTCGTCGCC 71

M S S Y Y E Y E T V Q Q Q R V G S I K H S H S S S A T S S S S S P

ATCAATGTGCCGCATGGAAGGCGGCAGCCATGAATGGCTACTCGCCAGCCAGCCTGAATAGCAGTGC GCGGAGTCGAGGTCCGTTTGTGACGCAGGTGA 72

bazexon7seq1for

I N V P H W K A A A M N G Y S P A S L N S S A R S R G P F V T Q V

CCATACGGGAGCAGAGCAGTGGCGGCATACCCGCCACCTGCTGCAGCAACATCAGCAGCAGCAACTCCAGCAGCAGCAGCCACCTACCAGACTGTTCA 73

bazexon7seq1rev

T I R E Q S S G G I P A H L L Q Q H Q Q Q Q L Q Q Q Q P T Y Q T V Q

GAAGATGTCCGGACCATCGCAATATGGTAGTGCCGCGGTTCCAGCCACACGCCTCCAAGGTGTGACTATAGGTGTTGGCGCAAGCGCGCCACTCGC 74

bazexon7b2for

Stop-Codon – Ende von Baz

K M S G P S Q Y G S A A G S Q P H A S K V . L . V L A Q A R A T R

GATGTGCTGGCCGAAAATCGGGTCGTTCTCAGCGAGGTCAACGAGGAGGTGGAAGTATTCTACTTCGCCACCGAGTGCTGAACACATTGCATAATCGAGG 75

bazexon7bfor

D V L A E N R V V L S E V N E E V E V F Y F A T E C . T H C I I E

### Anhang 7 Bazooka Gensequenz

Text am Ende der Sequenz.

GAATTATTGTTTAAAGTTAGATAAAGTGAATTTGCACTAAACCACATGCATAAGGGGTGGGTTGGTTAATGTAATCTTGTCTATTCAACATGCAATTAA 76

 bazexon7rev

G I I C L S . I K C N L H . T T C I R G G L V N V I L S I Q H A I N

TATGAGACAAGAGGAAATTTATTTATATTATGAGGTTTAAATTTGATTTGTAAGTCTCAAGCCAAGGAATGGTTGCTATATAATTTAAATCTATC 77

M R Q E E I Y F I L . G L N L I C N . L Q A K E W L L Y N L N S I

CTGATTAACAATATATGTATATATATATATATATATTTATCCGTGATATATGATTAAGCAAACAAAACCTAGACGTTTTCTTGCTAAGCGGAAAGAACC 78

L I K Q Y M Y I Y I Y I F I R D I . L S K Q N L D V F L L S G K N

AGGATAATATTACATTAGTATTCCATCATAATTTTCATGGTCCAAGTGGAAAGGATAAACTTGATTTTATATTGTAAATGCTAAGAATACTACTTGGT 79

Q D N I Y I S I P S . F H G P S G K D K L D F I F V N C . E Y Y L V

TTCATTGGATTTCCAACCTATTGACCCACCCTGACACACGTCTATATTAAGTTCACAATTCACAATATATAAACTAAAAAATTGCATATTTGGCGAAACA 80

S L D F Q P I D P P . H T S I L S S Q F T I Y K L K N C I F G E T

### Anhang 7 Bazooka Gensequenz

Text am Ende der Sequenz.

## Q

GAAACCAAGAGAGTAACGATTAAGGAAAGTATTCCTGATAAAGCGCTATCAATTTGTCGAGTGCTTAGATTTAATTTAAATGATCGTATTAAGCTTTAGCT 81  
 E T K R V T I K E S I P V K R Y Q F V E C L D L I . M I V L S F S  
 CTAAGTCCAAGTCAAACGCCTTTGTACATAACTAGTTTACCCAAAAGCCAACAAGAAAACAGAACAACATCAAATCCCAAAGTTTTGGACCTACTGCG 82  
 S K S K S N A F V H N . F T Q K P T R K Q N N I K S Q K F W T Y T A  
 GAAAGGTCTTAACAATTTCCATTGTCAATTTATGTAAGATTGTTTATTATTATTGTTTATTATTAATTTAATTATTAGTTTAATTCTAAATGCGGTAATTA 83  
 K G L N N F H C H L C K I V Y Y Y C L L L I . L L V . F . M R . L  
 TATAAAGTATTCTTAGTTTGTGACCGAAGACTGCTGCTGAGAACTCGACTGACTGCAACGCTGACTTCCACTCGACTCCACTGCTGCCTTGCGATCGTT 84  
 Y K V F L V C D R T T A A E N S T D C N A D F H S T P L L P C D R  
 CCTFCGATGACTGATGTGCGATAACTTCGATTTCGACAATCATGTTGCTGCTCAACAGCGCTGCCAACCGGGTTGTTGCCAGCCTTCAGCCTTACTCCA 85  
 S F D D . L S I T S I S D N H V A A Q Q R C Q P G C C Q P S A L L H

**Anhang 7 Bazooka Gensequenz**

Im Folgenden (A - Q) wird die genomische Sequenz von Baz mit den Positionen und den Sequenzen der PCR- (blau) und der Sequenzprimer (rot) dargestellt. Die Baz Gensequenz besteht aus 7 Exons und 6 Introns (grün) (Start - Codon: ATG (1044 - 1046); Stop - Codon: TGA (7365 - 7367)). Der Zahlenschlüssel für die Positionsangaben der Nukleotide am rechten Bildrand lautet wie folgt: Bild A: Die Zahlen 1 - 5 entsprechen den Nukleotiden 100 - 500; Bilder B - Q: Die Zahlen 60 - 85 entsprechen den Nukleotiden 600 - 8500.

**Abkürzungen:**

$\alpha$ -...	anti-...
AS	Aminosäure
Abb.	Abbildung
amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
Bal.	Balancer-Chromosom
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	kodierende DNA
CIP	alkalische Phosphatase (Kalb)
Chr.	Chromosom
dest.	destilliert
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
ev.	eventuell
h	Stunden
HRP	Meerrettich-Peroxidase
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
LB-Medium	Luria Bertani Broth-Medium
Lsg.	Lösung
m...	milli...(10 <sup>-3</sup> )
M	Molarität (mol/l)
MCS	multi-cloning-site (Polylinker)
min	Minuten
$\mu$ ...	mikro... (10 <sup>-6</sup> )
mRNA	messenger-RNA
n...	nano...(10 <sup>-9</sup> )
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid

PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
ORF	offenes Leseraster
PBS	phosphatgepufferte NaCl-Lösung
pBsc	Bluescript-Plasmid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pot.	potentiell
rpm	evolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
St.-Lsg	Stamm-Lösung
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
Taq	Thermophilus aquaticus
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethyl-Ethyldiamin
Temp.	Temperatur
U	Unit
u. a.	unter anderem
UV-Licht	ultraviolettes Licht
ü. N.	über Nacht
V	Volt
Vol.	Volumen
ZNS	Zentralnervensystem
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

## **Danksagung**

Diese Dissertation wurde am Institut für Genetik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Andreas Wodarz angefertigt. Für die Betreuung, die guten Ratschläge und seine Unterstützung auch in schwierigen Lagen gilt ihm mein besonderer Dank.

Ebenfalls recht herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Elisabeth Knust für die Unterstützung und die Möglichkeit, meine Dissertation in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen.

Einen besonderen Dank möchte ich Susann Özüyaman für ihre Hilfe bei der Durchsicht dieser Arbeit aussprechen. Bei ihr möchte ich mich für die sehr schöne Zeit während des Studiums / Promotion bedanken. Die vielen gemeinsamen Gespräche und unsere Reisen in die Bretagne und nach Kalifornien werden mir immer in wunderbarer Erinnerung bleiben.

Sehr herzlich möchte ich mich bei André Bachmann bedanken. Wann immer ich eine Frage hatte, konnte ich zuverlässig auf seine Unterstützung rechnen. Vor allem, wenn ich an die spezielle Versorgung meiner Fliegen während meines Urlaubs denke...

Des Weiteren möchte ich Diane Egger-Adam, Mirjana und Thomas Kessler für die angenehme Atmosphäre im Labor danken, die durch viele nette Gespräche, immer vorhandene Hilfsbereitschaft und gute Laune spürbar war.

Im Besonderen möchte ich auch an folgende Menschen denken: Ferdi Grawe danke ich für seinen Humor und seine Hilfe am REM. Sandra Berger möchte ich für viele gute Gespräche und ihre stete Hilfsbereitschaft danken. Einen ganz besonderen Dank geht an Marion Müller-Borg. Sie war mir eine wirklich sehr große Hilfe.

Ebenso danke ich allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts, die mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben, selbst wenn ich hier nicht alle aufzählen kann.

Ein ganz großer Dank geht an meine Familie und an meine Freunde Esther Seidensticker, Max Steller und Conny Arbes mit ihrer Familie. Die größte Unterstützung in jeglicher Hinsicht bekam ich von Frank. Für seine Liebe und sein Verständnis bin ich ihm sehr dankbar.

#### Erklärung

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

Die Bestimmungen der geltenden Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Andreas Wodarz betreut worden.