

Die Funktion der atypischen Proteinkinase C  
in der Etablierung der Zellpolarität in  
*Drosophila melanogaster*

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

vorgelegt von  
Soya Kim  
aus Duisburg

März 2007

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 14.05.2007

Referent: Prof. Dr. A. Wodarz

Koreferent: Prof. Dr. U. Rüter

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Zellpolarität .....	1
1.1.1	Zellpolarität durch Zellverbindungen in Epithelzellen.....	1
1.1.2	Konservierte Proteine, die in der Ausbildung der Zellpolarität involviert sind.....	2
1.1.3	Zellpolarität in der <i>C. elegans</i> Zygote .....	3
1.1.4	Funktion des PAR/aPKC-Komplexes in der Ausbildung der Zellpolarität in Säugern.....	4
1.2	Zellpolarität in <i>Drosophila</i> .....	5
1.2.1	Zellpolarität in Epithelien .....	5
1.2.2	Zellpolarität in Neuroblasten.....	8
1.2.3	Zellpolarität in der Oocyte .....	12
1.3	Die atypische Proteinkinase C .....	13
1.3.1	Die aPKM, eine konstitutiv aktive Form der DaPKC .....	15
1.3.2	Der dynamische PAR/aPKC-Komplex.....	15
1.4	Themenstellung .....	17
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>18</b>
2.1	Chemikalien und allgemeine Materialien.....	18
2.1.1	Photoarbeiten und Bildbearbeitung .....	18
2.1.2	Bakterienstämme .....	18
2.1.3	Plasmid-Vektoren .....	19
2.1.4	Oligonukleotide .....	19
2.2	Genetische Methoden .....	20
2.2.1	Fliegenzucht .....	20
2.2.2	Fliegenstämme.....	20
2.2.3	Erzeugung von Keimbahnklonen .....	21
2.2.3.1	Das FRT-FLP-System.....	21
2.2.3.2	Erzeugung von ovo <sup>D</sup> - und GFP-Keimbahnklonen.....	21
2.2.3.3	Erzeugung von Zellklonen in Follikelzellen .....	23
2.3	Histologische Methoden .....	24
2.3.1	Kutikula Präparation.....	24
2.3.2	Antikörperfärbung an Embryonen.....	24
2.3.3	Antikörperfärbung an Ovarien .....	24
2.3.4	Antikörperfärbung an Schneider Zellen.....	25
2.3.5	Verwendete Antikörper.....	25
2.3.6	DNA-Fluoreszenz-Markierung.....	26
2.3.7	GFP-Kernfärbung .....	27
2.3.8	TUNEL-Färbung .....	27
2.4	Molekularbiologische Methoden .....	27
2.4.1	Isolierung genomischer DNA aus <i>Drosophila</i> .....	27
2.4.2	Isolierung von polyA <sup>+</sup> -RNA .....	28
2.4.3	Präparation von Plasmid-DNA.....	29
2.4.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	29
2.4.5	Transformation elektrokompenter Zellen.....	29
2.4.6	Transformation chemisch kompetenter Zellen.....	29
2.4.7	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	30
2.4.8	RT-PCR.....	30

2.4.9	In-vitro-Transkription zur Synthese dsRNA für RNA-Interferenz (RNAi).....	30
2.4.10	Gelelektrophorese .....	31
2.4.11	Gelelelution .....	31
2.4.12	Erzeugung spezifischer Punktmutationen in Vektoren.....	31
2.4.13	Gateway Technologie .....	32
2.4.13.1	TOPO Klonierung in den Ausgangsvektor.....	33
2.4.13.2	Gateway LR-Rekombination in den Zielvektoren.....	33
2.5	Proteinbiochemische Methoden .....	34
2.5.1	Herstellung von Proteinextrakten .....	34
2.5.2	SDS-PAGE und Western Blot.....	35
2.5.3	Co-Immunopräzipitation (CoIP) .....	35
2.6	Zellkultur .....	36
2.6.1	Transfektion von Schneider S2 Zellen mit Plasmid-DNA.....	36
2.6.2	RNA-Interferenz in S2 Zellen .....	36
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
3.1	Charakterisierung neuer <i>DaPKC</i> -Allele.....	37
3.1.1	Die Kutikula-Phänotypen von Keimbahnklonen der <i>DaPKC<sup>psu</sup></i> Allele.....	37
3.1.2	Sequenzierung der <i>DaPKC<sup>psu</sup></i> Allele .....	38
3.1.3	Phänotypische Beschreibung der <i>DaPKC<sup>psu</sup></i> Allele.....	40
3.1.4	Die Reduktion der PDK-1 führt zur Reduktion der phospho-DaPKC .....	40
3.1.5	Nachweis der DaPKC in den maternalen <i>DaPKC<sup>psu</sup></i> Mutanten .....	41
3.1.6	Komplementationstests .....	42
3.1.7	Herstellung von GFP-DaPKC transfizierten S2-Zellen für CoIP.....	43
3.1.7.1	GFP-DaPKC <sup>psu69</sup> bindet nicht an endogenes Par-6.....	44
3.1.7.2	GFP-DaPKC bindet nicht an endogenes Baz .....	45
3.1.7.3	GFP-DaPKC zeigt keine eindeutige Komplexbildung mit endogenem Lgl ..	46
3.2	Untersuchungen zur Polarität während der Oogenese bei <i>DaPKC<sup>psu</sup></i> -mutanten Fliegen.....	49
3.2.1	Die Polarität der Oocyte in homozygoten <i>DaPKC<sup>psu</sup></i> -mutanten Fliegen ist teilweise gestört .....	49
3.2.2	Follikelzellklone in <i>DaPKC<sup>k06403</sup></i> zeigen den Verlust der Polarität.....	50
3.2.3	Keimbahnklone der <i>DaPKC<sup>psu</sup></i> Allele zeigen in Ovarien keine Defekte.....	52
3.3	Untersuchung der Embryonen von Keimbahnklonen der <i>DaPKC<sup>psu</sup></i> Allele .....	54
3.3.1	Zelltodnachweis durch TUNEL-Färbung in <i>DaPKC</i> Keimbahnklonen.....	54
3.3.2	Die Lokalisation der Par-Proteine in Epithelzellen ist voneinander abhängig.....	55
3.3.2.1	DaPKC lokalisiert in Mutanten der <i>DaPKC</i> Allele zu Beginn der Gastrulation unregelmäßig an der Membran.....	55
3.3.2.2	Par-6 zeigt eine ähnliche Lokalisation wie DaPKC in Mutanten der <i>DaPKC</i> Allele.....	57
3.3.2.3	Baz lokalisiert unregelmäßig und diffus in den Epithelzellen der <i>DaPKC</i> Allele.....	57
3.3.2.4	Verteilung der Par/aPKC-Komponenten während der Keimstreifenausstreckung in Mutanten der <i>DaPKC</i> Allele.....	60
3.3.2.5	In <i>DaPKC</i> Mutanten zeigen sich Polaritätsdefekte entlang der gesamten Membran .....	61
3.3.3	Die Neuroblasten zeigen in der Metaphase Defekte in der Polarität.....	63
3.3.3.1	DaPKC <sup>psu265</sup> und DaPKC <sup>psu417</sup> lokalisieren schwach apikal im Neuroblasten.....	64

3.3.3.2	Baz lokalisiert apikal in den NB der verschiedenen <i>DaPKC<sup>psu</sup></i> Allele.....	65
3.3.3.3	Die Lokalisation von Par-6 in <i>DaPKC<sup>psu69</sup></i> ist cytoplasmatisch .....	66
3.3.3.4	Insc ist in <i>DaPKC<sup>psu</sup></i> Allelen noch apikal lokalisiert .....	67
3.3.3.5	Mira lokalisiert in <i>DaPKC<sup>psu417</sup></i> cortical .....	68
3.3.3.6	Die extrinsische Orientierung des NB ist in <i>DaPKC<sup>k06403</sup></i> gestört.....	69
3.4	Molekulare Charakterisierung von Exzisionslinien der Linie <i>DaPKC<sup>k06403</sup></i> .....	71
3.4.1	Ein alternatives Transkript der <i>DaPKC</i> .....	71
3.4.2	Durch die P-Element Exzision werden Teile des Exons von <i>CG30475</i> deletiert 72	
3.4.3	Die subzelluläre Lokalisation der konstitutiv aktiven Form der <i>DaPKC</i> , aPKM, in wildtypischen <i>Drosophila</i> Ovarien.....	74
3.4.4	Die aPKM Isoform fehlt in den <i>DaPKC<sup>rev</sup></i> Allelen .....	75
3.4.5	Untersuchung homozygoter <i>DaPKC<sup>rev</sup></i> Allele.....	76
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>78</b>
4.1	Charakterisierung hypomorpher <i>DaPKC</i> Allele.....	78
4.2	Mutationen in der <i>DaPKC</i> beeinträchtigen die Stabilität des Par/aPKC-Komplexes in den Epithelzellen .....	79
4.3	Die Funktion der <i>DaPKC</i> in den Neuroblasten .....	81
4.3.1	Die Stabilität des Par/aPKC-Komplexes in NB .....	81
4.3.2	Die <i>DaPKC</i> dient als Gerüstprotein in den NB.....	82
4.3.3	Die extrinsische Orientierung des NB ist von einem intakten Epithel abhängig. 82	
4.4	Die Follikel Epithelzellen benötigen den Kontakt mit den Zellen der Keimbahn zur Ausbildung der Polarität .....	83
4.5	Die Funktion der <i>DaPKC</i> in der Oocyte .....	84
4.5.1	Die <i>DaPKC</i> ist als Gerüstprotein in der Keimbahn notwendig.....	84
4.5.2	Die aPKM entsteht durch alternatives Spleißen von <i>CG30475</i> und der <i>DaPKC</i> 85	
4.6	Der dynamische Par/aPKC-Komplex – in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration .....	86
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>101</b>
7.1	Abkürzungen .....	101
7.2	Sequenzen .....	101
7.2.1	Sequenzierung des Allels <i>DaPKC<sup>psu69</sup></i> .....	101
7.2.2	Sequenzierung des Allels <i>DaPKC<sup>psu141</sup></i> .....	102
7.2.3	Sequenzierung des Allels <i>DaPKC<sup>psu265</sup></i> .....	102
7.2.4	Sequenzierung des Allels <i>DaPKC<sup>psu417</sup></i> .....	102
7.2.5	Sequenzierung der RT-PCR mit dem Primer aPKC11011 .....	103
7.2.6	Sequenzierung der RT-PCR mit dem Primer aPKC12596rev .....	103
7.2.7	Sequenz des alternativen Transkriptes der aPKM.....	104
7.3	Tabellen.....	107
7.3.1	Lokalisation diverser Proteine in NB von Keimbahnklonen .....	107
7.3.2	Stellung der Metaphaseplatte in den NB von Keimbahnklonen .....	108

# 1 Einleitung

## 1.1 Zellpolarität

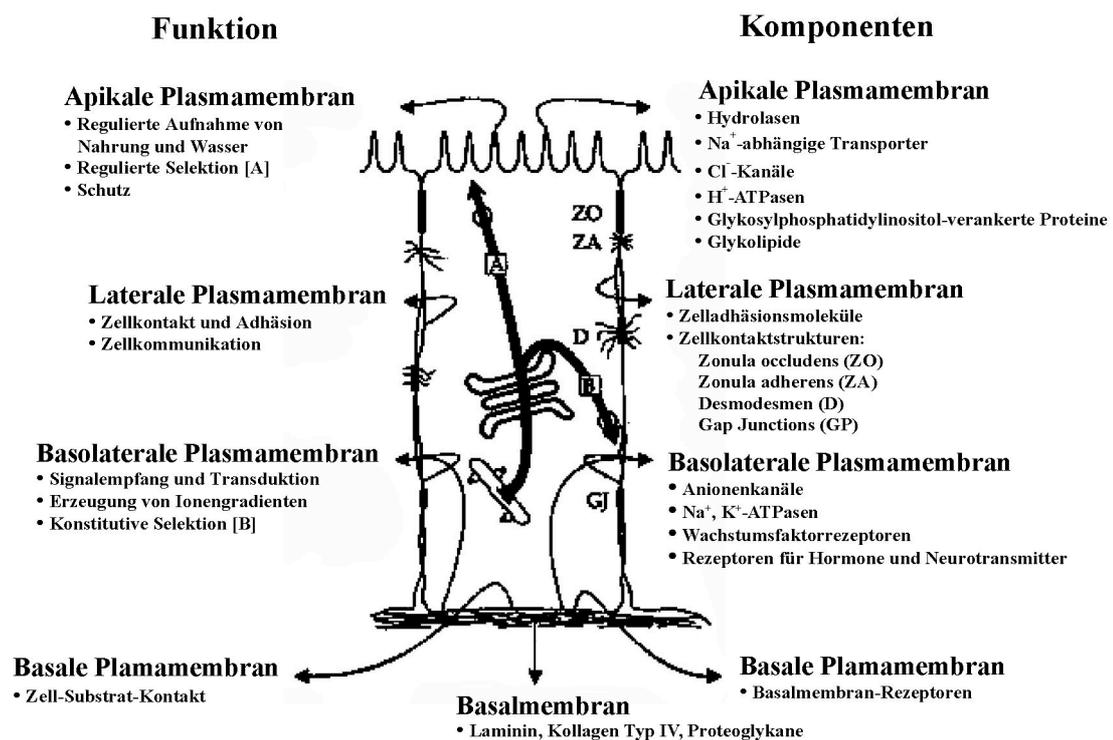
Eine grundlegende Frage in der Entwicklungsbiologie befasst sich damit, wie sich aus einer befruchteten Eizelle ein vielzelliger Organismus entwickeln kann. An der Ausbildung verschiedener organisierter Strukturen sind mehrere Entwicklungsprozesse beteiligt. Die Polarität als fundamentale Eigenschaft beschreibt dabei die Asymmetrie in Form, Funktion und Proteinverteilung, um Diversität in Zellen zu erzeugen.

### 1.1.1 Zellpolarität durch Zellverbindungen in Epithelzellen

Epithelien bilden die äußerste Zellschicht in mehrzelligen Organismen und trennen diesen von der Umwelt ab. Auch einzelne Kompartimente werden durch Epithelzellen abgegrenzt. Neben ihrer Schutzfunktion, z. B. vor dem Eindringen von Pathogenen, sind Epithelien für den gerichteten und kontrollierten Transport von Nährstoffen, Ionen und Molekülen notwendig. Um ihre Schutz- und Transportfunktion zu erfüllen, müssen Epithelzellen polar sein, und ihre Integrität hängt von direkten Zell-Zell-Kontakten ab.

Die Fähigkeit von Zellen, eine Polarität aufzubauen, also biochemisch und funktionell verschiedene Plasmamembrandomänen zu erzeugen, ist eine Voraussetzung für die Entwicklung von mehrzelligen Organismen. Die Polarität einer Epithelzelle wird sowohl durch das Cytoskelett als auch durch Lipide und Proteine ausgebildet, die spezifisch in verschiedenen Domänen lokalisiert sind (Tepass, 1997). Zell-Zell-Kontakte werden u. a. über Cadherine und Zell-Extrazelluläre Matrix (ECM)-Kontakte über Integrine hergestellt. Die Plasmamembran von Epithelzellen wird in zwei Domänen unterteilt: eine apikale und eine basolaterale Domäne, die in Vertebraten durch Tight Junctions (TJ) getrennt werden (Matter, 2000). Die TJ verbindet benachbarte Zellen so eng miteinander, dass sie als Diffusionsbarriere für Ionen und Moleküle dient (Matter, 2000). Die Ausbildung der TJ hängt von der Proteinfamilie der Claudine ab (Furuse et al., 1998). Während es die TJ nur in Epithelzellen der Vertebraten gibt, findet man die Zonula adherens (ZA), einen Cadherin-abhängigen Adhäsionsgürtel, der die gesamte Zelle umgibt, auch bei Invertebraten. Die Vorläufer der ZA sind die Adherens Junctions (AJ), die schon früh durch die Lokalisation von E-Cadherin (*Drosophila* DE-Cadherin oder Shotgun) und  $\beta$ -Catenin (*Drosophila* Armadillo) erkennbar sind (Lecuit, 2004). Die ZA's benachbarter Zellen stehen einander genau gegenüber und die beteiligten Membranen werden durch homophile Bindung von

E-Cadherin-Molekülen zusammengehalten. Die cytoplasmatische Domäne von E-Cadherin tritt über  $\beta$ - und  $\alpha$ -Catenine und wahrscheinlich weitere Adaptermoleküle mit dem Aktincytoskelett in Verbindung (Drees et al., 2005; Gates und Peifer, 2005). In Vertebraten liegt die ZA basal zur TJ, während sie in Arthropoden apikal zu den Septate Junctions (SJ) liegt. Die SJ verläuft über einen größeren Bereich der lateralen Plasmamembran und enthält das Transmembranprotein Neurexin IV (Baumgartner et al., 1996). Abbildung 1 zeigt eine polarisierte Vertebraten-Epithelzelle mit ihren Funktionen und Komponenten.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Vertebraten-Epithelzelle.** Gezeigt werden die funktionellen und biochemischen Unterschiede der Plasmamembrandomänen. (Rodriguez-Boulau und Nelson, 1989).

### 1.1.2 Konservierte Proteine, die in der Ausbildung der Zellpolarität involviert sind

Die Etablierung der Zellpolarität hängt von asymmetrisch verteilten Faktoren ab, die zu einer Reorganisation des Cytoskeletts und zur polaren Verteilung von kortikalen Proteinen führen. Solche Proteine wurden zuerst in *C. elegans* identifiziert und ihre Gene wurden *par* Gene (*partitioning defective*) genannt. Ihre Homologen sind auch für die Etablierung der Zellpolarität in *Drosophila* und Vertebraten notwendig. Tabelle 1 zeigt die Homologen von vier der sieben bekannten PAR-Proteine und ihre Lokalisation. Die drei Proteine PAR-3, PAR-6 und die Proteinkinase C 3 (PKC-3) bilden gemeinsam den hoch konservierten PAR/aPKC-Komplex.

**Tabelle 1: Homologe der PAR-Proteine und ihre Lokalisation.** PAR (partitioning defective), aPKC (atypische Proteinkinase C), ASIP (aPKC isotype-specific interacting protein), MARK (microtubule-affinity regulating kinase), SAR (Subapikale Region), TJ (Tight Junction).

<i>C. elegans</i>	Lokalisation in der Zygote	<i>Drosophila</i>	Lokalisation in Epithelien	Säuger	Lokalisation in Epithelien
PAR-3	anterior	Bazooka	an der SAR, apikale Membran	PAR-3/ASIP	an den TJ, apikale Membran
PAR-6	am Cortex	PAR-6		PAR-6	
PKC-3		aPKC		PKC $\lambda/\zeta$	
PAR-1	posterior	PAR-1	basolateral	PAR-1/MARK	basolateral

### 1.1.3 Zellpolarität in der *C. elegans* Zygote

Im Nematoden *C. elegans* bestimmt der Eintrittsort des Spermiums bzw. das Centrosom des Spermiums die Polarität der Zygote. Die Verteilung von Proteinen am Cortex der Zygote wird bereits durch Cytoplasmabewegungen sichtbar. Dabei gelangen keimbahn-spezifische P-Granula an das posteriore Ende der Zygote und verbleiben nach der Zellteilung ausschließlich in der posterioren Tochterzelle. Astralmikrotubuli und die *par* Gene kontrollieren die anterior-posterior Polarität und die asymmetrische Zellteilung im Einzell-Stadium (Rose und Kemphues, 1998; Kemphues, 2000; Schneider und Bowerman, 2003). PAR-3, PAR-6 und PKC-3 (PAR/PKC-3-Komplex) lokalisieren anterior im Embryo, PAR-1 und PAR-2 lokalisieren posterior. Die Etablierung der Polarität erfolgt dadurch, dass der PAR/PKC-3-Komplex nach Eintritt des Spermiums anterior lokalisiert und dadurch PAR-2, welches zunächst überall cortical verteilt ist, vom anterioren Cortex ausschließt. PAR-3 kann auch in Abwesenheit von PAR-6 und PKC-3 zunächst am anterioren Cortex lokalisieren, was umgekehrt für PAR-6 und PKC-3 nicht gilt (Watts et al., 1996; Tabuse et al., 1998; Hung und Kemphues, 1999). Somit scheint PAR-3 die anteriore Lokalisation des Komplexes zu initiieren. In der Phase der Aufrechterhaltung der Polarität ist PAR-2 notwendig, um den PAR/PKC-3-Komplex vom posterioren Cortex auszuschließen und anterior zu stabilisieren (Cuenca et al., 2003). In *par* Mutanten zeigt sich eine cortikale Fehlverteilung der jeweils anderen PAR-Proteine und auch die erste Zellteilung erfolgt nicht mehr asymmetrisch (Tabuse et al., 1998; Hung und Kemphues, 1999). In der wildtypischen Zygote liegt die Spindel näher zum posterioren Ende, so entsteht anterior eine größere AB-Zelle und posterior eine kleinere P1-Zelle. In *par* Mutanten liegt die Spindel in der Mitte der Zygote und es entstehen zwei gleich große Zellen. Neben den *par* Genen sind noch andere Gene an der Ausbildung der Polarität beteiligt: die Rho GTPase Cdc42 (Gotta et al., 2001; Kay und Hunter, 2001) und das Myosin NMY-2 (Guo und Kemphues, 1996).

#### 1.1.4 Funktion des PAR/aPKC-Komplexes in der Ausbildung der Zellpolarität in Säugern

Der PAR/aPKC-Komplex ist in Säugern an der TJ, apikal zur ZA, lokalisiert. Zunächst konnte die Bindung von ASIP (atypical PKC-specific interacting protein) zu PKC $\lambda/\zeta$  an der TJ gezeigt werden (Izumi et al., 1998). Später konnten auch die Bindung mit PAR-6 und Cdc42 (Joberty et al., 2000; Lin et al., 2000; Suzuki et al., 2001) und die Phosphorylierung von ASIP durch PKC $\zeta$  nachgewiesen werden (Lin et al., 2000). PAR-6 dient als Linkermolekül für den PAR/aPKC-Komplex und Cdc42 (Noda et al., 2001) und man nimmt an, dass PKC $\zeta$  durch GTP-gebundenes Cdc42 aktiviert werden kann. Die CRIB (Cdc42, Rac-interactive binding)-Domäne von PAR-6 unterdrückt durch ihre Bindung an PKC $\zeta$  deren Kinase-Aktivität. Durch die Bindung von aktiviertem Cdc42 an die CRIB-Domäne wird diese Unterdrückung aufgehoben (Yamanaka et al., 2001). Defekte im Aufbau der TJ in MDCK (Madine Darby canine kidney)-Zellen konnten sowohl durch Überexpression der dominant-negativen Form der PKC $\zeta$  (Suzuki et al., 2001) als auch einer mutanten Form von PAR-6, welches keine PKC $\zeta$ -Bindedomäne trägt (Yamanaka et al., 2001), nachgewiesen werden. Einiges deutet darauf hin, dass ASIP durch Bindung an das Transmembranprotein JAM-1 (junctional adhesion molecule) zur TJ rekrutiert wird (Ebnet et al., 2001; Itoh et al., 2001). Homologe von JAM-1 in *C. elegans* und *Drosophila* wurden jedoch noch nicht gefunden.

Neben dem PAR/aPKC-Komplex findet man auch den Crumbs (CRB)/PALS1 (protein associated with Lin7)/PATJ (PALS1-associated tight-junction protein)-Komplex an der TJ. Der PAR/aPKC-Komplex scheint universell in vielen Zelltypen und Geweben in die Etablierung von Polarität involviert zu sein (Ohno, 2001; Macara, 2004; Suzuki und Ohno, 2006), während der CRB/PALS1/PATJ-Komplex eher spezifisch für Epithelzellen ist. Es konnte gezeigt werden, dass PAR-6, über seine PDZ-Domäne, und PALS1, über seinen N-terminus, direkt aneinander binden können (Hurd et al., 2003) und dass auch CRB direkt an PAR-6 und PALS1 binden kann (Lemmers et al., 2004). Es ist jedoch noch nicht klar, ob alle Proteine gleichzeitig in einem einzigen Komplex vorliegen und wie die Polarität aufgebaut wird. Ein weiterer Proteinkomplex bestehend aus Scribble (Scrib), Discs large (Dlg) und Lethal (2) giant larvae (Lgl), lokalisiert an der basolateralen Membran. PAR-6 und PKC $\zeta$  können unabhängig von PAR-3 einen Komplex mit Lgl bilden und dadurch die Zellpolarität in Epithelien regulieren. Demnach bilden PAR-6, PKC $\zeta$  und Lgl einen inaktiven Komplex, der durch die Phosphorylierung und somit Dissoziation von Lgl zu einem aktiven PAR/aPKC-Komplex wird und die Bildung der TJ fördert, während Lgl in der Ausbildung der basolateralen Domäne involviert ist (Plant et al., 2003; Yamanaka et al., 2003).

## 1.2 Zellpolarität in *Drosophila*

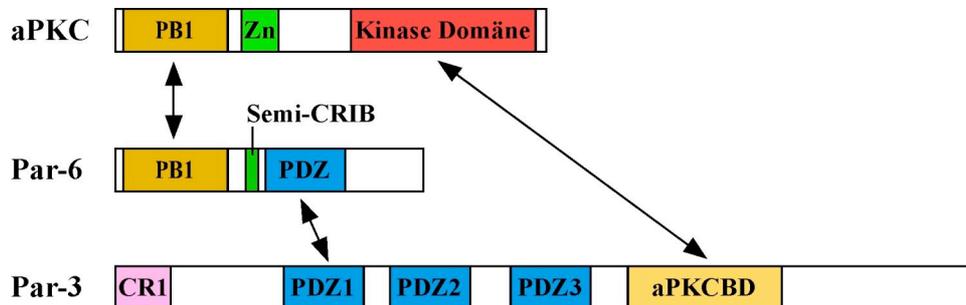
### 1.2.1 Zellpolarität in Epithelien

In der Frühentwicklung von *Drosophila* entsteht aus der befruchteten Eizelle, nach den Furchungsteilungen, eine Zelle mit vielen Zellkernen. Durch Invagination der Plasmamembran entsteht das zelluläre Blastoderm, dessen Zellen bereits eine Polarität aufweisen. In späteren Embryonalstadien unterscheidet man zwei verschiedene Arten von Epithelien. Die primären Epithelien entstehen direkt aus dem Blastoderm und behalten so während ihrer gesamten Entwicklung ihre Polarität. Marker für die primären Epithelien sind die Ausbildung der ZA und die Expression von Crb. Zu diesen Epithelien gehören unter anderem die Epidermis, der Vorder- und Hinterdarm, das tracheale System, die Speicheldrüsen, die Malpighischen Gefäße und die Amnioserosa. Die sekundären Epithelien entstehen aus mesenchymalen Zellen, die ihren epithelialen Charakter verloren haben und diesen durch DE-Cadherin-vermittelte Zellkontakte wieder aufnehmen, wie z.B. der Mitteldarm (Tepass, 1996). Einen Sondertypen von Epithelzellen bilden die Follikelzellen in der Keimbahn. Sie entstehen durch Proliferation epithelialer Stammzellen, bilden die ZA aus und zeigen eine Crumbs Lokalisation apikal an der Membran (Müller, 2000). Alle Epitheltypen erfordern die DE-Cadherin-vermittelte Zelladhäsion, um die Integrität des Epithels zu erhalten (Tepass und Hartenstein, 1994).

Für acht Proteine, aufgeteilt in drei Komplexen, konnte die Notwendigkeit für die Etablierung der apikal-basalen Zellpolarität in Epithelzellen nachgewiesen werden. Der Crb-Komplex besteht aus Crumbs (Crb) und Stardust (Sdt), der Baz-Komplex beinhaltet Bazooka (Baz), Par-6 und aPKC (Abbildung 2) und der Dlg-Komplex besteht aus Discs large (Dlg), Scribble (Scrib) und Lethal (2) giant larvae (Lgl). Von diesen acht Proteinen besitzt nur Crb eine Transmembrandomäne und fünf der weiteren sieben enthalten mindestens eine PDZ (PSD-95/Discs large/Zonula occludens-1)-Domäne. Diese Protein-Protein-Interaktionsdomänen sind üblicherweise an Signalprozessen beteiligt. Die Proteine des Crb-Komplexes lokalisieren in der so genannten subapikalen Region (SAR) oder auch marginalen Zone apikal zur ZA. Der Baz-Komplex überlappt teilweise mit der ZA und der SAR, und der Dlg-Komplex lokalisiert an der SJ. Alle Komponenten in den jeweiligen Komplexen sind hinsichtlich ihrer Lokalisation gegenseitig voneinander abhängig (Knust und Bossinger, 2002; Bilder, 2003; Johnson und Wodarz, 2003; Müller und Bossinger, 2003).

Man nimmt an, dass der Baz-Komplex ganz oben in der Hierarchie steht und die Bildung der ZA initiiert. Der Aktivität des Baz-Komplexes wirkt der Dlg-Komplex an der basolateralen

Membran entgegen. Der Crb-Komplex wird durch den Baz-Komplex nach apikal rekrutiert, wo er dem Dlg-Komplex entgegenwirkt (Bilder, 2003; Johnson und Wodarz, 2003; Harris und Peifer, 2004; Le Bivic, 2005).



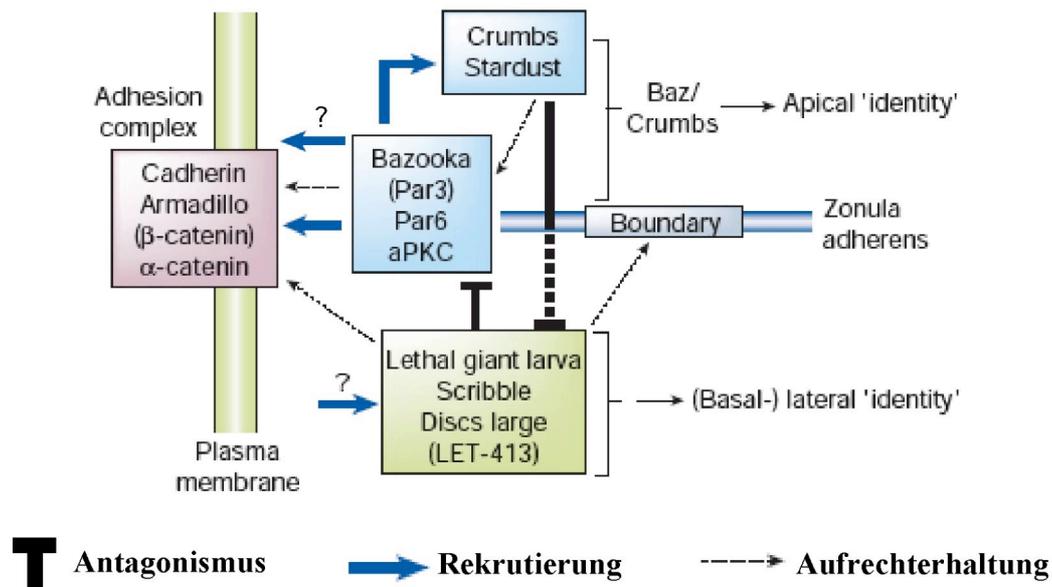
**Abbildung 2: Die Proteine des PAR/aPKC-Komplexes und ihre Bindungsstellen.** Par-6 und aPKC (atypische Proteinkinase C) können über die PB1(phagocyte oxidase/Bem1)-Domäne interagieren. Par-6 und Bazooka (Par-3) binden über ihre PDZ (PSD-95/Discs large/Zonula occludens-1)-Domäne. Über seine konservierte Region am N-Terminus kann Bazooka oligomerisieren. Die Kinase-Domäne der aPKC bindet und phosphoryliert Bazooka an ihrer aPKC-Bindedomäne. Die aPKC kann auch an die zweite und dritte PDZ-Domäne von Bazooka binden (Wodarz et al., 2000). Das Zink-Finger-Motiv (Zn) dient als regulatorische Domäne. CRIB (Cdc42/Rac-interactive binding).

Bisher nahm man an, dass die AJ, und somit DE-Cad, an der Spitze der Hierarchie steht. Kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass Baz während der Zellularisierung in *armadillo* (*arm*) Mutanten apikal akkumuliert, während die Rekrutierung von DE-Cad in *baz* Mutanten nicht gelingt (Harris und Peifer, 2004). In *baz* Mutanten sind apikale Marker reduziert und über die gesamte basolaterale Membran verteilt. Die Zellen runden sich ab, das Epithel wird vielschichtig und viele epidermale Zellen sterben später in der weiteren Entwicklung durch Apoptose (Bilder, 2003). Sehr ähnliche Phänotypen wurden auch für *Par-6* Mutanten berichtet (Petronczki und Knoblich, 2001). Die Phänotypen der *crb* und *sdt* Mutanten ähneln denjenigen von *baz* und *Par-6*, jedoch treten die Defekt erst später auf (Müller und Wieschaus, 1996; Müller, 2000; Bilder et al., 2003). Daher ist anzunehmen, dass Mutationen in Genen der *baz*-Gruppe epistatisch zu Mutationen der *crb*-Gruppe sind. Die Proteine der Baz- und Crb-Komplexe lokalisieren teilweise überlappend apikal zur ZA (Müller, 2000; Wodarz et al., 2000; Bachmann et al., 2001; Hong et al., 2001; Petronczki und Knoblich, 2001). In *baz* Mutanten ist Crb nicht mehr apikal lokalisiert, während in *crb* Mutanten Baz im gleichen Stadium durchaus noch korrekt lokalisiert. Baz ist also anscheinend auch für die korrekte Lokalisation von Crb verantwortlich (Bilder, 2003).

Mutationen in *dlg*, *scrib* und *lgl* zeigen einen deutlich anderen Phänotyp als Mutationen in *baz* und *crb*. Während die apikale Domäne in den *baz* und *crb* Mutanten stark reduziert ist oder fehlt, ist sie in den Mutanten der *dlg*-Gruppe vergrößert (Bilder et al., 2000; Bilder und

Perrimon, 2000; Bilder, 2003; Tanentzapf und Tepass, 2003). In Doppelmutanten mit *crb* und verschiedenen schwachen Allelen von *lgl* konnte gezeigt werden, dass der Phänotyp der Doppelmutanten, abhängig vom Allel, milder ist als der Phänotyp der *crb* Einzelmutante. Dabei ist der Phänotyp umso milder, je stärker das Allel für *lgl* ist. Auch Mutationen in *scrib* oder *dlg* unterdrücken den *crb* oder *sdt* Phänotyp. In Doppelmutanten, die kein Genprodukt mehr für *crb/sdt* und *dlg/scrib/lgl* zeigen, also z.B. *crb* und *dlg* Doppelmutanten, entspricht der Phänotyp dem der *dlg*-Gruppe. Dies deutet darauf hin, dass Mutationen in Genen der *dlg*-Gruppe epistatisch zu Mutationen in Genen der *crb*-Gruppe sind (Bilder et al., 2003; Tanentzapf und Tepass, 2003).

Der Phänotyp der ausgeweiteten apikalen Membran in den Mutanten der *dlg*-Gruppe wurde vorher so gedeutet, dass sich die Lokalisation von Crb zu der vermeintlich basolateralen Membran ausweitet (Bilder und Perrimon, 2000). Diese Annahme wurde durch die Beobachtung unterstützt, dass eine Überexpression von Crb gleichzeitig zu einer Ausweitung der apikalen und zu einer Reduzierung der basolateralen Membran führt (Wodarz et al., 1995). Die *crb/sdt* und *dlg/scrib/lgl* Doppelmutanten zeigen jedoch die Ausweitung der apikalen Membran in Abwesenheit von Crb (Bilder et al., 2003; Tanentzapf und Tepass, 2003). Daher muss es einen zusätzlichen Faktor für die Bildung der apikalen Membran geben. Dies könnte der Baz-Komplex sein. In der Tat konnte gezeigt werden, dass *baz* und *dlg* Doppelmutanten den gleichen Phänotypen zeigen wie *baz* Einzelmutanten. Dies deutet darauf hin, dass Mutationen in Genen der *baz*-Gruppe epistatisch zu Mutationen in Genen der *dlg*-Gruppe sind (Bilder et al., 2003; Tanentzapf und Tepass, 2003). Die Funktion des Crb-Komplexes scheint zu sein, dem Dlg-Komplex entgegenzuwirken. In *crb* Mutanten ist die Aktivität des Dlg-Komplexes zu stark, so dass die Ausbildung der apikalen Membran, wahrscheinlich durch den Baz-Komplex, reduziert ist. In den Doppelmutanten mit *crb* und einem schwachen Allele von *lgl* fällt der Phänotyp milder aus (Tanentzapf und Tepass, 2003). Der Dlg-Komplex ist notwendig, um den Baz-Komplex apikal zu begrenzen, dabei nimmt Lgl, das durch Scrib an den Cortex lokalisiert, eine besondere Stellung ein (Bilder et al., 2000). Lgl wird durch die aPKC phosphoryliert und dadurch von der apikalen Membran ausgeschlossen. Auch überexprimiertes, wildtypisches Lgl wird in Epithelzellen von der apikalen Membran ausgeschlossen und zeigt keine Überlappung mit den Proteinen des Baz-Komplexes. Dagegen bleibt eine nicht phosphorylierbare Form von Lgl an der apikalen Membran lokalisiert und überlappt mit den Proteinen des Baz-Komplexes (Hutterer et al., 2004).



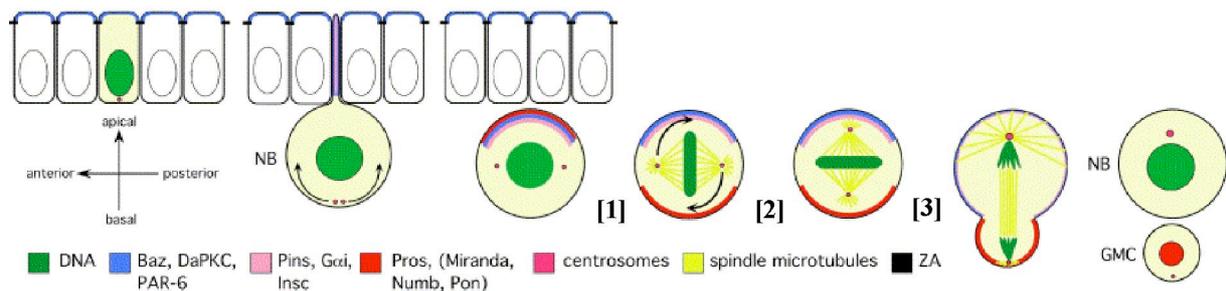
**Abbildung 3: Schema zur Etablierung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität in Epithelzellen.** Baz rekrutiert zunächst DE-Cadherin und später Crb. Der Mechanismus der Rekrutierung von Baz oder des PAR/aPKC-Komplexes, direkt oder indirekt, an die Membran, ist noch nicht bekannt. Der Crb-Komplex wirkt antagonistisch zum Dlg-Komplex, der wiederum den Baz-Komplex apikal begrenzt. (Nelson, 2003; Harris und Peifer, 2004).

Die komplexe Koordination der Aktivitäten aller drei Proteinkomplexe (Abbildung 3) ist somit erforderlich, um die Zellpolarität aufzubauen und zu erhalten (Bilder et al., 2003; Tanentzapf und Tepass, 2003).

### 1.2.2 Zellpolarität in Neuroblasten

Das zentrale Nervensystem entwickelt sich aus neuronalen Vorläuferzellen, den Neuroblasten (NB). Diese delaminieren aus dem neuroektodermalen Epithel in das Innere des Embryos und kommen zwischen dem Ektoderm und dem Mesoderm zu liegen. Kurz nach der Delamination beginnt der NB, sich asymmetrisch zu teilen und erzeugt einen weiteren NB und eine kleinere Ganglien-Mutterzelle (GMC). Die GMC teilt sich ein weiteres Mal in ein Paar Neuronen oder Gliazellen (Campos-Ortega, 1997). Während der Teilung des NB rotieren die Spindelpole um 90°, so dass die Metaphaseplatte parallel zum darüber liegenden Epithel liegt und die GMC nach basal abgeschnürt wird (Kaltschmidt et al., 2000). Zellschicksalsdeterminanten wie Prospero (Pros) und Brain tumor (Brat) und ihr Adapterprotein Miranda (Mira) segregieren dabei ausschließlich in die GMC und beeinflussen die Transkription und Translation nachfolgender Gene (Betschinger et al., 2006; Lee et al., 2006b; Wodarz und Gonzalez, 2006). Der Transkriptionsfaktor Pros ist erforderlich für die Transkription GMC spezifischer Gene. Pros unterdrückt auch die Transkription von Zellzyklusregulatoren, so dass die Zelle den Zellzyklus verlässt und sich nach einer letzten Teilung ausdifferenziert (Doe et al., 1991;

Vaessin et al., 1991; Li und Vaessin, 2000). *Brat* inhibiert direkt oder indirekt die Translation des Transkriptionsfaktors *Myc* (Betschinger et al., 2006). *Myc* reguliert das Zellwachstum, indem es die Synthese der ribosomalen RNA im Nucleolus reguliert (Grewal et al., 2005). Man nimmt daher an, dass *Brat* das Zellwachstum in der GMC durch Senkung der Protein-Synthese reguliert (Betschinger et al., 2006). Abbildung 4 zeigt eine Reihe von Proteinen, *Baz*, *Par-6*, *aPKC*, *Inscuteable* (*Insc*), *Partner of Inscuteable* (*Pins*) und *Gcd*, die apikal am Cortex des mitotischen NB einen Komplex bilden und drei für die asymmetrische Zellteilung des NB wichtige Aspekte kontrollieren: [1] die basale Lokalisation von Zellschicksalsdeterminanten, [2] die Orientierung der Mitosespindel und [3] die Regulierung der Zellgröße zwischen dem NB und der GMC (Wodarz und Huttner, 2003; Roegiers und Jan, 2004). Für *aPKC*, *brat*, *lgl*, *pins* und *pros* konnte gezeigt werden, dass sie die Selbst-Erneuerung und somit das Stammzell-Potential des NB positiv (*aPKC*, *Pins*) oder negativ (*brat*, *lgl*, *pros*) regulieren (Bello et al., 2006; Betschinger et al., 2006; Lee et al., 2006a; Lee et al., 2006b).



**Abbildung 4: Schema zur asymmetrischen Zellteilung im NB von *Drosophila*.** Ein NB delaminiert in das Innere des Embryos und beginnt sich zu teilen. In der Prophase sind diverse Proteine und Zellschicksalsdeterminanten apikal lokalisiert. In der Metaphase lokalisieren die Zellschicksalsdeterminanten und ihre Adaptorproteine basal [1] und die Spindel rotiert um 90° [2]. Die Zelle teilt sich in einen weiteren NB und eine kleinere, basal gelegene GMC [3], in der spezifische Gene aktiviert oder reprimiert werden. (Wodarz und Huttner, 2003).

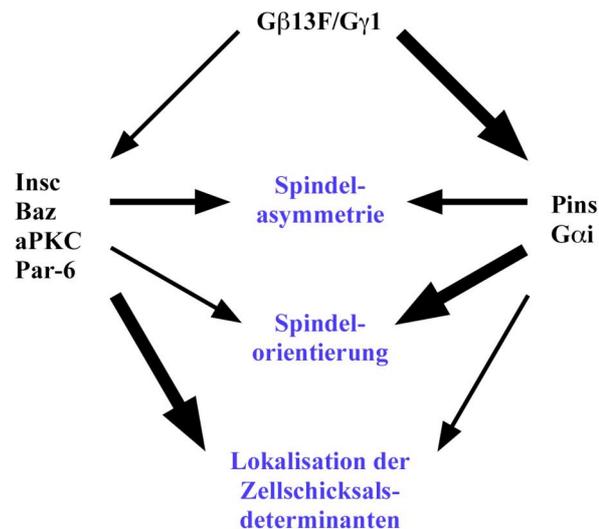
NB sind ursprünglich Epithelzellen, die sich aus ihrem Zellverband lösen. Ihre Zell-Zell-Kontakte über die ZA werden aufgelöst, jedoch bleibt ihre Polarität erhalten. Die Komponenten des PAR/aPKC-Komplexes lokalisieren im NB auch weiterhin apikal. Mutationen in einem der Gene führen zum Verlust der Polarität in Epithelien und NB (Schober et al., 1999; Wodarz et al., 1999; Wodarz et al., 2000; Petronczki und Knoblich, 2001; Rolls et al., 2003). Dies zeigt, dass die Polarität in beiden Zelltypen durch einen ähnlichen Mechanismus kontrolliert wird. Obwohl die NB aus polaren Epithelzellen entstehen, ist ein intaktes neuroektodermales Epithel nicht absolut notwendig für die Polarität im NB. *Crb* und *sdt* Mutanten zeigen Defekte in der Polarität der Epithelzellen, die NB sind

davon jedoch nicht betroffen (Bachmann et al., 2001; Hong et al., 2001). Crb und Sdt interagieren mit dem PAR/aPKC-Komplex in Epithelzellen (Hurd et al., 2003), aber in NB werden sie nicht exprimiert (Bachmann et al., 2001; Hong et al., 2001). In Mutanten für die Komponenten des PAR/aPKC-Komplexes ist die asymmetrische Verteilung der Zellschicksalsdeterminanten Pros, Brat und Numb und ihrer Adapterproteine Mira und Partner of Numb (Pon) gestört. Das gleiche gilt für *dlg*, *scrib* und *lgl* Mutanten, wobei hier die Lokalisation des PAR/aPKC-Komplexes apikal nicht gestört ist (Ohshiro et al., 2000; Peng et al., 2000), im Gegensatz zum PAR/aPKC-Komplex in den Epithelzellen (Bilder et al., 2000; Hutterer et al., 2004). Die drei Tumorsuppressorproteine lokalisieren cortical im NB und sind in die basale Lokalisierung der Zellschicksalsdeterminanten involviert. Es konnte gezeigt werden, dass aPKC Lgl phosphoryliert und somit inaktiviert. Der N-Terminus von Lgl kann mit der Membran assoziieren und ist erforderlich für die Phosphorylierung. Durch eine Konformationsänderung bindet der N-Terminus an den C-Terminus, verhindert die Bindung an Aktin und Lgl gelangt ins Cytoplasma (Betschinger et al., 2003; Betschinger et al., 2005). Lgl ist im NB dann nur basal aktiv, wo es für die Rekrutierung, aber nicht den Erhalt von Mira notwendig ist (Ohshiro et al., 2000). Es gibt zurzeit zwei Modelle, wie Lgl an der Rekrutierung der basalen Zellschicksalsdeterminanten involviert ist (Wodarz und Huttner, 2003; Bilder, 2004; Vasioukhin, 2006; Wirtz-Peitz und Knoblich, 2006). Lgl Homologe in *S. cerevisiae* sind Sro7/77p, die am Vesikeltransport beteiligt sind. Sie interagieren mit dem t-SNARE Sec9p und auch das Säuger Homolog bindet an das t-SNARE Syntaxin-4 (Lehman et al., 1999; Musch et al., 2002; Gangar et al., 2005). Aktives Lgl am basalen Cortex könnte die Fusion von Vesikeln initiieren, die mit Zellschicksalsdeterminanten oder membranassoziierten Rezeptoren für diese beladen sind (Wirtz-Peitz und Knoblich, 2006). Im zweiten Modell bindet Lgl an Myosin-II (Strand et al., 1994). Es scheint, dass beide Proteine in einem gemeinsamen Signalweg antagonistisch die Rekrutierung der corticalen Zellschicksalsdeterminanten regulieren (Ohshiro et al., 2000; Peng et al., 2000; Barros et al., 2003; Betschinger et al., 2005).

Obwohl Zellschicksalsdeterminanten in vielen Mutanten während der Metaphase nicht basal lokalisieren können, ist es möglich, dass sie in der späten Anaphase oder Telophase trotzdem überwiegend in die GMC gelangen. Der Transport erfolgt also unabhängig von der basalen Lokalisation während der Metaphase, und dieses Ereignis wird als Telophase-Rettung beschrieben (Peng et al., 2000).

Ein weiterer Punkt, der für die korrekte Teilung des NB wichtig ist, ist die Spindelorientierung. Mutationen in den Komponenten des PAR/aPKC-Komplexes führen,

neben der Fehlverteilung der Zellschicksalsdeterminanten, teilweise auch zu einer gestörten Spindelorientierung. Starke Defekte in der Spindelorientierung zeigen sich in *pins* und *Gai* Mutanten. In ihnen erfolgt keine Spindelrotation und die Zellen teilen sich parallel zu den Epithelzellen (Yu et al., 2000; Yu et al., 2003). Mushroom Body Defect (Mud) konnte als Bindungspartner von Pins identifiziert werden, das die Mikrotubuli-Polymerisierung verstärkt. Es lokalisiert apikal im NB mit Pins und Gai und in der Metaphase zusätzlich an den Spindelpolen. In der Tat zeigen *mud* Mutanten Defekte in der Spindelorientierung. Man nimmt an, dass Mud zusammen mit Pins und Gai die Anheftung der Astralmikrotubuli am Cortex reguliert und so die Mitosespindel orientiert (Bowman et al., 2006; Izumi et al., 2006). Im Gegensatz zu den hier erwähnten apikal lokalisierenden Proteinen, die auch alle in Epithelzellen exprimiert werden, wird Insc nur in NB exprimiert. Insc wird zuerst bei der Delamination des NB durch die Bindung an Baz apikal lokalisiert (Schober et al., 1999; Wodarz et al., 1999; Wodarz et al., 2000; Petronczki und Knoblich, 2001). Wird Insc ektopisch in Epithelzellen exprimiert, führt dies zu einer Rotation der Spindel um 90° und die Zelle teilt sich vertikal wie im NB, anstatt horizontal in einer Ebene mit den Epithelzellen (Kraut et al., 1996). *Insc* Mutanten zeigen sowohl Defekte in der Spindelorientierung, als auch eine Fehlverteilung der Zellschicksalsdeterminanten (Wodarz et al., 1999). Wie der PAR/aPKC-Komplex und der Pins/Gai-Komplex ist auch Insc apikal im Cortex des NB lokalisiert und die Lokalisation der Proteine ist teilweise voneinander abhängig (Schaefer et al., 2000; Schaefer et al., 2001). Die beiden Komplexe können über Baz an Insc (Schober et al., 1999; Wodarz et al., 1999) und Insc an Pins (Schaefer et al., 2000; Yu et al., 2000) binden. Die Proteinkomplexe wirken auf die Weise redundant, dass in Doppelmutanten für die Komponenten beider Komplexe die NB sich symmetrisch teilen und die Tochterzellen gleich groß sind (Cai et al., 2003). Dieser Phänotyp tritt auch in *Gβ13F* und *Gyl* Mutanten auf, die in der Hierarchie über den beiden Proteinkomplexen stehen (Fuse et al., 2003; Yu et al., 2003; Izumi et al., 2004). In Abbildung 5 ist ein Schema dargestellt, das den Einfluss der beiden Proteinkomplexe auf die asymmetrische Zellteilung gewichtet.



**Abbildung 5: Einfluss der apikalen Komponenten auf die asymmetrische Zellteilung im NB.** Gβ13F und Gγ1 sind für die Lokalisation der beiden apikalen Komplexe verantwortlich. Dabei zeigt sich Pins/Gαi in *Gβ13F* oder *Gγ1* Mutanten komplett cytoplasmatisch und Insc/Baz/aPKC/Par-6 eine schwach apikale Lokalisation. An der asymmetrischen Ausbildung der Spindel sind beide Komplexe gleichermaßen beteiligt, wohingegen Pins/Gαi einen größeren Einfluss auf die Spindelorientierung haben. Insc/Baz/aPKC/Par-6 haben einen größeren Einfluss auf die Lokalisation der Zellschicksalsdeterminanten. (Izumi et al., 2004).

### 1.2.3 Zellpolarität in der Oocyte

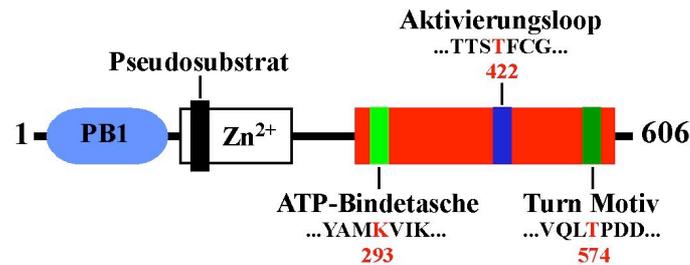
Die Eikammern in *Drosophila* entstehen im Germarium, und sie sind funktionelle Wachstumseinheiten aus somatischen Follikel epithelzellen und Keimbahnzellen. Die Ausbildung der Polarität der Oocyte hängt von den Interaktionen dieser beiden Zelltypen ab (Roth, 2001). Die Selektion der Oocyte erfolgt sehr früh während der Oogenese in Abhängigkeit von einem spektrinreichen, membranhaltigen Organell, dem Fusom (Lin et al., 1994; de Cuevas und Spradling, 1998). Eine Keimbahnstammzelle teilt sich asymmetrisch in eine weitere Stammzelle und einen Cystoblasten. Der Cystoblast teilt sich in vier mitotischen Teilungen ohne Cytokinese in 16 Cystocyten, den Keimbahnzellen. Während dieser Teilungen sind Mikrotubuli für die korrekte Ausbildung des Fusoms erforderlich und ein korrektes Mikrotubuli-Netzwerk ist später erforderlich, um den Transport von mRNAs und Proteinen anhand der Mikrotubuli zum MTOC (Mikrotubuli organisierendes Zentrum) in der zukünftigen Oocyte zu gewährleisten (Grieder et al., 2000). Durch DE-Cad vermittelte Adhäsion wandert die Oocyte nach posterior im Germarium (Godt und Tepass, 1998; van Eeden und St Johnston, 1999). Im Germarium ist der Oocytenkern transkriptionell aktiv, während später nur die Nährzellen genetisch aktiv sind und ihre Syntheseprodukte über Mikrotubuli durch die Ringkanäle, cytoplasmatische Brücken zwischen den Zellen, in die Oocyte transportiert werden (Spradling, 1993). Schließlich schnürt sich eine Eikammer vom Germarium ab und durchläuft ihre weitere Entwicklung im Ovariolschlauch. Hierbei proliferieren die Follikelzellen bis zu einer Anzahl von 700-1000 Zellen in Stadium 6 und

beginnen dann, sich zu differenzieren. Die Oocyte wird durch zwei Signalwege polarisiert. Beide werden durch Gurken induziert (van Eeden und St Johnston, 1999; Riechmann und Ephrussi, 2001). Gurken ist ein TGF- $\alpha$  ähnlicher Ligand für den EGF-Rezeptor und wird nur in der weiblichen Keimbahn exprimiert (Neuman-Silberberg und Schupbach, 1993). Dort reguliert es die Aktivität des EGFR, der in den umgebenden Follikelzellen exprimiert wird (Price et al., 1989; Sapir et al., 1998). Das erste Gurken-Signal kann von den posterior liegenden Follikelzellen aufgenommen werden, und durch die Aktivierung des Rezeptors wird das posteriore Schicksal der Follikelzellen bestimmt. Die posterioren Zellen senden dann ein unbekanntes Signal zur Oocyte zurück, das die Mikrotubuli um den Oocytenkern reorganisiert. Diese Reorganisation ist einerseits notwendig, um die *bicoid* mRNA anterior und die *oskar* mRNA posterior in der Oocyte zu lokalisieren, andererseits gelangt der Oocytenkern dadurch anterior auf eine laterale Seite der Oocyte. In Stadium 9-10 gibt es ein zweites Gurken-Signal, um die dorsalen Follikelzellen zu bestimmen. Die Position des Oocytenkerns definiert also die dorsale Seite der Oocyte (van Eeden und St Johnston, 1999; Riechmann und Ephrussi, 2001). Signale von Decapentaplegic und auch wieder Gurken sind verantwortlich für die Spezifizierung der dorsalen Anhänge (Peri und Roth, 2000). Nur etwa 200 der anterior und posterior liegenden Follikelzellen können auf das erste Gurken-Signal reagieren und werden so posterior oder, wenn sie kein Signal erhalten, anterior. Die anderen lateral liegenden Follikelzellen können nur auf das zweite Gurken-Signal reagieren und werden so dorsal oder ventral (Gonzalez-Reyes und St Johnston, 1998).

Die Differenzierung der Oocyte erfordert die polarisierte Akkumulation von spezifischen Faktoren in einer Zelle. Die Proteine des PAR/aPKC-Komplexes und Par-1 sind schon früh in der Selektion der Oocyte involviert. In *baz*, *DaPKC*, *par-1* und *par-6* Mutanten wird eine Oocyte selektioniert, ihr Zellschicksal kann jedoch mit hoher Penetranz nicht aufrechterhalten werden, es entstehen stattdessen 16 Nährzellen (Cox et al., 2001a; Cox et al., 2001b; Huynh et al., 2001a; Huynh et al., 2001b).

### 1.3 Die atypische Proteinkinase C

In *Drosophila* gibt es nur eine aPKC die eine große Sequenzhomologie zur Maus PKC $\lambda$ , Ratte PKC $\zeta$  und *C. elegans* PKC-3 zeigt (Wodarz et al., 2000). Diese Serin-Threonin Kinase enthält N-terminal eine regulatorische Domäne und C-terminal eine Kinase-Domäne. Abbildung 6 zeigt eine schematische Darstellung der DaPKC und ihrer einzelnen Domänen.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der DaPKC.** Die DaPKC bindet über die PB1-Domäne an Par-6. Die Pseudosubstrat-Sequenz interagiert mit der Kinase-Domäne und hält sie in einem inaktiven Zustand. Über das Zink-Finger-Motiv ist eine Bindung an Par-4 möglich. Die Kinase-Domäne enthält eine ATP-Bindetasche mit dem essentiellen Lysin und einen Aktivierungsloop mit der Phosphorylierungsstelle der PDK-1. Am Turn-Motiv findet eine Autophosphorylierung statt.

Über die PB1 (phagocyte oxidase/Bem1)-Domäne kann die aPKC an Par-6 binden. PB1-Domänen ermöglichen eine Proteinbindung an weitere PB1-Domänen durch Homo- oder Heterodimerisierung und werden je nach Vorkommen von konservierten Aminosäuren in Typ-I und Typ-II klassifiziert. Die Interaktion erfolgt dabei zwischen dem OPCA (OPR, PC, AID)-Motiv von Typ-I und einem konserviertem Lysin von Typ-II. Die aPKC enthält sowohl das OPCA-Motiv als auch das konservierte Lysin K19 und kann dadurch als Bindungspartner für Typ-I und Typ-II dienen. Dies trifft auch für Par-6 zu, allerdings ist eine Bindung beider Proteine nur über das OPCA-Motiv der aPKC und das konservierte Lysin von Par-6 möglich (Noda et al., 2003; Wilson et al., 2003; Hirano et al., 2004; Hirano et al., 2005). Die Pseudosubstrat (PS)-Sequenz, die die aPKC durch Autoinhibition in einem inaktiven Zustand hält, beinhaltet ein Alanin anstelle eines Serins oder Threonins von möglichen Substraten. Über das Zink-Finger-Motiv ist eine Interaktion mit Par-4 möglich. Par-4 (prostate androgen response-4) ist nicht zu verwechseln mit *C. elegans* PAR-4, das in der Zellpolarität involviert ist. Par-4 wurde als ein Kandidat gefunden, dessen Expression während der Apoptose induziert wird (Sells et al., 1994). Der Level von Par-4 steigt auch während neuronaler Degeneration (Guo et al., 1998). Eine Überexpression von Par-4 führt zu Apoptose in Abhängigkeit von seiner Fähigkeit, die Aktivierung der PKC $\zeta$  zu hemmen (Diaz-Meco et al., 1996). C-terminal liegt die Kinase-Domäne mit einer ATP-Binderegion und einem Aktivierungsloop. Die ATP-Binderegion enthält ein Lysin an Position 281, in *Drosophila* K293, das essentiell für die Aktivierung der Kinase ist (Hirai und Chida, 2003). Die Aktivierung der PKC $\zeta$  erfolgt im Allgemeinen über das Freisetzen des PS von der Substrat-Bindetasche durch Lipide und die Phosphorylierung der Kinase-Domäne (Newton, 2001). In Säugerzellen konnte gezeigt werden, dass PIP<sub>3</sub> die Phospho-Inositol-abhängige Kinase-1 (PDK-1) rekrutiert, die PKC $\zeta$  durch direkte Phosphorylierung eines konservierten Threonins an Position 410, in *Drosophila* T422, im Aktivierungsloop aktiviert. Diese Phosphorylierung

führt zu einer Autophosphorylierung an Threonin 560, in *Drosophila* T574, im Turn-Motiv (Le Good et al., 1998; Newton, 2001). Obwohl die Phosphorylierung von T410 absolut notwendig für die Aktivierung ist, ist das Phosphat später überflüssig, nachdem die Phosphorylierung im Turn-Motiv stattgefunden hat (Keränen et al., 1995). PIP<sub>3</sub>, das Cdc42 inhibiert (Liliental et al., 2000), kann durch PTEN (Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten) in PIP<sub>2</sub> umgewandelt werden, und in *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass PTEN direkt an Baz bindet. Dies zeigt eine molekulare Verbindung des Phospho-Inositol-Signalweges mit dem PAR/aPKC-Komplex (von Stein et al., 2005).

### 1.3.1 Die aPKM, eine konstitutiv aktive Form der DaPKC

Neben ihrer Funktion in der Zellpolarität spielt eine Isoform der DaPKC, die aPKM, auch eine wichtige Rolle in der Gedächtnisentwicklung. Dabei beschreibt die Langzeit Potenzierung (LTP, long-term potentiation) eine Modifizierung, die ein Neuron während der Stimulierung erfährt, so als würde das Neuron sich an die Stimulierung erinnern und ihr gegenüber immer empfindlicher werden. Bei der Weiterleitung von Reizen aktiviert eine Stimulierung von Synapsen Signaltransduktionskaskaden, wobei durch proteolytische Abspaltung der N-terminalen regulatorischen Domäne konstitutiv aktive Kinasen entstehen können. Dies ist bei der DaPKC der Fall. Bei der Aufrechterhaltung der LTP ist die PKM die einzige PKC, deren Level ansteigt und auch auf hohem Level erhalten bleibt. Während einer Langzeit Depression (LTD, long-term depression), in der die Sensivität reduziert ist, sinkt der Level von PKM. Untersuchungen in *Drosophila* mit verschiedenen Transgenen der DaPKC zeigten, dass die aPKM das Gedächtnis in *Drosophila* verstärkt. Hemmt man die DaPKC durch Chelerythrin, wird das Gedächtnis gehemmt, nicht aber der Lerneffekt (Drier et al., 2002). Ähnliche Ergebnisse konnten auch in Säugern gezeigt werden (Ling et al., 2002).

### 1.3.2 Der dynamische PAR/aPKC-Komplex

Untersuchungen haben gezeigt, dass der Proteinkomplex aus Baz/Par-3, Par-6 und aPKC dynamisch ist und die Lokalisation der Proteine nicht unbedingt voneinander abhängig ist (Nam und Choi, 2003; Rolls et al., 2003; Harris und Peifer, 2004; Harris und Peifer, 2005). Dabei assoziiert Baz in Photorezeptorzellen oder Epithelzellen mit den Proteinen der ZA, und Par-6 und aPKC lokalisieren weiter apikal (Nam und Choi, 2003; Harris und Peifer, 2004; Harris und Peifer, 2005). Untersuchungen weisen darauf hin, dass Baz unabhängig von den anderen Komponenten zuerst apikal positioniert wird und dann nacheinander aPKC und Par-6 rekrutiert werden (Harris und Peifer, 2005). Das zeigt sich auch in den NB. In *par-6* mutanten NB ist Baz teilweise schwach apikal und aPKC cytoplasmatisch, und in *baz* Mutanten ist

Par-6 cytoplasmatisch (Petronczki und Knoblich, 2001). In den larvalen NB von *aPKC* Mutanten bleibt Baz am apikalen Cortex akkumuliert, wohingegen Par-6 cytoplasmatisch ist (Rolls et al., 2003). Dies deutet darauf hin, dass Baz/Par-3 nicht immer im Komplex mit *aPKC* und Par-6 assoziiert ist. In wandernden Astrozyten sind Par-6 und *aPKC* für die Zellpolarität notwendig, Par-3 ist jedoch nicht Teil dieses Komplexes (Etienne-Manneville und Hall, 2001).

Die Aktivierung der *aPKC* erfolgt durch die Bindung der GTPase Cdc42 an Par-6 (Henrique und Schweisguth, 2003; Etienne-Manneville, 2004; Macara, 2004; Hurd und Margolis, 2005). Strukturanalysen haben gezeigt, dass, trotz der Cdc42-Bindung an Par-6, das PDZ-Bindemotiv von Par-6 für Protein-Protein-Interaktionen mit anderen PDZ-Motiven immer noch zur Verfügung steht (Garrard et al., 2003). Dies ermöglicht eine räumliche Regulierung der *aPKC* durch Rekrutierung anderer Proteine und eine zeitliche Regulierung der *aPKC* durch Cdc42. Da Baz/Par-3, wie oben erwähnt, nicht immer im Komplex mit Par-6 und *aPKC* gebunden vorliegt, könnte dies als Anker für Par-6/*aPKC* dienen (Henrique und Schweisguth, 2003). In MDCK Zellen konnte gezeigt werden, dass *aPKC* die Bindung an Par-3 durch Phosphorylierung der eigenen Bindungsstelle, S827, negativ reguliert (Nagai-Tamai et al., 2002). Es ist möglich, dass der PAR/*aPKC*-Komplex in verschiedenen Formen besteht. Zum einem mit der inaktiven *aPKC*, in dem Baz nicht phosphoryliert ist. Durch die Phosphorylierung an S980 ist es dann möglich, dass eine Konformationsänderung erfolgt und Baz dissoziiert oder über die Bindung mit Par-6 oder eine andere Bindungsstelle mit der *aPKC* weiterhin im Komplex gebunden bleibt (Nagai-Tamai et al., 2002; Benton und St Johnston, 2003b). Es konnte gezeigt werden, dass Baz mit seiner zweiten und dritten PDZ-Domäne an *aPKC* bindet (Wodarz et al., 2000).

Des Weiteren konnte in MDCK Zellen gezeigt werden, dass für die Etablierung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität die Phosphorylierung der Proteinkinase PAR-1b durch *aPKC* notwendig ist. An der TJ phosphoryliert *aPKC* PAR-1b an T595 und generiert dadurch Bindungsstellen für 14-3-3 an PAR-1b (Suzuki et al., 2004). 14-3-3 führt generell zu einer Veränderung der intrazellulären Lokalisation seines Bindungspartners (Tzivion et al., 2001) und dies führt zu einer Dissoziation beider Proteine von der Membran. Grundsätzlich gilt dieses Modell auch für Lgl in *Drosophila* Epithelien und NB (Betschinger et al., 2003; Hutterer et al., 2004), es konnte jedoch gezeigt werden, dass Lgl sich durch Phosphorylierung der *aPKC* an S656, S660 und S664 selbst inhibiert und ins Cytoplasma dissoziiert (Betschinger et al., 2003; Betschinger et al., 2005). Die Aufrechterhaltung der Zellpolarität über PAR-1 verläuft in *Drosophila* umgekehrt. Hier phosphoryliert PAR-1 Baz an S151 und

S1085 und generiert so Bindungsstellen für 14-3-3 an Baz (Benton und St Johnston, 2003b). Diese Bindung verhindert die notwendige Oligomerisierung von Baz und seine Assoziierung an aPKC (Benton und St Johnston, 2003a). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Domäne von Crb durch das Säugerhomolog PKC $\zeta$  an T6 und T9 phosphoryliert wird und somit den Einfluss des Crb-Komplexes auf den Baz-Komplex kontrolliert (Sotillos et al., 2004).

#### 1.4 Themenstellung

Die atypische Proteinkinase C ist in vielen Organismen und Zelltypen in den Prozessen der Zellpolarität, Zellproliferation und Apoptose involviert. Die aPKC kann mit der Pseudosubstratsequenz, die ihre eigene Aktivität reguliert, und einer Protein-Protein-Interaktionsdomäne räumlich und zeitlich sehr gezielt Signalwege durch Phosphorylierung aktivieren oder hemmen. Einige Aktivatoren und Phosphorylierungsziele sowie teilweise die Rekrutierung der aPKC zu ihren Substraten bzw. umgekehrt, sind bekannt. Jedoch ist die genaue Funktion und Notwendigkeit der einzelnen Domänen in den verschiedenen Prozessen noch nicht aufgeklärt. Bisher ist nur ein Null-Allel der *DaPKC* bekannt, das sowohl Defekte in den Epithelien und auch Neuroblasten von homozygoten Larven zeigt. Durch molekulare und phänotypische Charakterisierung verschiedener *DaPKC* Allele, die durch EMS-Mutagenese Punktmutationen in hochkonservierten Bereichen tragen oder durch P-Element Exzision genomische Deletionen aufweisen, sollte die spezifische Rolle der DaPKC in der Etablierung der Zellpolarität in Epithelien, Neuroblasten und während der Oogenese von *Drosophila* untersucht werden. Es wurde gezeigt, dass die DaPKC eine Komponente eines hochkonservierten Proteinkomplexes im apikalen Cortex von Epithelzellen und Neuroblasten ist. Baz und Par-6 sind weitere Komponenten dieses Komplexes, der sehr dynamisch ist und eine wichtige Rolle in der Etablierung der Zellpolarität einnimmt. Es sollte hier untersucht werden, in wieweit sich Baz und Par-6 in Bezug auf die mutante Form der DaPKC verhalten und welchen Einfluss die Mutationen in der DaPKC auf die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Polarität haben. Hierfür wurden Klone erzeugt, in denen die mutante Form der DaPKC, nicht aber das wildtypische Protein exprimiert wurde, um so Aussagen über die Notwendigkeit der Kinaseaktivität der DaPKC und ihre Funktion als Gerüstprotein machen zu können. Des Weiteren wurde untersucht, in wieweit eine verkürzte Isoform der DaPKC, die in der Gedächtnisentwicklung involviert ist, an der Ausbildung der Zellpolarität beteiligt ist.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und allgemeine Materialien

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

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

Sämtliche Lösungen wurden mit demineralisiertem H<sub>2</sub>O angesetzt und gegebenenfalls autoklaviert oder sterilfiltriert.

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

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma *SEQLAB*, Göttingen, durchgeführt.

#### 2.1.1 Photoarbeiten und Bildbearbeitung

Photolichtmikroskop	Axiophot2 und AxioImager, <i>Zeiss</i> , Oberkochen
Konfokales Mikroskop	Leica TCS NT, <i>Leica</i> , Heidelberg Zeiss LSM 510 Meta, <i>Zeiss</i> , Jena
Computersystem	Macintosh PowerPC, <i>Apple</i> , Ismaning
Bildverarbeitung	Adobe Photoshop, <i>Adobe Systems</i> , San Jose, USA

#### 2.1.2 Bakterienstämme

DH5 $\alpha$	Ampizillin-Resistenz
BL21(DE3)	Ampizillin-Resistenz
XL1-blue MRF'	Tetrazyklin-Resistenz
DB 3.1	Chloramphenicol-Resistenz

### 2.1.3 Plasmid-Vektoren

Die angegebenen Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

**Tabelle 2: Verwendete Plasmide.**

Plasmide	Verwendungszweck
pBlueskript KS (+)	Subklonierung, Sequenzierung, ( <i>Stratagene</i> , Heidelberg)
pEntr	Ausgangsvektor für Gateway Klonierung ( <i>Invitrogen</i> )
pAGW	Zielvektor für Gateway Klonierung, N-terminales GFP unter Aktin-Promotor (Murphy lab),

### 2.1.4 Oligonukleotide

Die aufgeführten Oligonukleotide (*BioTeZ*, Berlin) wurden für DNA-Amplifikationen und Sequenzierungen eingesetzt.

**Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide.** Die orange unterlegten Primer wurden für die Sequenzierung der vier aPKC<sup>psu</sup> Punktmutationen auf genomischer DNA verwendet und die gelb unterlegten Primer für die Sequenzierung auf cDNA-Ebene. Für die RT-PCR wurden die blau unterlegten Primer verwendet.

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
aPKC2579	ATATTTTACCCAGCTAGCAAATGC
aPKC2955rev	CGTAAAGTCGTATGGCCTCG
aPKC3092rev	AAATTACAATCGAAATTCCTTAACC
aPKC11011	GCAGCAGCAACAGCAATCGCAGACCT
aPKC12377rev	CTGCCACCGCCCGAGTCA
aPKC12596	TAGTACACGAGTGCATCCACTACG
aPKC12706rev	ATTGAAGCTGGTGCTGTGACATCTGCTGC
aPKC14052rev	AAGGCGGCCAGAAGTCATAGAGTG
aPKC14913	AAAGTGGCTAATGAACACATTCTC
aPKC15517	GTTCCAGCGTGCTTTCTGTGCC
aPKC15643rev	GCCATAAGCTTGTGCAGAAGCACTGC
aPKC15828	GCCAGTATTCGCTGAACGACTTCG
aPKC16443rev	GGAGCCTCAGAGAATCCCGATC
aPKC16457	GGAGCCTCAGAGAATCCCGATC
aPKC16580rev	TCGTCTTCTCCAGGATCACTTGG
aPKC18302rev	TGGAAGGCAAAACATGTGCTGC

## 2.2 Genetische Methoden

### 2.2.1 Fliegenzucht

Die verwendeten Stämme wurden bei 18°C, RT und 25°C auf einem wie in (Ashburner, 1989) beschriebenen Standardmedium gehalten. Eiablagen wurden auf Apfelsaft-Agarplatten angesetzt, die zur Stimulation der Fliegen mit Hefe bestrichen wurden.

Standardmedium: 356g Maisschrot, 47.5g Sojamehl, 84g Trockenhefe, 225g Malzextrakt, 75ml 10% Nipagin, 22.5ml Propionsäure, 28g Agar, 20 g Zuckerrübensirup mit 4.9l Wasser auffüllen.

### 2.2.2 Fliegenstämme

In der folgenden Tabelle sind alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Fliegenstämme zusammengefasst.

**Tabelle 4: Verwendete Fliegenstämme für die hier durchgeführten Versuche.**

Bezeichnung	Genotyp	Beschreibung	Referenz
DaPKC <sup>k06403</sup>	$y^1 w^{67c23}; P[w^+ DaPKC^{k06403}] / CyO$	P-Element Insertion in 51D7-8, im dritten Intron der DaPKC	Bloomington #10622
DaPKC <sup>rev48</sup>	$y^1 w^{67c23}; P[w^+ DaPKC^{k06403}] rev / CyO$	Revertanter Stamm durch Mobilisierung des P-Elementes	Wodarz
DaPKC <sup>rev55</sup>	$y^1 w^{67c23}; P[w^+ DaPKC^{k06403}] rev / CyO$	Revertanter Stamm durch Mobilisierung des P-Elementes	Wodarz
DaPKC <sup>rev56</sup>	$y^1 w^{67c23}; P[w^+ DaPKC^{k06403}] rev / CyO$	Revertanter Stamm durch Mobilisierung des P-Elementes	Wodarz
DaPKC <sup>k06403</sup> , FRT42B	$w; FRTG13 P[>w^+], FRT] 42B, l(2)k06403, c, px, sp / CyO, P[hs-hid, w^+]$	P-Element Insertion in 51D7-8, im dritten Intron der DaPKC	Luschnig et al., 2004
DaPKC <sup>psu69</sup>	$w; FRTG13 P[>w^+], FRT] 42B, l(2)k06403, c / CyO, P[hs-hid, w^+]$	Durch EMS-Mutagenese entstandenes DaPKC-Allel, C122Y	Luschnig et al., 2004
DaPKC <sup>psu141</sup>	$w; FRTG13 P[>w^+], FRT] 42B, l(2)k06403, c, px, sp / CyO, P[hs-hid, w^+]$	Durch EMS-Mutagenese entstandenes DaPKC-Allel, F432I	Luschnig et al., 2004
DaPKC <sup>psu265</sup>	$w; FRTG13 P[>w^+], FRT] 42B, l(2)k06403, c, px, sp / CyO, P[hs-hid, w^+]$	Durch EMS-Mutagenese entstandenes DaPKC-Allel, A291V	Luschnig et al., 2004
DaPKC <sup>psu417</sup>	$w; FRTG13 P[>w^+], FRT] 42B, l(2)k06403, c, px, sp / CyO, P[hs-hid, w^+]$	Durch EMS-Mutagenese entstandenes DaPKC-Allel, G347N	Luschnig et al., 2004
Df Jp1	$W^a N^{a-g}; Df (2R) Jp1$	Defizienz im Bereich der DaPKC, Bruchpunkte 51D03-08;52F05-09	Bloomington #3518

Par6 <sup>Δ226</sup>	<i>w DmPar6<sup>Δ226</sup> P[w<sup>+</sup>, FRT]9-2/FM7c ftz::lacZ</i>	Deletion der Aminosäuren 1-121 in DmPar6	Petronczki und Knoblich, 2001
ovo FRT 18E	<i>ovo<sup>D2</sup> v<sup>24</sup> P[w<sup>+</sup>, FRT]9-2/C(1)DX, y<sup>1</sup>f<sup>d</sup>/Y; P[ry<sup>+</sup>, hs-Flp]38</i>	Zur Erzeugung von Keimbahnklonen	Bloomington #1843
ovo FRT 42B	<i>P[w<sup>+mW</sup>, FRT]G13 P[w<sup>+mC</sup>, ovo<sup>D1-18</sup>]2R /T(1;2)OR64/CyO</i>	Zur Erzeugung von Keimbahnklonen	Boomington #4434
FRT 2R GFP	<i>w<sup>1118</sup>; P[w<sup>+</sup>, FRT]G13 P[Ubi-GFP.nls]2R1 P[Ubi-GFP.nls]2R2</i>	Zur Erzeugung von Keimbahnklonen	Bloomington #5826
FRT 2L2R	<i>w<sup>1118</sup>; P[neoFRT]40A P[FRT, w]G13/CyO</i>	Zur Erzeugung Keimbahnklonen	Bloomington #8217
ywhs-Flp; Sco/CyO	<i>P[hsFlp]12, y<sup>1</sup>, w<sup>1118</sup>; noc<sup>Sco</sup>/CyO</i>	Zur Erzeugung von Keimbahnklonen	Bloomington #1929

### 2.2.3 Erzeugung von Keimbahnklonen

Die Technik zur Herstellung von Keimbahnklonen ist vor allem dann hilfreich, wenn homozygot mutante Tiere nicht lebensfähig sind. Hierbei wird dann in heterozygot mutanten Tieren eine homozygot mutante Keimbahn erzeugt und so die maternale Komponente ausgeschaltet. So können Aussagen darüber gemacht werden, ob und in wieweit das Gen für die Oogenese oder die frühe Entwicklung des Embryos notwendig ist. Die Klone in der Keimbahn werden mit Hilfe des FLP-FRT-Systems erzeugt (Chou und Perrimon, 1992).

#### 2.2.3.1 Das FRT-FLP-System

Zur Herstellung von Keimbahnklonen wird das FRT (flipase recombination target)–FLP (Flipase)-System aus der Hefe verwendet. Das FRT besteht aus 599bp invertierten Sequenzwiederholungen. Die Flipase, hier unter Kontrolle eines Hitzeschock-Promotors, katalysiert eine Rekombination spezifisch zwischen den Stellen, die eine FRT-Sequenz tragen. In heterozygoten Fliegen mit FRT-Sequenzen kann die Flipase eine mitotische Rekombination zwischen diesen beiden Chromosomen auslösen, so dass homozygote Zellen entstehen (Golic und Lindquist, 1989).

#### 2.2.3.2 Erzeugung von ovo<sup>D</sup>- und GFP-Keimbahnklonen

Kreuzungen zur Erzeugung von ovo<sup>D</sup>- und GFP-Keimbahnklonen wurden durchgeführt, um Embryonen zu erhalten, die das FRT mit einer Sterilmutation oder einem GFP-Transgen-Konstrukt als Marker transheterozygot zu einem Allel der *DaPKC* tragen. Die Flipase auf dem ersten Chromosom katalysiert dann während des zweiten Larvenstadiums die mitotische Rekombination zwischen den FRT-Sequenzen (Abbildung 7).

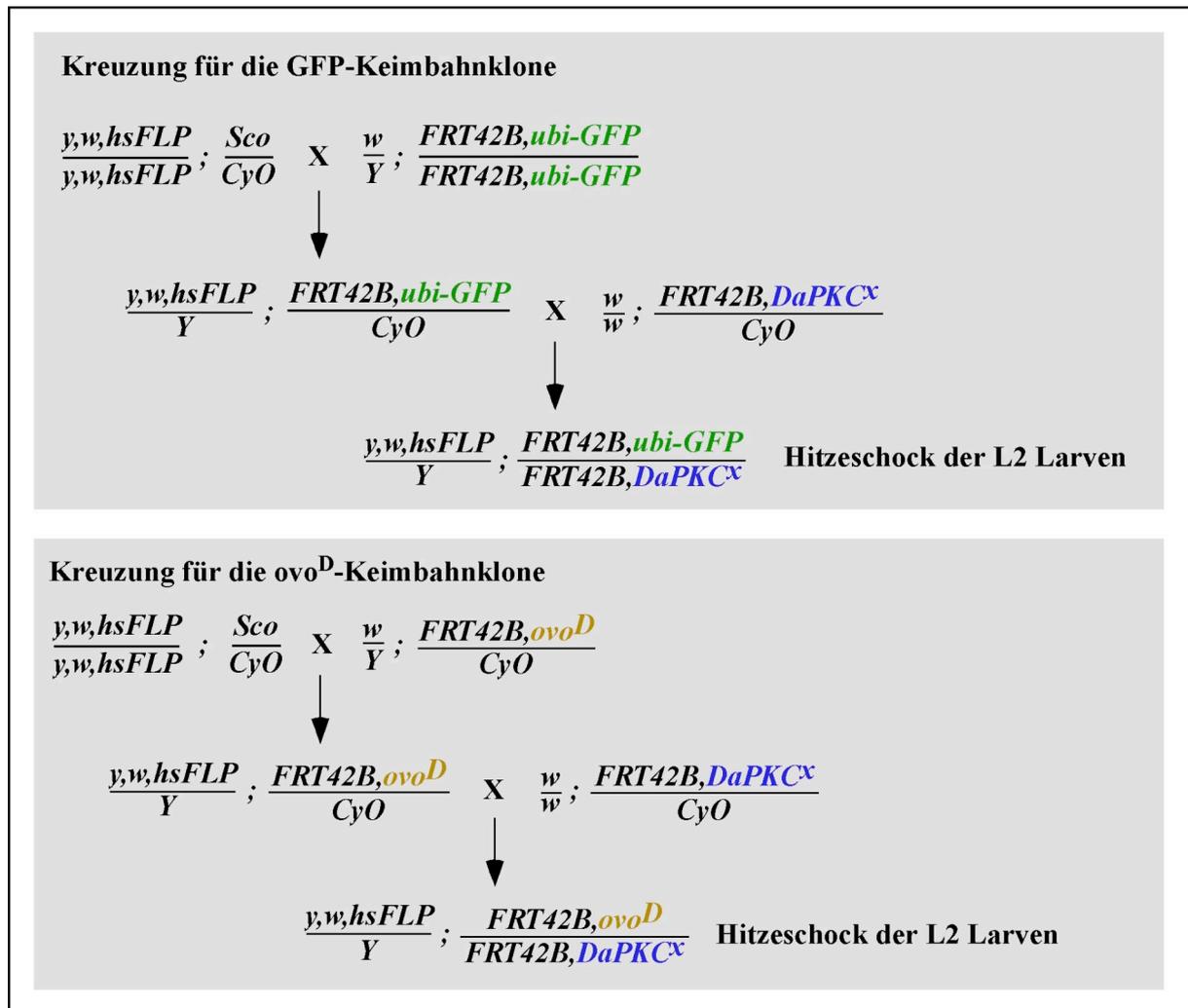
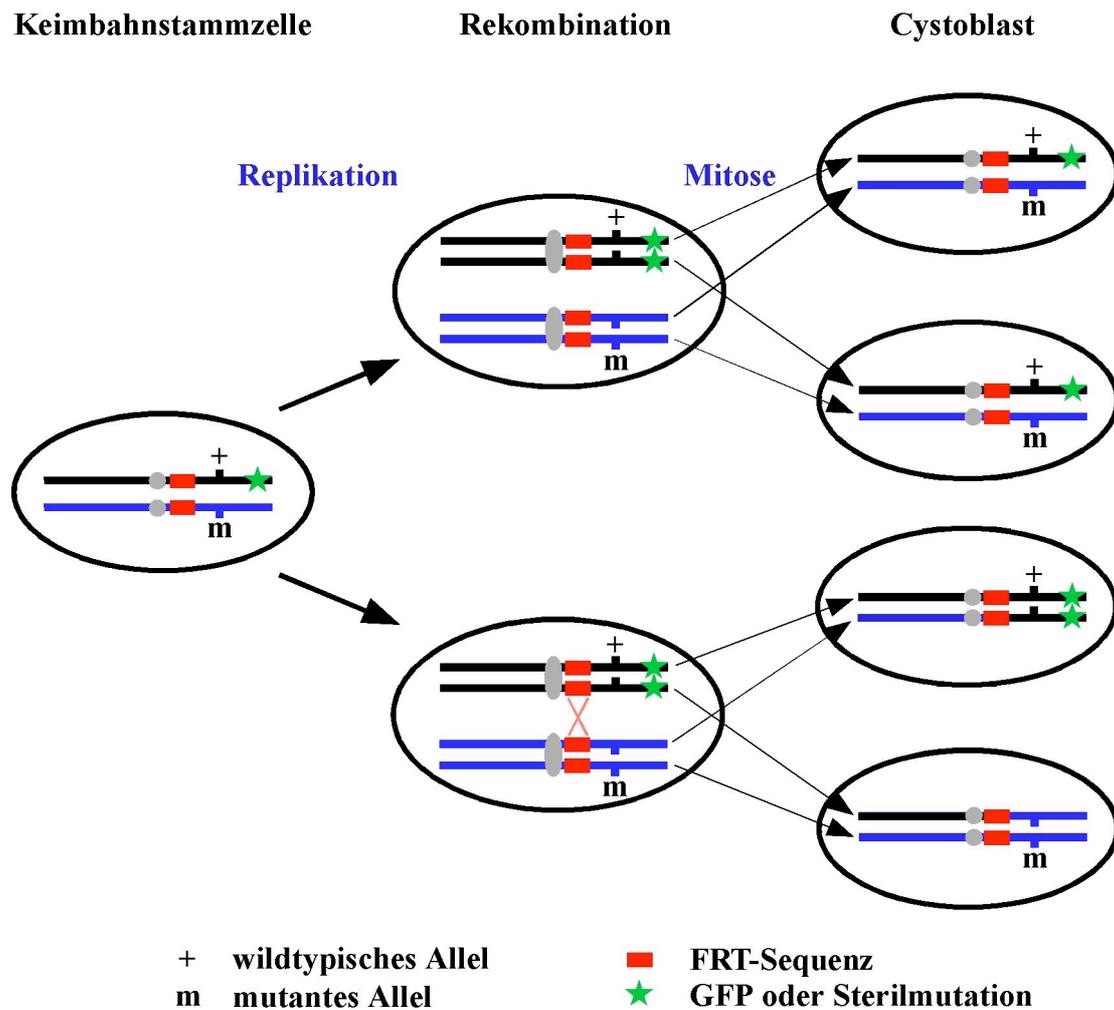


Abbildung 7: Kreuzungen zur Herstellung von GFP- und ovo<sup>D</sup>-Keimbahnklonen.

In den sich entwickelnden heterozygoten Tieren entsteht dann eine für das *DaPKC* Allel homozygot mutante Keimbahn. Die dominante, weibliche Sterilmutation, *ovo<sup>D</sup>*, führt später dazu, dass die Entwicklung der Eikammern, die homozygot oder heterozygot für *ovo<sup>D</sup>* sind, abbricht. Es können sich nur Eikammern weiterentwickeln, die homozygot mutant für das *DaPKC* Allel sind. Sollte auch hier die Oogenese abbrechen, so ist dies auf das mutante Allel zurückzuführen. Nach dem gleichen Modell werden GFP-markierte Keimbahnklone erzeugt. Anstelle der Sterilmutation wird ein GFP-Transgen-Konstrukt als Marker verwendet. Eikammern, die homozygot oder heterozygot für das GFP-Transgen sind, tragen auch mindestens eine wildtypische Kopie des *DaPKC* Allels. Nur Eikammern, die das GFP nicht exprimieren, sind homozygot mutant für das Allel und können auf diese Weise selektiert werden (Abbildung 8).

Zur Induktion der Flipase wird ein Hitzeschock bei 37°C im zweiten Larvenstadium und 24h später noch einmal für jeweils 2h im Wasserbad durchgeführt.



**Abbildung 8: Mitotische Rekombination zur Erzeugung von  $ovo^D$ - und GFP-Keimbahnklonen.** Die Flipase katalysiert, durch einen Hitzeschock induziert, die Rekombination zwischen den FRT-Sequenzen. Die durch den grünen Stern markierte dominante, weibliche Sterilmutation verhindert die Oogenese in den Cystoblasten, die noch eine wildtypische Kopie für eine rezessive Letalmutation (m) tragen. Nur der Cystoblast, der durch die mitotische Rekombination homozygot für die Mutation (m) ist und keine Sterilmutation trägt, kann die Oogenese weiter durchlaufen, es sei denn, die Mutation selbst führt zu Defekten in der Oogenese. Für die GFP-Keimbahnklone markiert der grüne Stern GFP, das in dem homozygot mutanten Cystoblast fehlt.

### 2.2.3.3 Erzeugung von Zellklonen in Follikelzellen

Die Follikelzellen, die die Keimzellen umgeben, sind somatischer Herkunft und sind bei der Erzeugung von Keimbahnklonen nicht betroffen. Klone im Follikelepithel werden in ähnlicher Weise erzeugt, wie die Keimbahnklone. Für die Follikelzellklone wird der Hitzeschock von 37°C bei 3-5 Tage alten Fliegen für 1h durchgeführt. In einem Zeitraum von 3-5 Tagen nach dem Hitzeschock werden die Ovarien präpariert. Auch hier weist der Verlust des GFP-Transgen-Konstruktes auf homozygot mutante Zellklone hin.

## 2.3 Histologische Methoden

### 2.3.1 Kutikula Präparation

Die Embryonen (Wildtypen 24h, Mutanten 48h) werden zunächst mit H<sub>2</sub>O gewaschen und dann mit 50% Na-Hypochlorit für 5min dechorionisiert. Nach fünf weiteren, kurzen Waschungen werden die Embryonen mit einem Pinsel auf einen Objektträger überführt und in Hoyers Medium/Lactat eingedeckelt. Die Klärung der Präparate erfolgt über Nacht bei 65°C.

### 2.3.2 Antikörperfärbung an Embryonen

Wie bei der Kutikula-Präparation werden die Embryonen zunächst mit H<sub>2</sub>O gewaschen, mit NaOCl dechorionisiert und erneut gewaschen. Die Embryonen werden dann für 15min in Szintillationsröhrchen in einem 1:1 Gemisch aus 4% Formaldehyd in PBS (10x PBS: 1.3M NaCl, 70mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 30mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) und Heptan fixiert. Die Fixierung führt zu einer Vernetzung des Gewebes und zu einer Hemmung der Proteasen durch Formaldehyd, das auch die Proteine durch Bindung an die NH<sub>3</sub>-Gruppen bindet und stabilisiert. Das Fixativ (untere wässrige Phase) wird abgesaugt und ein Volumen Methanol zugegeben. Durch 30sec langes Schütteln werden die Embryonen devitellinisiert. Die abgesunkenen Embryonen werden in ein Eppendorfgesäß überführt und zweimal kurz mit Methanol gewaschen. Nach sechs Waschungen für jeweils 10min in PBT (PBS mit 0.1% Tween 20) erfolgt die Vorinkubation in Blockierlösung (5% Normal Horse Serum in PBT) für 30min, um unspezifische Bindungsstellen für die Antikörper abzublocken. Der erste Antikörper wird über Nacht bei 4°C verdünnt in Blockierlösung zu den Embryonen gegeben. Nach mehreren Waschschritten (6x 10min) werden die Embryonen mit dem zweiten Fluoreszenz-Antikörper verdünnt in Blockierlösung für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach wiederholten Waschschritten (6x 10min) werden die Embryonen in Mowiol/DABCO (1,4-DIAZABICYCLO(2.2.2)OCTANE) eingedeckelt.

Mowiol: 5g Elvanol (Mowiol Höchst) werden in 20ml PBS pH 7.4 gelöst. 10ml Glycerin werden hinzugegeben und für 16h gerührt. Es wird für 15min bei 12000rpm zentrifugiert und der Überstand verwendet. Zur Anwendung wird eine Spatelspitze DABCO gegen das Ausbleichen hinzugegeben und für 30min auf den Taumler gestellt.

### 2.3.3 Antikörperfärbung an Ovarien

Die Ovarien werden in PBS oder PO<sub>4</sub> (0.1M Phosphatpuffer pH 7.2, 68.4ml 1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 31.6ml 1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ad 1000ml) präpariert und, mit Hilfe einer mit NHS abgesättigten 1000µl Spitze, durch Hoch und Herunterziehen in der Pipette vereinzelt. Sie werden dann 15min fixiert (4% Formaldehyd in PBS) und anschließend 3x 10min in PBT oder PO<sub>4</sub>T (PO<sub>4</sub>

mit 0.1% Tween 20) gewaschen. Das Blocken wird in 5% NHS in PBS bzw. PO<sub>4</sub> + 0.5% Triton X-100 für 3h bei RT oder über Nacht bei 4°C durchgeführt. Die Inkubation des ersten Antikörpers erfolgt über Nacht bei 4°C. Nach wiederholten Waschungen (5x 10min) mit PBT bzw. PO<sub>4</sub>T erfolgt die Inkubation des zweiten Fluoreszenz-Antikörpers für 2h bei RT. Die Ovarien werden nach mehreren Waschungen (4x 10min) ebenfalls in Mowiol/DABCO eingedeckelt.

### 2.3.4 Antikörperfärbung an Schneider Zellen

Für die Antikörperfärbung werden je ein Tropfen Zellen zusammen mit S2-Medium auf ein mit Poly-L-Lysin beschichtetes Chamberslide gegeben. Innerhalb der nächsten 3h setzen sich die Zellen ab und bleiben am Boden haften. Die Zellen werden einmal mit PBS gewaschen und dann für 10min mit 4% Formaldehyd fixiert. Nach dreimaligem vorsichtigem Waschen mit PBS bleiben die Zellen noch für 30min in Blockierlösung (5% NHS in PBS). Dann erfolgt die Inkubation des ersten Antikörpers in Blockierlösung für 1h. Nach dreimaligem Waschen folgt der zweite Antikörper und nach wiederholtem Waschen werden die Kammerwände abgebrochen, das Gummi vorsichtig entfernt und die Zellen in Mowiol/DABCO eingedeckelt.

### 2.3.5 Verwendete Antikörper

Für die Färbungen werden folgende Primär- und Sekundärantikörper verwendet.

**Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper.** Aufgelistet sind hier die verschiedenen Primärantikörper für die Färbungen an den Embryonen und Ovarien und für den Immunoblot.

Epitop	Organismus	Bezeichnung	Verdünnung	Hersteller/Zitat
aPKC	Kaninchen	nPKC ζ (C20)	1:1000	Santa Cruz Biotechnology #sc-216
p-aPKC	Kaninchen	phospho-nPKCζ (T410)	1:1000	Santa Cruz Biotechnology #sc-12894-R
aPKC	Kaninchen	PKCsigma	1:1000	Sigma #P0713
Bazooka	Kaninchen, Ratte	Baz N-Terminus	1:1000	Wodarz et al., 1999
Neurotactin	Maus	BP 106	1:5	Hortsch et al., 1990
DE-Cadherin	Ratte	DCAD 2	1:20	Uemura et al., 1996
Crumbs	Maus, Ratte	cq 4, F1	1:10, 1:500	Tepass und Knust, 1993
Armadillo	Maus	7A1	1:50	Peifer et al., 1994
Inscuteable	Kaninchen	Insc	1:1000	Kraut et al., 1996
Discs large	Kaninchen	Dlg	1:1000	Woods und Bryant, 1991
Staufen	Kaninchen	Staufen	1:500	St Johnston et al., 1991
Gurken	Maus	1D12	1:20	DSHB, Queenan et al., 1999
Miranda	Meerschweinchen	Miranda-120	1:1000	A. Wodarz
Par6	Meerschweinchen	Par6	1:1000	A. Wodarz

Aktin	Kaninchen	Aktin	1:2000	Sigma #A2066
Orb	Maus	4H8	1:20	DSHB, Lantz et al., 1994
F-Actin		rhodamin-phalloidin	1:1000	Molecular Probes #R415
Lgl	Kaninchen	Lgl	1:100	Betschinger et al., 2003
p-Lgl	Kaninchen	phospho-Lgl	1:200	Betschinger et al., 2003
Vasa	Ratte	Vasa	1:5000	Tomancak et al., 1998
GFP	Kaninchen	GFP	1:2000	Molecular Probes #A11122
$\beta$ -Gal	Kaninchen	$\beta$ -Galaktosidase	1:50	MP Biomedicals #55976
E7	Maus	$\beta$ -Tubulin	1:500	DSHB, Chu und Klymkowsky, 1989

**Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper.** Aufgelistet sind hier die verschiedenen Sekundärantikörper für die Färbungen an den Embryonen, Ovarien und Zellen. Bei Doppelfärbungen werden die Sekundärantikörper mit verschiedenen Konjugaten eingesetzt.

Name	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
Esel- $\alpha$ -Kaninchen	Cy2, Cy3	1:200	Dianova
Ziege- $\alpha$ -Kaninchen	Cy5	1:200	Dianova
Esel- $\alpha$ -Ratte	Cy2, Cy3	1:200	Dianova
Ziege- $\alpha$ -Ratte	Cy5	1:200	Dianova
Esel- $\alpha$ -Maus	Cy2, Cy3	1:200	Dianova
Ziege- $\alpha$ -Maus	Cy5	1:200	Dianova
Esel- $\alpha$ -Meerschweinchen	Cy2, Cy3	1:200	Dianova
Ziege- $\alpha$ -Meerschweinchen	Cy5	1:200	Dianova
Ziege- $\alpha$ -Kanninchen	HRP	1:10000	Dianova
Ziege- $\alpha$ -Meerschweinchen	HRP	1:10000	Dianova
Ziege- $\alpha$ -Ratte	HRP	1:10000	Dianova

### 2.3.6 DNA-Fluoreszenz-Markierung

Die DNA-Markierung kann mit dem Fluoreszenzmarker Yoyo-1 durchgeführt werden. Dafür werden Dnase-freie RNase (10 $\mu$ g/ml) und Yoyo-1 (1:10000) während der Inkubation mit dem zweiten Antikörper hinzugegeben.

DAPI ist ein weiterer DNA-Marker, der innerhalb kurzer Zeit an DNA bindet. Sein Vorteil liegt darin, dass es durch die Zellmembran geht und somit auch lebende Zellen anfärbt. Zudem liegt sein Emissionsmaximum im kurzwelligem Bereich und daher treten kaum Überlappungen mit anderen bekannten Farbstoffen auf, die ihr Emissionsmaximum im längerwelligen Bereich haben. DAPI interkaliert auch in RNA, jedoch ist die Emission in einem anderen Maximum als DNA, daher kann man spezifisch DNA anfärben.

### 2.3.7 GFP-Kernfärbung

Beim GFP (green fluorescent protein) handelt es sich um ein Protein aus der Qualle *Aequorea victoria*, das durch UV-Licht angeregt grün leuchtet. Das hier verwendete *Ubi*-GFP Transgen zur Unterscheidung der unter 2.2.3.2 erzeugten Klone trägt eine nls (nuclear localisation signal)-Sequenz und wird unter dem *ubiquitin*-Promotor getrieben. *Ubiquitin* wird in allen Zellen exprimiert. Durch die nls-Sequenz wird das GFP dann in den Kern transportiert und färbt so die Kerne an. Das GFP ist nicht toxisch, und seine Expression stört weder das Zellwachstum noch die Funktion (Yeh et al., 1995).

### 2.3.8 TUNEL-Färbung

Bei der Apoptose findet eine DNA-Fragmentierung durch Endonukleasen statt. Diese Nukleasen degradieren die höher geordnete Chromatinstruktur in 50 bis 300kb Fragmente und anschließend in kleine DNA Stücke von ungefähr 200bp Länge. Beim TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) katalysiert TdT (terminale Desoxynukleotidyl-Transferase) die Anheftung von fluoreszierenden dUTP an das 3'OH-Ende von doppelsträngiger oder einzelsträngiger DNA. So ist es dann möglich, im Zellverband in einzelnen Zellen Zelltod nachzuweisen. Die TUNEL-Färbung erfolgt mit dem TUNEL assay kit von *Roche Boehringer Mannheim* nach Angaben des Herstellers.

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1 Isolierung genomischer DNA aus *Drosophila*

Alle Schritte der DNA-Isolierung erfolgen, falls nicht anders erwähnt, auf Eis. Ein Eppendorfgefäß mit ca. 50 Fliegen wird für 10min in flüssigen N<sub>2</sub> getaucht. Nach einigen Sekunden, damit der Puffer nicht direkt gefriert, werden 200µl Puffer A (100mM Tris pH 7.5, 100mM EDTA, 100mM NaCl, 0.5% SDS) in das Eppendorfgefäß gegeben und die Fliegen mit einem Biovortexer (*Biospec Products*, Bartlesville, USA) für 2min zermörsert. Daraufhin werden wieder 200µl Puffer A dazu gegeben und die Fliegen für weitere 2min zermörsert. Dann erfolgt eine Inkubation für 30min bei 65°C. Das im Puffer gelöste SDS ist ein Detergenz, das Proteine denaturiert, indem es durch Wechselwirkung seines hydrophoben Teils mit dem Rückgrat der Proteine eine Dissoziation dieser in ihre Untereinheiten bewirkt. EDTA ist ein Chelator, der zweiwertige Kationen komplexiert und so DNAsen hemmt, da sie Mg<sup>2+</sup> benötigen. Schließlich werden 800µl einer LiCl/KAc-Lösung (1Teil 5M KAc/2.5Teile 6M LiCl) dazugegeben und für 30min auf Eis gestellt, um die Proteine zu fällen. Es findet

dann eine Zentrifugation mit 13000rpm für 15min bei RT statt. 1ml des Überstandes werden mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze abgenommen, um eine mechanische Zerkleinerung der DNA zu verhindern, und in ein neues Eppendorfgesäß überführt. Sollte der Überstand nicht klar sein, wird erneut zentrifugiert. Dann werden 600µl Isopropanol zum Fällen der DNA hinzugegeben. Die DNA ist normalerweise in Wasser gelöst, das eine Hydrathülle um die DNA bildet und sie so in Lösung hält. Durch die Zugabe von hohen Mengen an Salzen lagert sich viel Salz an die DNA an. Der zugegebene Alkohol verdrängt das Wasser, und die DNA kann mit dem Salz ausfallen. Es bildet sich ein Pellet nach einer Zentrifugation mit 13000rpm für 15min bei RT. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen, und die DNA mit 70% Ethanol gewaschen. Darin können sich die an der DNA angelagerten Salze lösen. Nach dem Trocknen wird die DNA in 50µl TE-Puffer pH 8.0 (10mM Tris, 1mM EDTA) gelöst und bei 4°C gelagert. Zur RNase-Behandlung wird 0.1mg/ml RNase A zu der gelösten DNA gegeben und für 30min bei 37°C inkubiert.

#### 2.4.2 Isolierung von polyA<sup>+</sup>-RNA

Nach der Transkription wird an das 3'-Ende eukaryotischer mRNA eine Sequenz von Poly-Adenosin fusioniert. Dieses Merkmal der Poly-A-Sequenz ermöglicht es, die mRNA aus Geweben und einem RNA-Gemisch zu isolieren. Der Anteil der mRNA an der Gesamt-RNA beträgt ca. 2%. Die Isolierung erfolgt nach dem *µMACS mRNA Isolation Kit* der Firma *Miltenyi Biotec*. Das Prinzip beruht auf Oligo-dT-Sequenzen, die an magnetische Kügelchen gebunden sind. Gibt man das Zelllysat hinzu, bindet der Poly-A-Schwanz der mRNA-Moleküle an die Oligo-dT-Sequenzen und wird an die Kügelchen gekoppelt. Zunächst erwärmt man den Lysis- und Wasch-Puffer auf RT und den Elutions-Puffer auf 65°C. Bis zu 30mg Material (hier Köpfe von Fliegen) wird dann im Mörser mit flüssigem N<sub>2</sub> homogenisiert und mit 1ml Lysis-Puffer versetzt für 3min gevortext. Es wird dann kurz für 3min bei 13000rpm zentrifugiert und der Überstand auf eine Säule gegeben, um die Viskosität zu reduzieren. Es wird dann nochmals unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert und der Überstand mit 50µl "Oligo-dT-MicroBeads" gemischt. Dies wird dann auf eine mit 100µl Lysis-Puffer äquilibrierte MACS Säule Type µ gegeben und die Säule zweimal mit 200µl Lysis-Puffer, um Proteine und DNA zu entfernen, und viermal mit je 100µl Wasch-Puffer, um rRNA und DNA zu entfernen, gewaschen. Die mRNA wird in 120µl vorgeheiztem Elutions-Puffer eluiert. Der zweite bis vierte Tropfen, der aus der Säule kommt, wird aufgefangen und sollte ca. 90% der isolierten mRNA in einem Volumen von 75µl enthalten. Die mRNA wird entweder direkt weiter verwendet oder bei -70°C eingefroren.

### 2.4.3 Präparation von Plasmid-DNA

Bei der Schnellpräparation in kleinem Maßstab (Minipräp) werden 1ml einer Übernachtskultur für 30sec bei 13000rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in 150µl Puffer S1 (50mM Tris pH 8.0, 10mM EDTA, 100µg RNase A/ml) resuspendiert, mit 150µl Puffer S2 (20mM NaOH, 1% SDS) invertiert und für 2min inkubiert. Nach Zugabe von 150µl Puffer S3 (3.0M KAc pH 5.5) wird invertiert und für 10min bei 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand wird mit 300µl Isopropanol für 30min bei 13000rpm gefällt und das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Die Präparation von Plasmid-DNA in größerem Maßstab (Midipräp) wurde nach Angaben des Herstellers mit dem Nucleobond AX Kit, *Macheray-Nagel*, Düren, durchgeführt.

### 2.4.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgt in der Regel mit einem Photometer, wobei reine DNA bei einer Wellenlänge von 260nm ihr Maximum an Absorption zeigt. Da Proteine bei 280nm absorbieren, lässt sich aus dem Quotienten dieser Werte auch die Reinheit der DNA bestimmen.

### 2.4.5 Transformation elektrokompetenter Zellen

Plasmide, die durch Isolation oder Ligation gewonnen werden, werden in Bakterien transformiert, um sie zu vervielfältigen. Die Transformation kann durch Elektroporation durchgeführt werden. Zunächst werden eine Elektroküvette und 50µl der elektrokompetenten Zellen (XL-1 blue) auf Eis gestellt und 100ng der Plasmid-DNA auf die Zellen gegeben, vorsichtig vermischt, in die Küvette überführt und bei 1,8 kV mit dem MicroPulser von *Biorad* transformiert. Es werden dann 500µl LB-Medium (10g Bacto-Trypton, 5g Hefe-Extrakt, 10g NaCl auf 1l auffüllen) in die Küvette gegeben und die transformierten Zellen resuspendiert. Die Zellen werden dann auf eine LB-Agar-Platte mit Antibiotikum (z. B. 100µg/ml Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.4.6 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Die Transformation von Plasmid-DNA kann auch durch einen Hitzeschock in chemisch kompetente Zellen (XL-1 blue) erfolgen. Hierfür werden 50µl der chemisch kompetenten Zellen auf Eis gestellt und 100ng Plasmid-DNA hinzugegeben. Zellen und Plasmid werden für 45sec einem Hitzeschock von 42°C unterzogen. Die Zellen werden anschließend auf Eis gestellt, in 500µl LB-Medium resuspendiert, eine LB-Agar-Platte mit Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 2.4.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Das Prinzip der PCR ist die Vermehrung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden. Voraussetzung für den Einsatz von PCR-Methoden ist die Information über die Nukleotid-Sequenzen beiderseits des interessierenden DNA-Abschnittes und die Verfügbarkeit von geeigneten Oligonukleotiden. Die PCR besteht aus drei Schritten. Bei der Denaturierung wird die DNA durch Erhitzen auf 95°C aufgetrennt. Beim Annealing paaren sich die Primer mit der einzelsträngigen DNA, und bei der Elongation erfolgt die Synthese des Stranges bei 72°C, da hier die Taq Polymerase ihr Optimum hat. Die DNA-Polymerase heftet Nukleotide an die 3'-OH-Primer-Enden und synthetisiert komplementäre DNA-Sequenzen. Diese Zyklen (Denaturierung, Annealing/Hybridisierung, Synthese) werden mehrmals wiederholt, so dass geringe Mengen einer DNA-Sequenz um das millionenfache amplifiziert werden können. Im Gegensatz zu der Pfu-Polymerase, die für Klonierungen verwendet wird, hat die Taq-Polymerase keine Korrekturaktivität, die Amplifikate sind also nicht zu 100% identisch.

#### 2.4.8 RT-PCR

Bei der RT-PCR geht der eigentlichen PCR eine reverse Transkription (RT) voraus, in der ausgehend von polyA<sup>+</sup>-RNA einzelsträngig DNA gebildet wird. Ermöglicht wird dies durch reverse Transkriptasen aus RNA-enthaltenden Retroviren wie z.B. dem avian myeloblastosis virus (AMV), dem Moloney murine leukemia virus (MMLV) oder dem human immunodeficiency virus (HIV). Neben ihrer RNA-abhängigen DNA-Polymerase-Funktion besitzen diese eine RNase H-Aktivität zum Abbau der RNA im entstehenden RNA-DNA-Hybrid. Für die RT-PCR wurde das OneStep RT-PCR Kit der Firma *QIAGEN*, Hilden, nach Herstellerangaben verwendet.

#### 2.4.9 In-vitro-Transkription zur Synthese dsRNA für RNA-Interferenz (RNAi)

Für die RNAi in S2-Zellen wurde zunächst ein DNA-Abschnitt der PDK-1 amplifiziert. Dabei wurden Primer verwendet, die die Sequenz für die Bindung der T7-Polymerase beinhalten. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde für die in-vitro-Transkription (*Ambion*) zur Herstellung einzelsträngiger RNA (ssRNA) verwendet und nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2µl	10x Puffer
8µl	rNTPs
2µl	Enzym-Mix
7µl	DNA (1µg)
1µl	Nuclease freies Wasser (ad 20µl)

Die Synthese erfolgt in einem Reaktionsgefäß bei 37°C für 3h, anschließend wird der Reaktionsansatz mit 1µl DNase versetzt und bei 37°C für 45min inkubiert und nach einer Phenol/Chloroform-Aufreinigung in 25µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Um doppelsträngige RNA (dsRNA) zu erhalten wird die ssRNA zunächst für 30min auf 65°C erhitzt. Beim langsamen Abkühlen auf RT lagern sich die ssRNA-Moleküle aneinander an und liegen so als dsRNA vor.

#### 2.4.10 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese werden geladene Moleküle in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Die DNA ist durch das Phosphatrückgrat insgesamt negativ geladen und wandert daher zur Anode. Die Auftrennung findet in einer Matrix (hier Agarose) statt, die wie ein Molekularsieb wirkt. Kleine Moleküle bewegen sich schneller hindurch als große. Agarose ist ein aus Algen gewonnenes pulvriges Polysaccharid, das sich unter anderem in TAE-Puffer (40mM Tris-Ac, 1mM EDTA pH 8.0) beim Erhitzen löst und beim Erkalten zu einem Gel erstarrt. Bei einer Agarosekonzentration von 0,8% liegt der Auftrennungsbereich linearer DNA bei ca. 0.5-10kb. Vor dem Auftragen werden die DNA-Proben mit Blaumarker (0.09% Bromphenolblau, 60% Glycerin, 60mM EDTA) versetzt, damit die Probe in die Tasche absinkt und verfolgt werden kann, wie weit die kleineren Moleküle im Gel schon gelaufen sind. DNA-Moleküle werden im Gel durch Ethidiumbromid sichtbar, das zwischen die Basenpaare interkaliert und durch Anregung im UV-Bereich fluoresziert. Die DNA-Moleküle werden in der Regel für ca. 20min bei 110V gelelektrophoretisch aufgetrennt.

#### 2.4.11 Gelelution

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des Nucleospin Extract Kit, *Macherey-Nagel*, Düren nach Angaben des Herstellers.

#### 2.4.12 Erzeugung spezifischer Punktmutationen in Vektoren

Hier wird das QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (*Stratagene*, LaJolla, USA) verwendet, um definiert Punktmutationen in Vektoren herbeizuführen. Einzelne Punktmutationen können zum Aminosäureaustausch auf Proteinebene führen. Mittels PCR wird durch Primer, die Mutationen tragen, der ursprüngliche Vektor und somit bei späterer Expression des Vektors auch die Aminosäuresequenz verändert. Template für die PCR ist der pBS KS (+), der die *aPKC* als komplette cDNA enthält. Die PCR für vier verschiedene Vektoren erfolgt mit folgenden HPLC-aufgereinigten Primern:

sdm69mutfor	5' CGG GAT TGT CTT <b>A</b> CG ATG GCG AAG ATC GCA GC 3'
sdm69mutrev	5' GCT GCG ATC TTC GCC ATC <b>G</b> TA AGA CAA TCC CG 3'
sdm141mutfor	5' GAC ACC ACC TCC ACA <b>A</b> TC TGC GGT ACA CCC 3'
sdm141mutrev	5' GGG TGT ACC GCA GA <b>T</b> TGT GGA GGT GGT GTC 5'
sdm265mutfor	5' GCA CAC GGC GCA TCT ACG <b>T</b> CA TGA AGG TGA 3'
sdm265mutrev	5' TCA CCT TCA TG <b>A</b> CGT AGA TGC GCC GTG TGC 3'
sdm417mutfor	5' CGA GTT TGT GCG CG <b>A</b> TGG CGA TTT GAT GTA CCA C 3'
sdm417mutrev	5' GTG GTA CAT CAA ATC GCC A <b>T</b> C GCG CAC AAA CTC G 3'

### PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit
1	95°C	30sec
2	95°C	30sec
3	55°C	1min
4	68°C	5,5min
5	gehe nach Schritt 2	12x
6	4°C	∞
7		Ende

Nach der PCR werden noch jeweils 1µl DpnI hinzu gegeben und für 1h bei 37°C inkubiert um den nicht methylierten Template-Strang abzubauen. Für die Transformation mit chemisch kompetenten XL1-blue Zellen wird jeweils 1µl (10U/µl) eingesetzt. Nach der Transformation werden die Zellen in NZY<sup>+</sup>-Puffer (1g casein hydrolysate, 0.5g Hefeextract, 0.5g NaCl mit H<sub>2</sub>O auf 100ml auffüllen, vor Gebrauch 2ml 1M Glucose, 1.25ml 1M MgCl<sub>2</sub>, 2.5ml 0.5M MgSO<sub>4</sub> noch sterilfiltriert hinzufügen) aufgenommen und auf Ampizilin-resistenten LB-Agar-Platten ausgestrichen.

### 2.4.13 Gateway Technologie

Die Gateway Technologie (*Invitrogen*) ermöglicht eine schnelle und effiziente Klonierung von Sequenzen aus einem Ausgangsvektor in Zielvektoren mit diversen Tags. Es gibt eine große Auswahl an Vektoren, um sein gewünschtes Protein mit verschiedenen N- und C-terminalen Tags zu exprimieren. Im Vergleich zur herkömmlichen Klonierung mit Restriktionsenzymen und Ligasen beruht die Gateway Technologie auf sequenzspezischer Rekombination, die durch Enzyme des Bakteriophagen Lambda katalysiert wird.

#### 2.4.13.1 TOPO Klonierung in den Ausgangsvektor

Für die Klonierung in den Ausgangsvektor wird das pENTR Directional TOPO Cloning Kit (*Invitrogen*) nach Herstellerangaben verwendet. Das gewünschte Gen wird mit den unten aufgeführten Primern amplifiziert, die vor dem Startkodon eine CACC-Sequenz enthalten. Als Template dienen die unter 2.4.11 hergestellten Vektoren mit den verschiedenen Punktmutationen in der *DaPKC*.

aPKCgatefor            5' CACCAT GCA GAA AAT GCC CTC G 3'  
aPKCgaterev            5' TCA CTG GAA TCC TCG CCA TAG 3'

Das PCR-Produkt wird aufgereinigt und für die Klonierungsreaktion sofort weiter verwendet. Während der Klonierungsreaktion schneidet die Topo-Isomerase I den Ausgangsvektor und lässt dabei einen 5'-Überhang entstehen, der komplementär zur CACC-Sequenz im 5'-Ende des vorwärts gerichteten Primers ist. Das Annealen der beiden Sequenzen führt dazu, dass das Gen in der richtigen Orientierung in den Vektor kloniert wird. Die Klonierungsreaktion und die darauf folgende Transformation werden nach Herstellerangaben durchgeführt.

#### 2.4.13.2 Gateway LR-Rekombination in den Zielvektoren

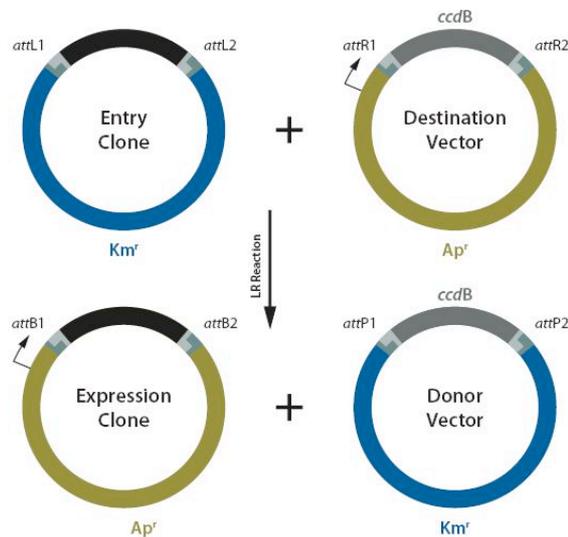
Um ein N-terminales GFP-Fusionsprotein unter der Kontrolle eines Aktin-Promotors herzustellen, wird die *DaPKC* in den pAGW Zielvektor rekombiniert. Die LR-Rekombination erfolgt mit dem Gateway LR Clonase Enzyme Mix (*Invitrogen*) nach Herstellerangaben.

5x LR Clonase Reaktion Buffer	1µl
Ausgangsvektor (100-300ng)	1µl
Zielvektor (150ng)	1µl
TE-Puffer (ad 4µl)	1µl
Clonase Enzyme Mix	1µl

Der Reaktionsansatz wird 1h bei RT inkubiert, anschließend mit 0,5µl Proteinase K versetzt, kurz gevortext und für 10min bei 37°C inkubiert. Für die Transformation wird 1µl eingesetzt.

Die Enzyme erkennen die attL1 und attL2 Sequenzen im Ausgangsvektor, schneiden das Gen heraus, ligieren es zwischen die attR1 und attR2 Sequenzen in den Zielvektor und erzeugen so einen gewünschten Expressionsvektor. Durch geringfügige Unterschiede in den Sequenzen zwischen attL1 und attL2 bzw. zwischen attR1 und attR2 bleibt die Orientierung des Inserts immer erhalten. Auf die gleiche Weise gelangt das Gen *ccdB*, das für ein toxisches Protein kodiert, von dem Zielvektor in den Ausgangsvektor und erzeugt ein Nebenprodukt, das

allerdings keine Kolonien bilden kann. Kolonien, die den Expressionsvektor enthalten, werden durch ihre Ampizillin-Resistenz selektiert (Abbildung 9). Auf diese Weise wurden folgende Konstrukte hergestellt: pAGW-aPKC, pAGW-aPKC<sup>psu69</sup>, pAGW-aPKC<sup>psu141</sup>, pAGW-aPKC<sup>psu265</sup> und pAGW-aPKC<sup>psu417</sup>.



■ Gene of Interest

**Abbildung. 9: Gateway System.** Durch sequenzspezifische Rekombination gelangt das Insert des Ausgangsvektors in den Zielvektor und erzeugt so den Expressionsvektor. Geringfügige Unterschiede in den Erkennungssequenzen (att) sorgen für eine Beibehaltung des ORFs. Das *ccdB* Genprodukt ist toxisch und verhindert so ein Wachstum des leeren Zielvektors auf LB-amp<sup>R</sup>-Platten. (nach *Invitrogen*).

## 2.5 Proteinbiochemische Methoden

### 2.5.1 Herstellung von Proteinextrakten

Fliegen, Ovarien oder dechorionisierte Embryonen werden in flüssigen Stickstoff gefroren, mit Lysispuffer (150mM NaCl, 50mM Tris pH 8.0, 1% Triton X-100) und Protease-Inhibitoren (je 2µg/ml Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin, Pefabloc) versetzt und auf Eis homogenisiert. Schneider S2 Zellen werden herunterzentrifugiert (1000rpm, 5min), mehrmals mit PBS gewaschen, mit Lysispuffer und Protease-Inhibitoren versetzt und das Zellpellet durch mehrmaliges Hoch- und Herunterziehen mit der Pipette aufgelöst. Das Homogenisat inkubiert für 30min auf Eis und wird anschließend bei 13000rpm 15min bei 4°C zentrifugiert. Der Proteinüberstand wird bei -70°C eingefroren. Zur Proteinbestimmung (800µl H<sub>2</sub>O + 200µl RotiQuant, Roth + 2µl Proteinextrakt) wird der OD<sub>595</sub>-Wert gemessen (OD<sub>595</sub> = 1 entspricht ca. 1mg/ml Gesamtprotein).

### 2.5.2 SDS-PAGE und Western Blot

Die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird mit dem Mini-Protean 3 (*Biorad*, München) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Proteine werden mit SDS-Puffer (2x: 100mM Tris-HCl pH 6.8, 4% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.2% bromphenol blue, 20% Glycerin, 200 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) versetzt aufgekocht und in einem 10% Gel 1h bei 200V aufgetrennt (Trenngel: 2.1ml H<sub>2</sub>O, 2.8ml 1M Tris pH 8.8, 2.5ml 30% Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1), 38 $\mu$ l 20% SDS, 30 $\mu$ l 10% APS, 8 $\mu$ l TEMED; Sammelgel: 1.3ml H<sub>2</sub>O, 235 $\mu$ l 1M Tris pH 6.8, 310 $\mu$ l 30% Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1), 10 $\mu$ l 20% SDS, 10 $\mu$ l 10% APS, 5 $\mu$ l TEMED; Laufpuffer: 25mM Tris, 192mM Glycin, 0.1% SDS).

Der Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran (*Schleicher und Schuell*, Dassel) wird mit dem Mini Trans-Blot (*Biorad*, München) nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Transferpuffer: 25mM Tris, 192mM Glycin, 20% Methanol). Der Transfer wird durch eine Ponceau S-Färbung überprüft und die Membran anschließend für 30min in Blockierlösung (3% Milchpulver, 1% BSA in TBST) gegen unspezifische Bindungsstellen der Antikörper geblockt. Der erste Antikörper wird verdünnt in der Blockierlösung über Nacht bei 4°C zu der Membran gegeben. Anschließend wird 3x 5min in TBST (20mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl, 0.2% Tween-20) gewaschen und dann der zweite Antikörper (HRP-gekoppelt, 1:10000 verdünnt) in Blockierlösung hinzugegeben und für 2h inkubiert. Nach drei weiteren Waschungen für jeweils 5min erfolgt die Detektion mit dem Chemilumineszenz-Substrat (BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD), *Boehringer/Roche Diagnostics*, Mannheim).

### 2.5.3 Co-Immunopräzipitation (CoIP)

Bei dieser Methode werden Proteine, die in einem Komplex gebunden sind, nachgewiesen. Zunächst wird das Proteinextrakt mit Protein A/G-Agarose Beads (*Roche*) einige Stunden bei 4°C vorinkubiert. Dabei können eventuell Proteine unspezifisch an die Agarose-Beads binden. Dann wird nach einer Zentrifugation das Proteinextrakt mit neuem Protein A/G-Agarose Beads versetzt und zusammen mit einem Antikörper für mehrere Stunden bei 4°C auf dem Taumler inkubiert. Als Antikörper verwendet man denjenigen, der gegen ein Protein, das man im Komplex nachweisen möchte, gerichtet ist. Als Negativ-Kontrolle verwendet man das Präimmenserum oder einen anderen unspezifischen Antikörper, der im selben Organismus hergestellt wurde. Protein A und Protein G sind Bestandteile bakterieller Zellwände und besitzen spezifische Bindestellen für bestimmte Klassen der Immunglobuline verschiedener Spezies. Die Protein A/G-Agarose Beads binden über den Antikörper an das

spezifische Protein und somit auch andere Proteine in diesem Komplex. Die Negativ-Kontrolle soll zeigen, dass kein Protein direkt an die Beads bindet, sondern die Bindung nur über den Antikörper stattfindet. Die Beads werden mehrfach in Lysispuffer gewaschen und anschließend in SDS-Puffer aufgekocht. An den Beads gebundene Proteine lösen sich, werden mit einer Hamilton-Spritze aufgetragen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Western Blot kann nun auf der Membran nachgewiesen werden, ob sich noch andere Proteine in diesem Komplex befinden.

## 2.6 Zellkultur

### 2.6.1 Transfektion von Schneider S2 Zellen mit Plasmid-DNA

Unter Anwendung des Nucleofactor II und des Cell Line Nucleofactor Kit V (*Amaxa biosystems*) werden die verschiedenen unter 2.4.13.2 hergestellten pAGW-aPKC Vektoren, pAGW-aPKC, pAGW-aPKC<sup>psu69</sup>, pAGW-aPKC<sup>psu141</sup>, pAGW-aPKC<sup>psu265</sup>, pAGW-aPKC<sup>psu417</sup>, in *Drosophila* S2 Zellen transfiziert. Dabei werden ca.  $1-5 \times 10^6$  Zellen und 1-5  $\mu$ g DNA in dem Programm O-22 eingesetzt und nach Angaben des Herstellers verfahren. Eine Antikörperfärbung erfolgt einen Tag nach der Transfektion und die Herstellung von Proteinextrakten 4 Tage nach der Transfektion. Der Nachweis der Expression des GFP-Fusionsproteins erfolgte hier in einem Western-Blot.

### 2.6.2 RNA-Interferenz in S2 Zellen

Es werden  $1 \times 10^6$  Zellen in 1ml serum-freien Medium aufgenommen. 6  $\mu$ l der unter 2.4.9 hergestellten dsRNA (15  $\mu$ g) werden hinzugefügt, für 1h bei 25°C inkubiert und anschließend mit 2ml Wachstumsmedium versetzt. Die Proteinextraktion erfolgt nach einer Inkubationszeit von 3-4 Tagen bei 25°C.

### 3 Ergebnisse

Bisher wurde nur ein amorphes Allel der *DaPKC* beschrieben, das eine P-Element-Insertion trägt, weiterhin *DaPKC<sup>k06403</sup>* genannt, und homozygot bis ins zweite Larvenstadium lebensfähig ist (Wodarz et al., 2000; Cox et al., 2001b; Rolls et al., 2003). Dabei handelt es sich um zygotische Mutanten, bei denen noch während der Oogenese maternales Genprodukt in der Oocyte hinterlegt wurde. Bei der Analyse weiterer Allele wurden neben den zygotischen auch maternale Mutanten untersucht. Hierfür wurde das Genprodukt aus dem zu befruchtendem Ei durch genetische Methoden komplett entfernt.

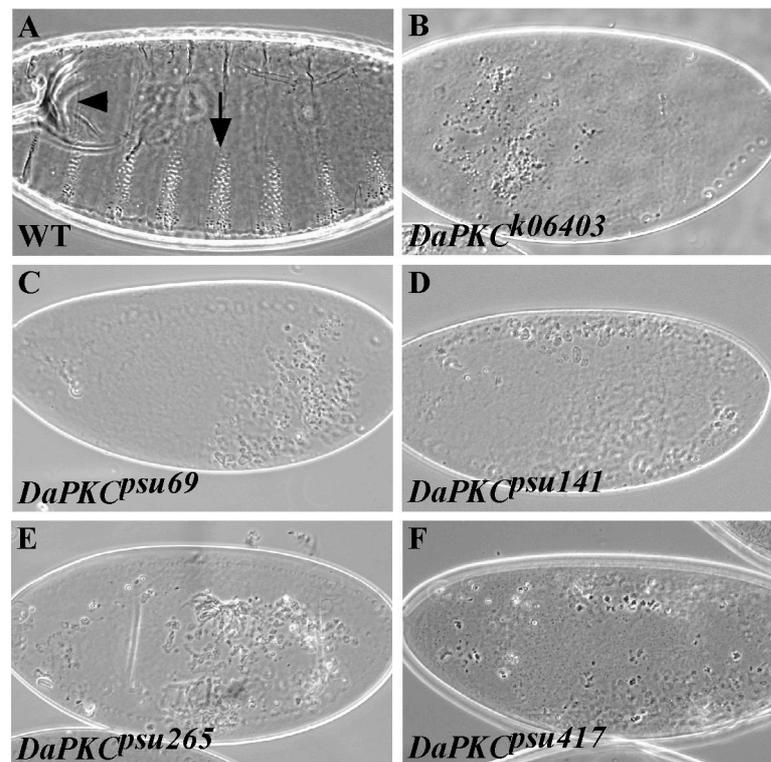
#### 3.1 Charakterisierung neuer *DaPKC*-Allele

Um neue maternale Gene zu identifizieren, die in die frühe Entwicklung des *Drosophila* Embryos involviert sind, wurde ein Mutagenese-Screen mit Ethylmethansulfonat (EMS) durchgeführt. Dazu wurden von den EMS-Mutanten Keimbahnklone erzeugt und die Kutikula dieser Embryonen näher betrachtet. Ausgehend von den Kutikula-Phänotypen wurden die EMS-Mutanten mit bereits bekannten Mutanten, die einen ähnlichen Phänotyp aufweisen, gekreuzt. Dabei zeigte sich, dass vier EMS-Mutanten, *DaPKC<sup>psu69</sup>*, *DaPKC<sup>psu141</sup>*, *DaPKC<sup>psu265</sup>* und *DaPKC<sup>psu417</sup>*, allelisch zu *DaPKC<sup>k06403</sup>* sind. Einige der Allele sind homozygot lebensfähig (Luschnig et al., 2004). Zur weiteren Untersuchung wurde die DNA des *DaPKC*-Lokus der Mutanten sequenziert und molekulargenetisch und phänotypisch charakterisiert.

##### 3.1.1 Die Kutikula-Phänotypen von Keimbahnklonen der *DaPKC<sup>psu</sup>* Allele

Die Kutikula ist das Sekretionsprodukt der Epidermis, die ein einschichtiges Epithel darstellt. Bei ausdifferenzierten Embryonen weist die Kutikula eine Vielzahl charakteristischer Strukturen auf und bei wildtypischen Embryonen tritt ein stereotyped Segmentierungsmuster auf. Die wildtypische Kutikula in Abbildung 10A zeigt als charakteristische Merkmale anterior das Kopfskelett (Pfeilkopf) und ventral eine Reihe von Zähnchenbändern (Pfeil). Läuft die Entwicklung des Embryos, insbesondere der Epidermis, nicht normal ab, so kann sich dies im Kutikula-Phänotyp widerspiegeln. Die hier gezeigten Kutikulas stammen von Keimbahnklon-Embryonen der verschiedenen *DaPKC* Allele. In Abb. 10B sieht man den Kutikula-Phänotyp des Null-Allels *DaPKC<sup>k06403</sup>*. Hier zeigen sich nur noch kleine Bruchstücke der Kutikula, die, verglichen mit den Kutikulas der *DaPKC<sup>psu</sup>* Allele (Abb.

10C-F), kleiner zu sein scheinen. Das Kopfskelett und die Zähnchenbänder fehlen in den Kutikulas aller fünf Allele. Dieser Phänotyp ähnelt denen von Keimbahnklonen anderer Gene, die in die Ausbildung der Zellpolarität involviert sind. Besonders große Ähnlichkeit besteht zum Phänotyp von *crb* Mutanten (Knust et al., 1993), weswegen die Allele *pschur* (*psu*), armenisch für Krümel, genannt wurden.

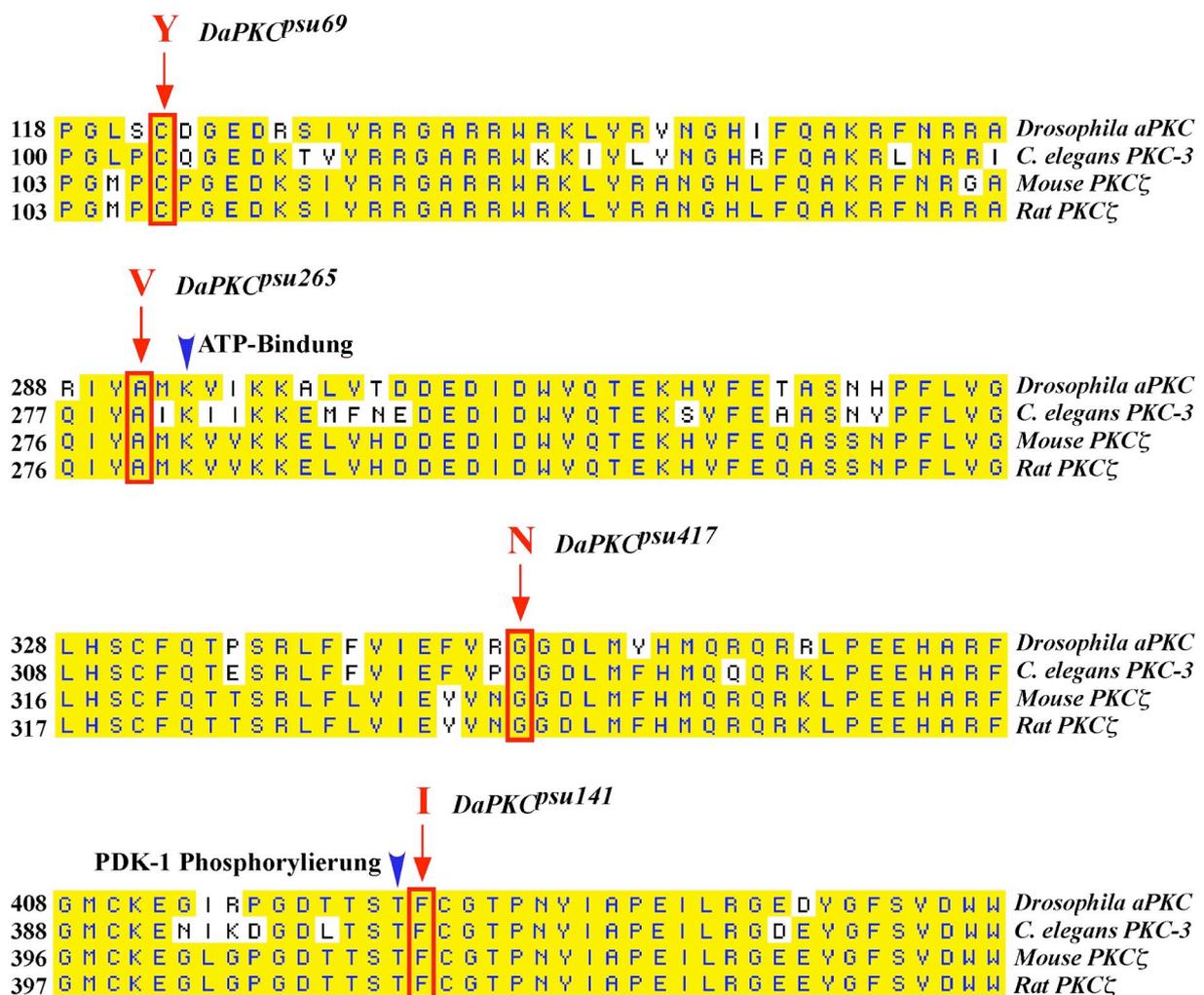


**Abbildung 10: Starke Defekte in der Kutikula von Keimbahnklonen der verschiedenen *DaPKC* Allele.** (A) Wildtyp Kutikula mit dem Kopfskelett anterior (Pfeilkopf) und den Zähnchenbändern ventral (Pfeil). Die P-Element Insertion *DaPKC<sup>k06403</sup>* zeigt nur kleine, krümelige Kutikula Bruchstücke (B). Die vier *DaPKC<sup>psu</sup>* Mutanten (C-F) weisen auch nur Bruchstücke auf, die noch etwas größer erscheinen als in B.

### 3.1.2 Sequenzierung der *DaPKC<sup>psu</sup>* Allele

Die Sequenzierung der Allele erfolgte nach PCR auf genomischer DNA adulter Tiere, welche homozygot oder heterozygot für die jeweilige *DaPKC<sup>psu</sup>* Mutation waren. Für die heterozygoten Fliegen konnten im Elektropherogramm deutlich Doppelsignale nachgewiesen werden, wobei ein Signal auf die wildtypische Base zurückzuführen ist und das andere Signal auf einen Basenaustausch im jeweiligen mutanten Allel (siehe Anhang). Die Sequenzierung ergab, dass die vier Allele jeweils eine Punktmutation in einem hochkonservierten Bereich tragen. Diese Basenaustausche führen jeweils auch zu einem Aminosäureaustausch in der Proteinsequenz (Abbildung 11). In dem Allel *DaPKC<sup>psu69</sup>* liegt die Mutation an Position 122 und somit 23 Aminosäuren hinter der Bindungsstelle mit Par-6 (Noda et al., 2003; Wilson et

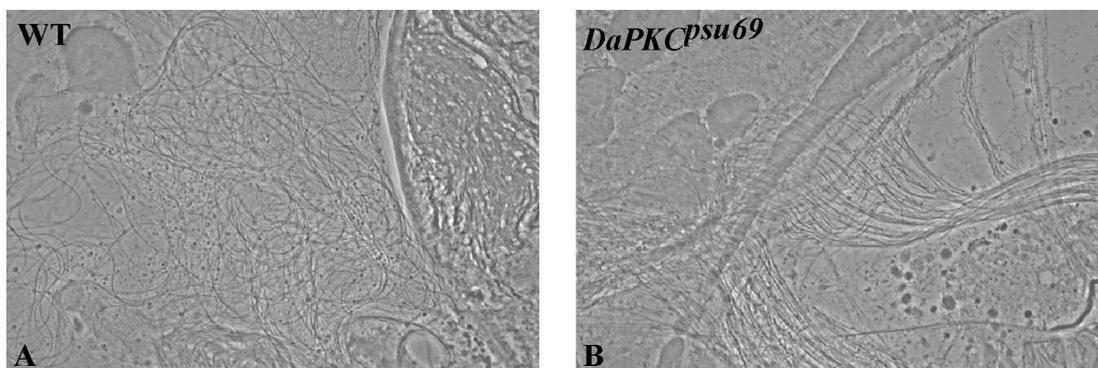
al., 2003; Hirano et al., 2004). Sie führt zu einem Aminosäureaustausch von Cystein nach Tyrosin. *DaPKC<sup>psu141</sup>* trägt eine Mutation direkt neben der *PDK-1* Phosphorylierungsstelle, wobei ein Austausch von Phenylalanin nach Isoleucin an Position 423 stattgefunden hat. *DaPKC<sup>psu265</sup>* weist an Position 291 in der ATP-Bindetasche eine Mutation von Alanin nach Valin auf, nur zwei Aminosäuren vor dem essentiellen Lysin (Hirai und Chida, 2003). Der Aminosäureaustausch von Glycin nach Asparagin hat in dem mutanten Allel *DaPKC<sup>psu417</sup>* an Position 347 in der Substrat-Bindetasche stattgefunden. Somit liegt die Mutation von *DaPKC<sup>psu69</sup>* in der regulatorischen Domäne und die Mutationen von *DaPKC<sup>psu141</sup>*, *DaPKC<sup>psu265</sup>* und *DaPKC<sup>psu417</sup>* in der Kinase-Domäne.



**Abbildung 11: Aminosäureaustausche der EMS-Allele in hochkonservierten Bereichen der aPKC-Isoformen.** Vergleich der *DaPKC* mit ihren Isoformen von Maus, Ratte und *C. elegans*. Gelb unterlegt sind die Aminosäuren, die in mindestens zwei der vier Proteinkinasen identisch sind. Die Mutation befindet sich im Falle aller Allele in einer hochkonservierten Aminosäure. Die Mutation in *DaPKC<sup>psu265</sup>* liegt in der ATP-Bindetasche, nur zwei Aminosäuren vor dem essentiellen Lysin. Die Mutation in *DaPKC<sup>psu141</sup>* liegt direkt neben der PDK-1 Phosphorylierungsstelle.

### 3.1.3 Phänotypische Beschreibung der *DaPKC<sup>psu</sup>* Allele

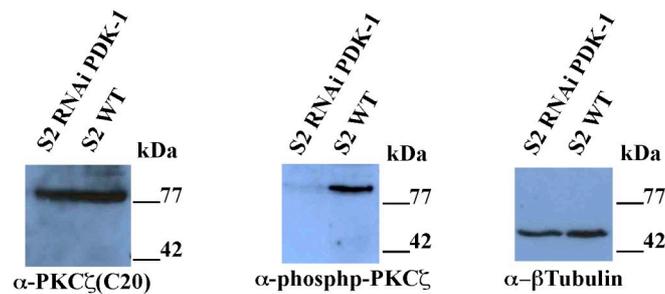
Homozygote Fliegen der drei Allele *DaPKC<sup>psu69</sup>*, *DaPKC<sup>psu141</sup>* und *DaPKC<sup>psu265</sup>* sind einige Tage lebensfähig, wobei homozygote *DaPKC<sup>psu265</sup>*-Tiere extrem selten auftreten (Luschnig et al., 2004). Die adulten Fliegen zeigen Defekte am Abdomen. So sind einige Segmente teilweise fusioniert. Homozygote *DaPKC<sup>psu265</sup>* und *DaPKC<sup>psu417</sup>*-Tiere sterben meist im L2 Larvenstadium. Die Weibchen sind steril und legen keine oder kaum Eier, die Männchen sind ebenfalls steril. Abbildung 12 zeigt Hodenquetschpräparate von homozygoten Männchen des Allels *DaPKC<sup>psu69</sup>*. Während die wildtypischen Spermien motil sind und sich frei bewegen können, hängen die Spermien der homozygoten *DaPKC<sup>psu69</sup>*-Männchen in Bündeln aneinander und sind völlig unbeweglich.



**Abbildung 12: Hoden-Quetschpräparate vom Wildtyp und homozygoten *DaPKC<sup>psu69</sup>*-Männchen.** (A) Die Spermien der wildtypischen Männchen sind motil, dagegen hängen die Spermien der homozygoten Mutanten *DaPKC<sup>psu69</sup>* aneinander und sind unbeweglich (B).

### 3.1.4 Die Reduktion der PDK-1 führt zur Reduktion der phospho-DaPKC

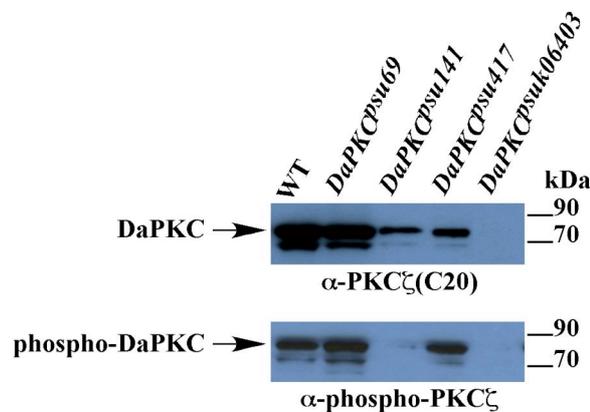
In Säugern wurde nachgewiesen, dass die Maus PKC $\zeta$  durch PDK-1 an T410 phosphoryliert wird (Le Good et al., 1998). Hier wurde untersucht, ob eine solche Abhängigkeit auch in *Drosophila* besteht. Dafür wurde ein Antikörper verwendet, der spezifisch gegen die an T410 phosphorylierte Form der PKC $\zeta$  gerichtet ist und mit der an T422 phosphorylierten Form der DaPKC kreuzreagiert. In S2 Zellen, die zur RNA-Interferenz mit dsRNA der PDK-1 transfiziert wurden, ist das Signal der phosphorylierten DaPKC deutlich reduziert (Abbildung 13). Dies deutet darauf hin, dass auch in *Drosophila* die DaPKC direkt durch PDK-1 phosphoryliert werden könnte. Zum Nachweis der DaPKC wurde ein Antikörper verwendet, der gegen den C-Terminus der PKC $\zeta$  gerichtet ist und mit der DaPKC kreuzreagiert.



**Abbildung 13: Reduktion der PDK-1 führt zur Reduzierung der phosphorylierten Form der DaPKC.** Die Reduktion der PDK-1 durch RNAi beeinflusst nicht die Menge der DaPKC, die durch den PKC $\zeta$ (C20)-Antikörper detektiert wird. Dagegen führt es zur Reduzierung der phosphorylierten Form der DaPKC. Der Nachweis von  $\beta$ -Tubulin dient der Kontrolle, dass gleiche Mengen an Proteinextrakt aufgetragen wurden.

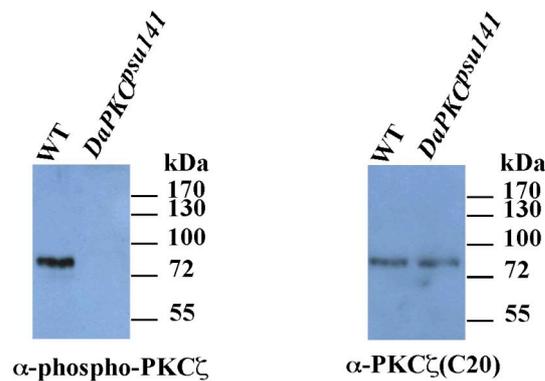
### 3.1.5 Nachweis der DaPKC in den maternalen *DaPKC<sup>psu</sup>* Mutanten

Im Western Blot konnte nachgewiesen werden, dass in den Keimbahnklonen der *DaPKC<sup>psu</sup>* Allele, im Gegensatz zu den Keimbahnklonen von *DaPKC<sup>k06403</sup>*, die DaPKC und teilweise auch ihre an T422 phosphorylierte Form noch vorhanden sind (Abbildung 14). Mit dem phospho-PKC $\zeta$  Antikörper konnte in Proteinextrakten aus *DaPKC<sup>psu141</sup>*, in dem der Aminosäureaustausch direkt neben der PDK-1 Phosphorylierungsstelle liegt, dagegen nur ein sehr schwaches Signal detektiert werden.



**Abbildung 14: Western Blot an Proteinextrakten aus Keimbahnklon-Embryonen.** Die aPKC kann in allen Allelen außer *DaPKC<sup>k06403</sup>* nachgewiesen werden. Für die phosphorylierte Form der DaPKC kann in *DaPKC<sup>psu141</sup>* nur ein sehr schwaches Signal detektiert werden.

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem schwachen Signal in *DaPKC<sup>psu141</sup>* mit dem phospho-PKC $\zeta$  spezifischen Antikörper um die zygotisch exprimierte mutante Form der DaPKC handelt, wurde mit dem Proteinextrakt von homozygot mutanten, adulten Fliegen ein Western Blot durchgeführt. Abbildung 15 zeigt, dass mit dem phospho-PKC $\zeta$  Antikörper kein Signal detektieren werden konnte. Dagegen konnte mit dem PKC $\zeta$  Antikörper im gestrippten Blot die DaPKC detektiert werden.



**Abbildung 15: Western Blot an Proteinextrakten aus adulten Fliegen.** Die phosphorylierte Form der aPKC kann im Wildtyp, nicht jedoch im Lysat von dem Allel *DaPKC<sup>psu141</sup>* detektiert werden. Ein gegen den C-Terminus gerichteter Antikörper kann in beiden Proteinextrakten die DaPKC detektieren.

Es bleibt jedoch offen, ob der phospho-PKC $\zeta$  Antikörper kein Protein detektieren kann, da die DaPKC nicht phosphoryliert vorliegt, oder ob der Antikörper durch den Aminosäureaustausch nicht mehr binden kann.

### 3.1.6 Komplementationstests

Komplementationskreuzungen wurden durchgeführt, um eine Letalität der *DaPKC<sup>psu</sup>* Allele untereinander, mit der P-Element Insertion *DaPKC<sup>k06403</sup>* und der Defizienz *Jp1*, die den gesamten Bereich der *DaPKC* herausnimmt, zu überprüfen.

	psu69					
psu69	++	psu141				
psu141	++	++	psu265			
psu265	o	++	o	psu417		
psu417	o	+	o	-	k06403	
k06403	+	+	o	o	-	Jp1
Jp1	-	o	-	-	-	-

#### Homozygote Fliegen

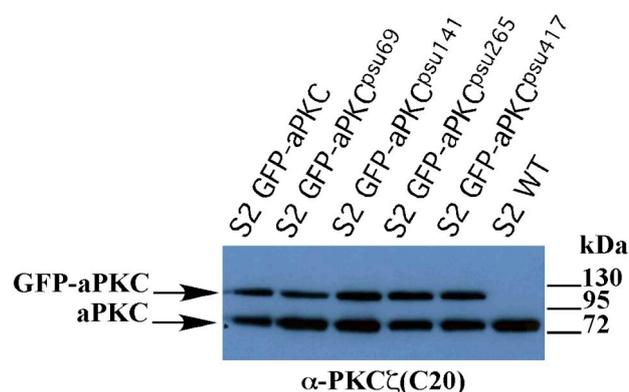
- ++ treten regelmäßig, teilweise zeitverzögert, in fast normalem Verhältnis auf
- + treten regelmäßig in geringer Anzahl auf
- o treten unregelmäßig und nur vereinzelt auf
- treten nicht auf

Die *DaPKC<sup>psu</sup>* Allele untereinander sind alle lebensfähig, wobei die Weibchen steril, die Männchen jedoch fertil sind. Dabei zeigen die verschiedenen transheterozygoten Allelkombinationen ähnliche Defekte wie die homozygoten. Teile des Abdomens sind fusioniert und Borsten fehlen teilweise oder sind dupliziert.

Die Allelkombinationen von *DaPKC<sup>psu</sup>* und *DaPKC<sup>k06403</sup>* zeigen eine extrem geringe Lebenserwartung. *DaPKC<sup>psu141</sup>* ist über der Defizienz Jp1 einige Tage lebensfähig und zeigt dabei Defekte am Abdomen und in den Flügeln. Die anderen *DaPKC<sup>psu</sup>* Allele komplementieren die Defizienz nicht und sind letal.

### 3.1.7 Herstellung von GFP-DaPKC transfizierten S2-Zellen für CoIP

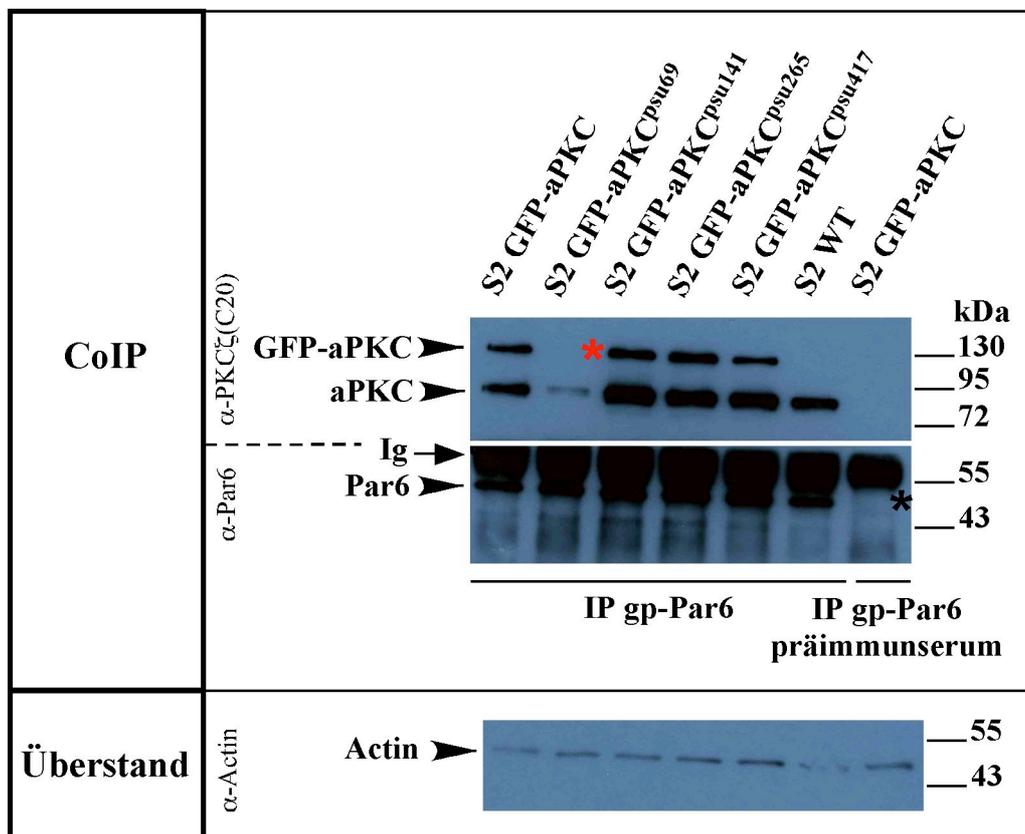
Die dreidimensionale Struktur eines Proteins wird durch seine Aminosäuresequenz bestimmt. Die Faltungsmöglichkeiten der Proteinketten werden dabei durch die Eigenschaften der Seitenketten, kovalente und nicht kovalente Bindungen und sterische Behinderungen eingeschränkt. Der Austausch einer einzigen Aminosäure kann daher zu konformalen Veränderungen führen, so dass ein Protein nicht mehr in der Lage ist, an ein anderes zu binden. Diese Möglichkeit wurde über Co-Immunopräzipitation mit Proteinextrakten aus den transfizierten S2-Zellen überprüft. Dabei sollte untersucht werden, ob die verschiedenen GFP-DaPKC-Fusionsproteine mit bereits bekannten Bindungspartnern der DaPKC, die in S2-Zellen endogen exprimiert werden, einen Komplex bilden können. Für die CoIP wurden jeweils 500µg Gesamtprotein eingesetzt und von dem Überstand jeweils 1/100 aufgetragen. Wildtypisches DaPKC bzw. die mutierten Formen, *DaPKC<sup>psu69</sup>*, *DaPKC<sup>psu141</sup>*, *DaPKC<sup>psu265</sup>* und *DaPKC<sup>psu417</sup>*, wurden mit einem N-terminalen GFP-Tag versehen und in S2-Zellen unter der Kontrolle eines Aktin-Promotors exprimiert. Die Proteinexpression in den S2-Zellen konnte nach Proteinisolierung im Western Blot jeweils mit dem PKCζ Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 16). Als Kontrolle wurde in S2-Zellen die Transfektion ohne Plasmid durchgeführt.



**Abbildung 16: Western Blot an Proteinextrakten aus transfizierten S2 Zellen.** In allen transfizierten Zelllinien konnten die endogene DaPKC und auch das GFP-Fusionsprotein nachgewiesen werden.

3.1.7.1 GFP-DaPKC<sup>psu69</sup> bindet nicht an endogenes Par-6

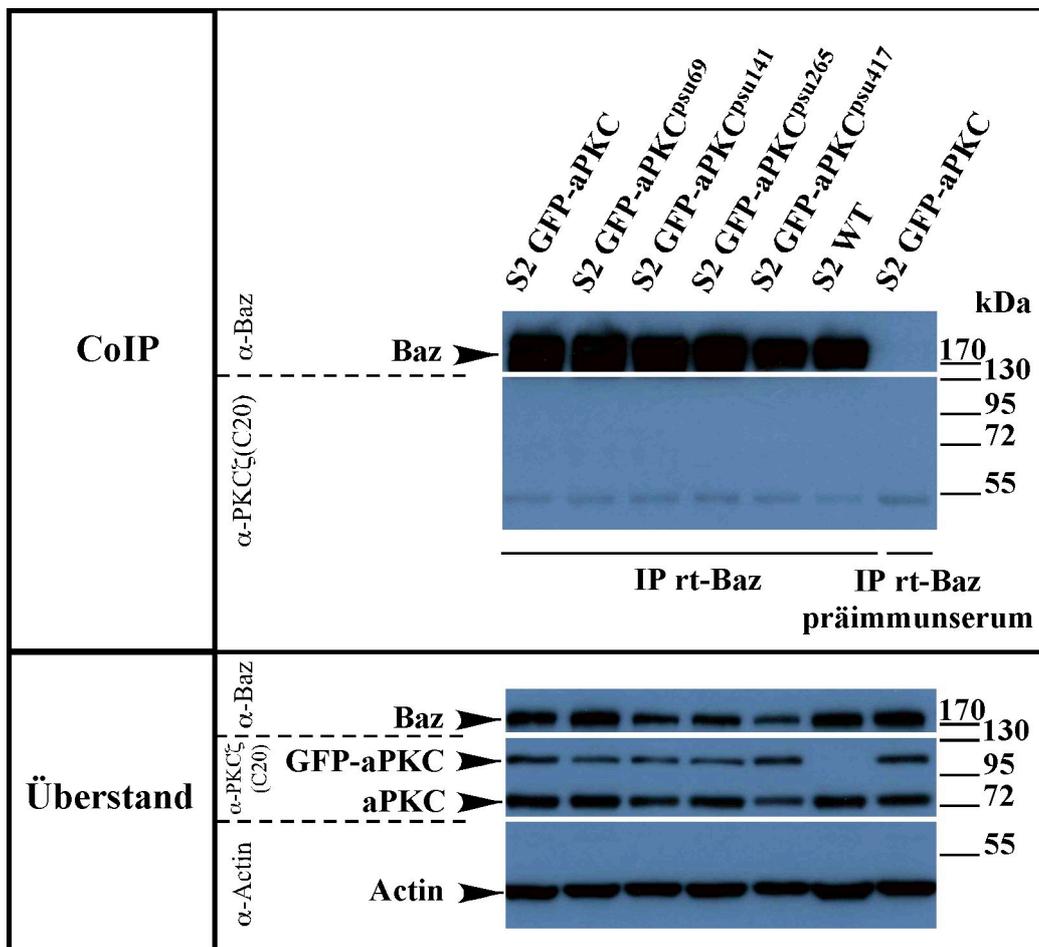
Da in *DaPKC<sup>psu69</sup>* ein Aminosäureaustausch in der Nähe der Par-6 Bindedomäne vorliegt, wurde untersucht, ob insbesondere DaPKC<sup>psu69</sup> noch an Par-6 binden kann. Der Western Blot in Abbildung 18 zeigt, dass der gp-Par-6-Antikörper das Par-6 Protein präzipitieren kann. Nur in der Negativ-Kontrolle wurde wie erwartet mit dem entsprechenden Präimmunsereum Par-6 nicht präzipitiert (schwarzer Stern in Abb. 17). Die CoIP zeigt, dass GFP-DaPKC<sup>psu69</sup> im Gegensatz zu den anderen Fusionsproteinen nicht mit Par6 in einem Komplex (roter Stern in Abb. 17) vorkommt. Die hier, im Verhältnis zu den anderen, schwache Bande der endogenen DaPKC konnte in einem wiederholten Versuch nicht bestätigt werden. Die endogene DaPKC als Positiv-Kontrolle ist in allen Spuren nachweisbar. In der Negativ-Kontrolle ist weder die endogene DaPKC noch das Fusionsprotein detektierbar.



**Abbildung 17: CoIP mit gp-Par6 an transfizierten S2 Zellen.** Die IP wurde mit dem gp-Par-6 Antikörper durchgeführt und das entsprechende Präimmunsereum für die Negativ-Kontrolle verwendet. In den Präzipitaten können jeweils Par-6 und die endogene DaPKC nachgewiesen werden. Nur in der IP mit dem Präimmunsereum können weder Par-6 (schwarzer Stern) noch die aPKC präzipitiert werden. GFP-DaPKC<sup>psu69</sup> kann auch nicht präzipitiert werden (roter Stern). Der Nachweis von Aktin in dem Proteinüberstand dient als Kontrolle, dass in allen Spuren gleiche Mengen an Protein aufgetragen wurden.

## 3.1.7.2 GFP-DaPKC bindet nicht an endogenes Baz

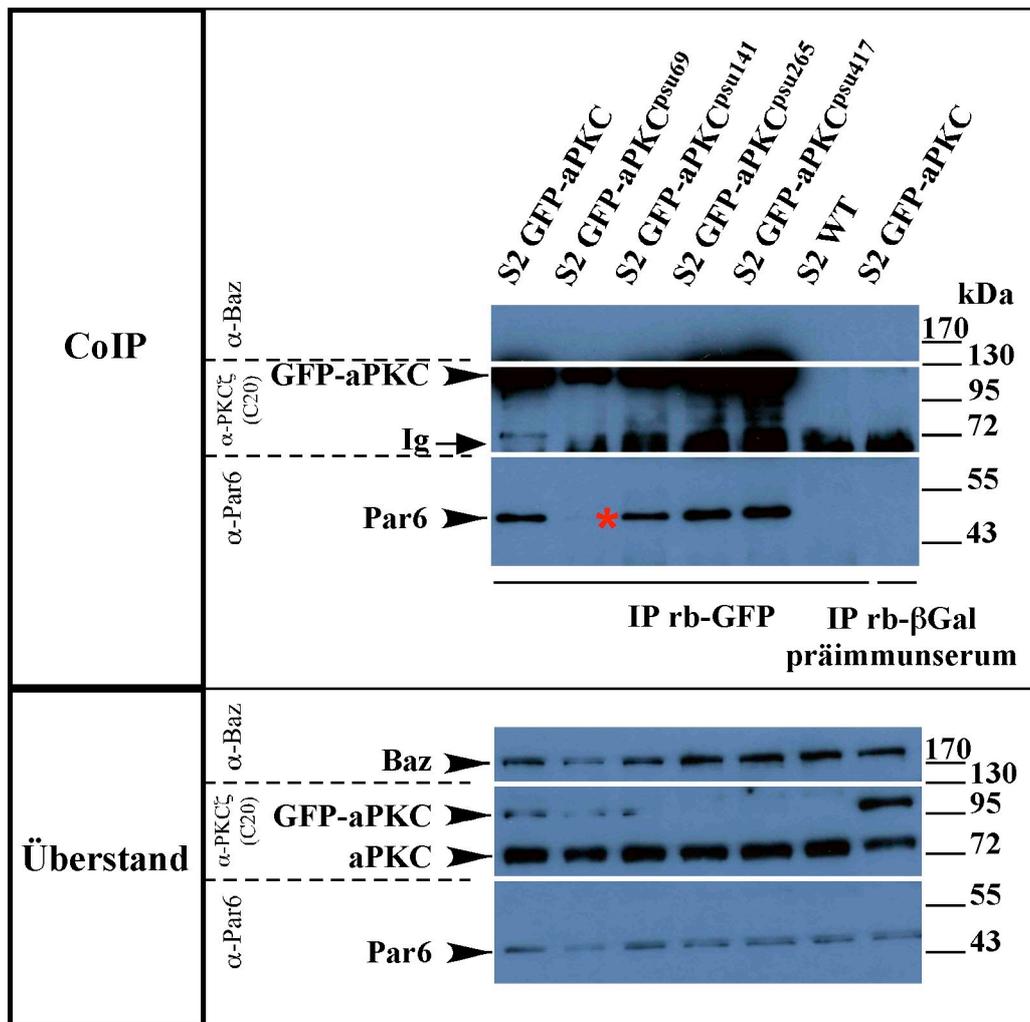
Da auch Baz eine Komponente des hoch konservierten Par/aPKC-Komplexes ist und an DaPKC bindet (Wodarz et al., 2000), wurde überprüft, ob die GFP-Fusionsproteine an Baz binden können. Der rt-Baz-Antikörper kann Baz präzipitieren (Abbildung 18). Jedoch kann in keiner Spur die endogene DaPKC oder das GFP-Fusionsprotein, mit der DaPKC in der wildtypischen Form oder mutiert, im Präzipitat detektiert werden. Dagegen können im Proteinüberstand Baz, endogenes DaPKC und das Fusionsprotein nachgewiesen werden, was ihre Anwesenheit belegt.



**Abbildung 18: CoIP mit rt-Baz an transfizierten S2 Zellen.** Die IP wurde mit dem rt-Baz Antikörper durchgeführt und das entsprechende Präimmunserum für die Negativkontrolle verwendet. In dem Präzipitat kann nur Baz nachgewiesen werden. Weder endogenes noch GFP-fusioniertes DaPKC ist detektierbar. Im Proteinüberstand findet man Baz, DaPKC und die GFP-aPKC Fusionsproteine. Actin dient als Ladekontrolle.

Da in dem Präzipitat mit dem rt-Baz Antikörper entgegen der Erwartung weder die endogene noch die GFP-fusionierte, wildtypische Form der DaPKC nachgewiesen werden konnte, wurde die CoIP wiederholt und mit einem rb-GFP-Antikörper präzipitiert (Abbildung 19). Die GFP-Fusionsproteine können im Präzipitat nachgewiesen werden. Baz kann jedoch

wieder nicht präzipitiert werden. Im Proteinüberstand jedoch ist Baz nachweisbar, ebenso wie Par6, endogenes DaPKC und teilweise noch das GFP-Fusionsprotein. Zur Kontrolle wurde in dem Präzipitat mit dem gp-Par-6 Antikörper das Par-6 Protein nachgewiesen. Das fehlende Signal im Proteinextrakt von S2 GFP-aPKC<sup>psu69</sup> (roter Stern in Abb. 19) bestätigt das Ergebnis wie in 3.1.7.1, in dem Par-6 nicht im Komplex mit DaPKC<sup>psu69</sup> nachweisbar ist.

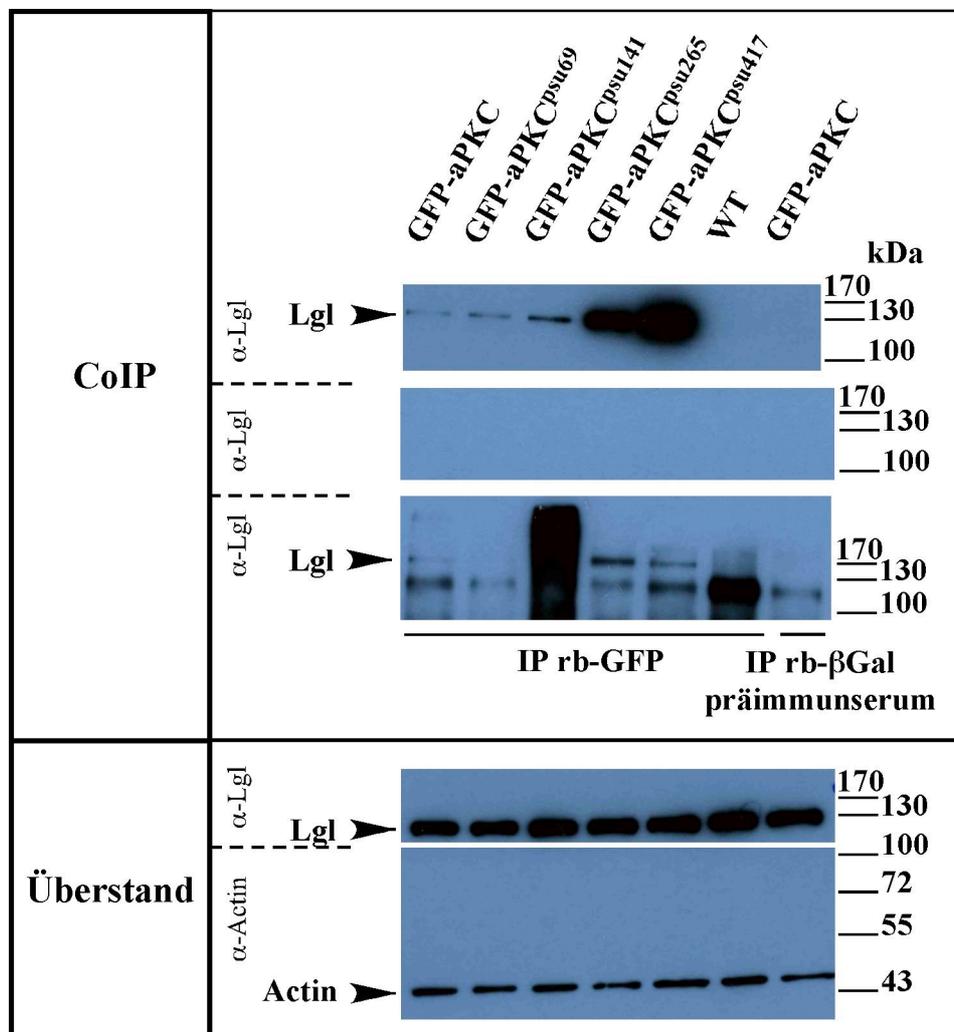


**Abbildung 19: CoIP mit rb-GFP an transfizierten S2 Zellen.** Die IP wurde mit dem rb-GFP Antikörper durchgeführt und rb- $\beta$ Galaktosidase für die Negativ-Kontrolle verwendet. In dem Präzipitat können die GFP-Fusionsproteine und Par-6 nachgewiesen werden. Dabei zeigt sich wiederholt, dass DaPKC<sup>psu69</sup> nicht in einem Komplex mit Par-6 zu finden ist (roter Stern). Baz ist im Präzipitat auch mit der wildtypischen Form der DaPKC nicht nachweisbar. Im Proteinüberstand ist Baz, ebenso wie Par-6, endogenes DaPKC und teilweise noch das GFP-Fusionsprotein nachweisbar.

### 3.1.7.3 GFP-DaPKC zeigt keine eindeutige Komplexbildung mit endogenem Lgl

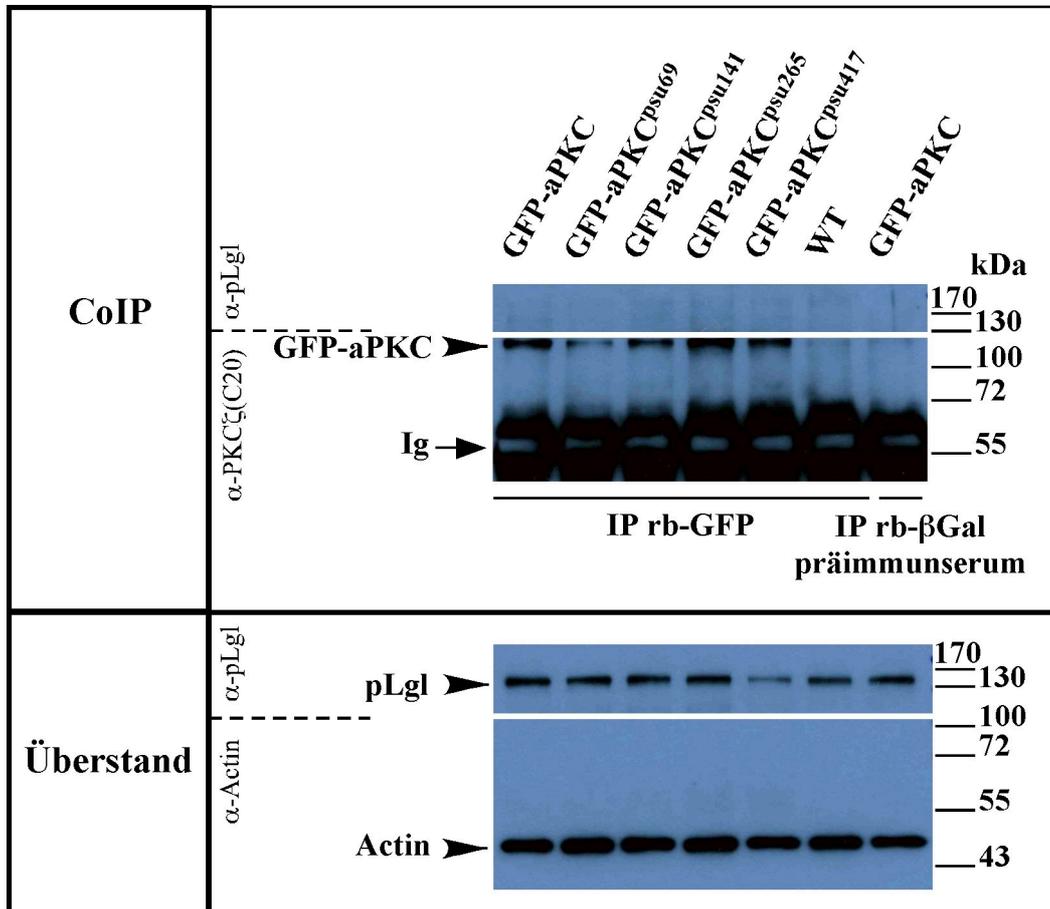
In *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass DaPKC Lgl phosphoryliert (Betschinger et al., 2003; Betschinger et al., 2005). Daher sollte untersucht werden, ob dieser Komplex auch in S2 Zellen besteht. Für eine CoIP mit GFP-DaPKC und endogenem Lgl wurde zunächst mit

rb-GFP präzipitiert. Dies brachte jedoch kein eindeutiges Ergebnis hervor. In einem Versuch schien es, als würden alle GFP-Konstrukte an Lgl binden. Die Negativ-Kontrollen zeigten keine Bindung an Lgl (Abbildung 20, oberer Blot). In einem wiederholten Versuch mit der identischen Ausführung zeigte sich kein Signal für Lgl und somit keine Bindung in einem Komplex (20, mittlerer Blot). In einem weiteren Versuch zeigten sich für alle GFP-Fusionsproteine außer GFP-DaPKC<sup>psu69</sup> schwache Banden nach einer Detektion mit Lgl. Die Negativ-Kontrollen zeigten wieder keine Bindung an Lgl (20, unterer Blot). Im Überstand konnte immer Lgl nachgewiesen werden. In einem weiteren Versuch wurde mit rb-Lgl präzipitiert. Hier konnte jedoch weder endogenes DaPKC noch das GFP-Fusionsprotein nachgewiesen werden.



**Abbildung 20; CoIP zeigt kein eindeutiges Ergebnis für Bindung an Lgl.** Für die Bindung von Lgl an die verschiedenen GFP-DaPKC-Konstrukte konnte kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden. In drei Versuchen, in denen mit dem rb-GFP Antikörper präzipitiert wurde, scheint Lgl entweder mit allen Konstrukten im Komplex zu binden (oberer Blot) oder gar nicht (mittlerer Blot). In einem dritten Versuch scheint Lgl nicht mit GFP-DaPKC<sup>psu69</sup> in einem Komplex zu sein (unterer Blot). In den Negativkontrollen ist kein Lgl detektierbar, dagegen jedoch in den Überständen von der CoIP.

Zum Nachweis einer Bindung von GFP-DaPKC an phosphoryliertes Lgl wurde mit dem rb-GFP Antikörper präzipitiert. Hierbei konnte das GFP-Fusionsprotein, jedoch nicht die phosphorylierte Form von Lgl im Präzipitat nachgewiesen werden (Abbildung 21).



**Abbildung 21: CoIP zeigt keine Bindung zwischen GFP-DaPKC und phosphoryliertem Lgl.** Die Bindung von GFP-DaPKC an die Beads kann nachgewiesen werden, jedoch ist die phosphorylierte Form von Lgl nicht in der CoIP nachweisbar. Im Überstand ist phospho-Lgl nachweisbar.

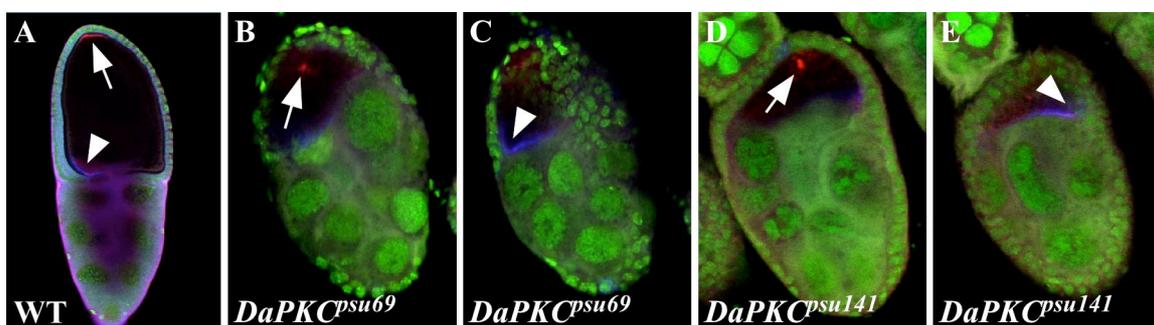
## 3.2 Untersuchungen zur Polarität während der Oogenese bei *DaPKC<sup>psu</sup>*-mutanten Fliegen

Da gezeigt wurde, dass die DaPKC essentiell für die korrekte Ausbildung der Polarität ist und der Verlust der DaPKC während der Oogenese zum Verlust der Oocyte führt (Cox et al., 2001b), wurde der Einfluss der verschiedenen Allele auf die Ausbildung und Polarität der Oocyte untersucht.

### 3.2.1 Die Polarität der Oocyte in homozygoten *DaPKC<sup>psu</sup>*-mutanten Fliegen ist teilweise gestört

Da homozygote Weibchen der Allele *DaPKC<sup>psu69</sup>* und *DaPKC<sup>psu141</sup>* steril sind, wurden die Ovarien präpariert und näher betrachtet. Dabei zeigen sich bereits morphologische Defekte. In Eikammern, die sich bis zu Stadium 10 entwickeln wurde die Lokalisation von Markern für die Polarität der Oocyte überprüft. Eine Oocyten-Determination findet statt, jedoch ist deren Polarität teilweise gestört.

Staufen lokalisiert in der wildtypischen Oocyte posterior in einem Halbmond (rot, Pfeil in Abbildung 22A). Dagegen zeigen die beiden *DaPKC* mutanten Allele eine Fehllokalisierung von Staufen. Staufen akkumuliert als runder Fleck in der Mitte (rot, Pfeil in Abb. 22B) oder posterior in der Oocyte (rot, Pfeil in Abb. 22D). Dieser Phänotyp zeigt sich auch in hypomorphen *par-1* (Shulman et al., 2000; Tomancak et al., 2000) und *baz* Mutanten (Benton und St Johnston, 2003b). Gurken wird in der wildtypischen Oocyte anterior auf der zukünftigen Dorsalseite detektiert (blau, Pfeilkopf in Abb. 22A). In den *DaPKC<sup>psu</sup>* Mutanten scheint die Gurken Lokalisation korrekt (blau, Pfeilkopf in Abb. 22C und E).



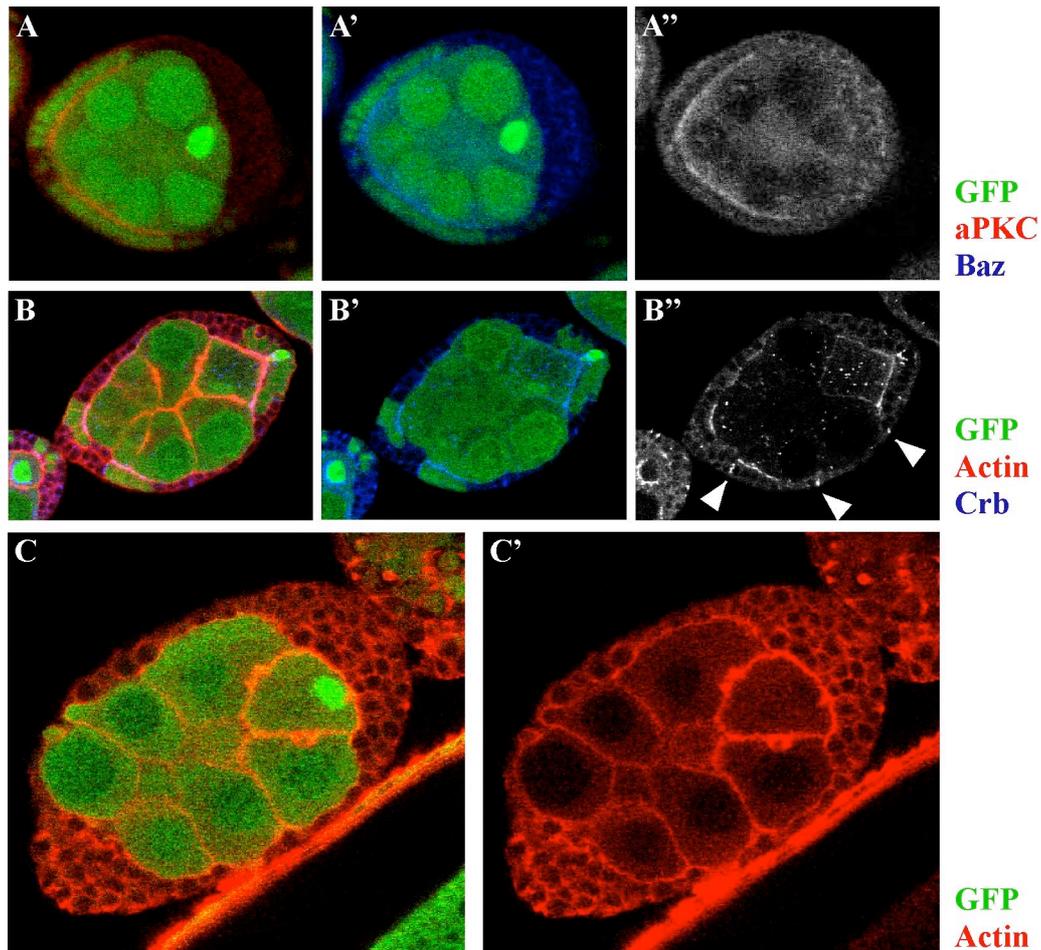
**Abbildung 22: Defekte in der Polarität der Oocyte von homozygoten *DaPKC<sup>psu</sup>* Mutanten.** Eikammern Stadium 8-11 mit Yoyo-Kernfärbung. (A) In der wildtypischen Oocyte ist Staufen (rot, Pfeil) posterior lokalisiert und die anterior-dorsale Lokalisation von Gurken (blau, Pfeilkopf) bestimmt dorsal. In den homozygoten *DaPKC<sup>psu</sup>* Allelen ist Staufen als Fleck in der Mitte der Oocyte (rot in B) oder posterior (rot in D) akkumuliert. C und E zeigen die gleichen Eikammern wie in B und D. In dieser Fokusebene zeigt sich die Gurken Lokalisation anterior-dorsal (blau), wie in A.

Anhand dieser Ergebnisse ist jedoch keine Aussage möglich, ob es sich bei der Fehlverteilung von Staufräumen um einen primären Effekt handelt, also eine direkte Folge der mutanten *DaPKC*, oder um einen sekundären Effekt. Die Fehlverteilung kann eine Folge der morphologischen Defekte der Eikammern sein. Daher wurden im Folgenden Follikelzellklone und Keimbahnklone der verschiedenen *DaPKC* Allele erstellt.

### 3.2.2 Follikelzellklone in *DaPKC*<sup>k06403</sup> zeigen den Verlust der Polarität

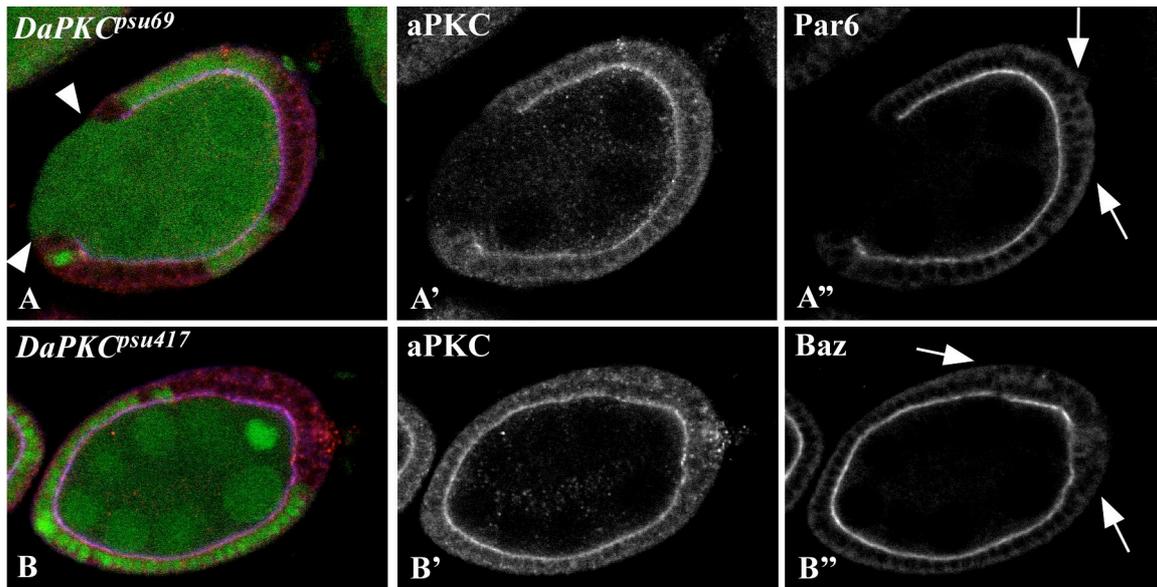
Die Follikelzellen der Eikammer stellen eine Sonderform der Epithelzellen dar, da sie die Eigenschaften sowohl primärer als auch sekundärer Epithelzellen aufweisen. Sie besitzen eine ZA, exprimieren *Crb* und entstehen aus mesenchymalen Zellen. Im Unterschied zu anderen Epithelien ist die apikale Membran keine freie Oberfläche, sondern steht im Kontakt mit den Zellen der Keimbahn. Signale zwischen den Follikelzellen und der Oocyte sind für die korrekte Achsendeterminierung der Oocyte notwendig.

Da in der Oocyte der homozygoten *DaPKC*<sup>psu</sup> Allele die Polarität teilweise gestört ist wurden Follikelzellklone erzeugt. Die mutanten Klone erkennt man durch den Verlust des GFP-Markers (vgl. 2.2.3.3). Klone in *DaPKC*<sup>k06403</sup> exprimieren keine *DaPKC* (rot in Abbildung 23A) und zeigen auch keine apikale Lokalisation von *Baz* (Abb. 23A' und A'') und *Crb* (Abb. 23B' und B'') mehr. *Crb* ist teilweise lateral an der Membran (Pfeilkopf in Abb. 23B'') und *Baz* erscheint teilweise an der Membran und diffus im Cytoplasma (Abb. 23A''). Nur in den wildtypischen Follikelzellen, in grün durch GFP markiert, sind beide Marker noch apikal lokalisiert (Abb. 23A' und B'). *DaPKC*<sup>k06403</sup> Zellklone führen zu einer Mehrschichtigkeit des Follikelepithels. Dies konnte auch in anderen Untersuchungen gezeigt werden. Kernfärbungen weisen darauf hin, dass es sich nicht um eine Überproliferation, sondern um eine Verschiebung der Zellen nach anterior und posterior handelt (Abdelilah-Seyfried et al., 2003). Die Zellformen sind in Abb. 23B, C und C' in rot durch Aktin dargestellt. Die Zellen haben ihre säulenartige Form verloren und sind stattdessen abgerundet wie es in mesenchymalen Zellen vorkommt. Die gesamte Struktur der Eikammern in Abb. 23B und C wirkt, als übe die Basalmembran Druck auf die Eikammer aus, so dass, die Zellen der Keimbahn und des Follikelepithels sich nach anterior und posterior verschieben. Neben dem sonst einschichtigen Follikelepithel haben auch die Keimbahnzellen ihre Struktur verloren zeigen keine sauber abgegrenzte runde oder ovale Form mehr.



**Abbildung 23: Der Verlust der DaPKC in Follikelzellen führt zum Verlust der Polarität.** In Klonen von *DaPKC<sup>k06403</sup>*, die durch den Verlust des GFP markiert sind, kann keine DaPKC detektiert werden (A) und die Zellen sind abgerundet (Aktin rot in B, C und C'). Baz und Crb lokalisieren in wildtypischen Follikelzellen apikal (A' und B') und sind in Klonen fehlverteilt im Cytoplasma (A'') bzw. an der Membran (Pfeilkopf in B''). Das sonst einschichtige Follikel epithel ist im anterioren bzw. posterioren Bereich mehrschichtig geworden.

Die Follikelzellklone der verschiedenen *DaPKC<sup>psu</sup>* Allele zeigen nicht den Verlust ihrer Polarität wie das Null-Allel *DaPKC<sup>k06403</sup>*. Solange die Zellen in direkten Kontakt zu den Keimbahnzellen stehen bleibt die Polarität der Zellen erhalten. Abbildung 24 zeigt DaPKC zusammen mit Par-6 (Abb. 24A-A'') und Baz (Abb. 24B-B'') sowohl in wildtypischen Zellen, als auch in den Klonen apikal kolokalisieren. Nur in den Zellklonen, die nicht in Kontakt zur Keimbahn stehen (Bereich in Abb. 24A'' und B'' durch Pfeile markiert), sind die Proteine nicht mehr akkumuliert und die Zellform erscheint nicht mehr säulenförmig. Ein weiterer Phänotyp ist der Verlust von Follikelzellen, so dass das Epithel nicht mehr komplett um die Keimbahn herum liegt (Bereich in Abb. 24A durch Pfeilköpfe markiert). Dies wurde auch schon für *crb* und *patj* Mutanten gezeigt. Der Verlust der Epithelzellen entsteht wahrscheinlich durch eine frühe Degeneration der mutanten Zellen, die sich nicht ins Epithel eingliedern können (Tanentzapf et al., 2000).

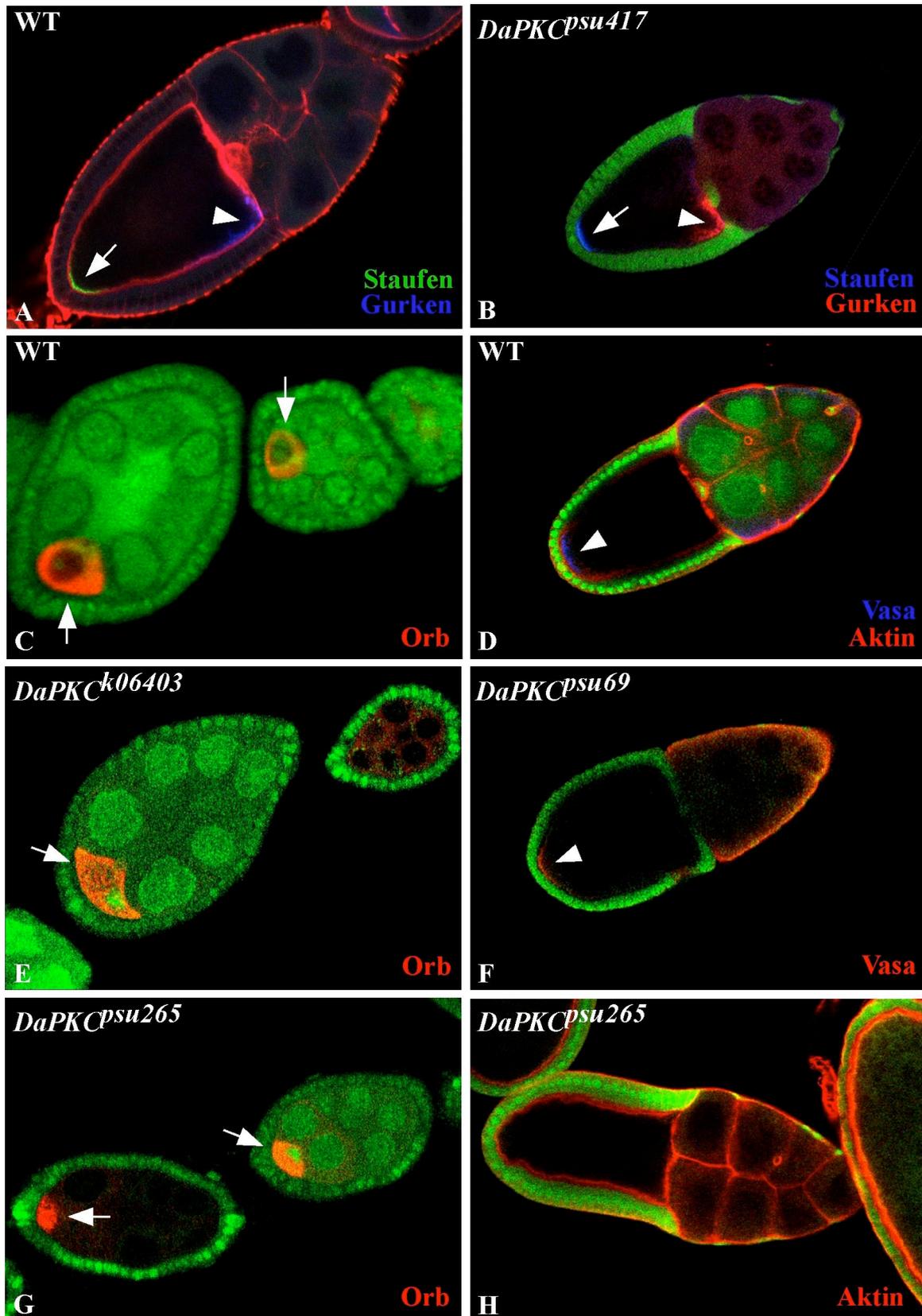


**Abbildung 24: Die Komponenten des Par/aPKC-Komplexes kolokalisieren apikal.** GFP in grün. In den Allelen *DaPKC<sup>psu69</sup>* und *DaPKC<sup>psu417</sup>* ist die Polarität in den Zellen der Follikelklone nicht beeinträchtigt. Die Follikelzellklone sind durch den Verlust von GFP markiert. (A-A'') DaPKC und Par-6 kolokalisieren auch in den Klonen apikal. (B-B'') Dies gilt auch für DaPKC und Baz. (A'' und B'') In Zellen, die nicht in direktem Kontakt zur Keimbahn stehen (Bereich durch Pfeile markiert), liegen die Proteine nur noch cytoplasmatisch vor. (A) Die Pfeilköpfe markieren den Bereich, in dem die Keimbahn nicht von den Epithelzellen eingeschlossen ist.

### 3.2.3 Keimbahnklone der *DaPKC<sup>psu</sup>* Allele zeigen in Ovarien keine Defekte

In *DaPKC<sup>k06403</sup>* Keimbahnklonen findet mit hoher Penetranz keine Oocyten-Differenzierung statt. So entsteht in der Eikammer keine Oocyte und stattdessen entstehen 16 Nährzellen (Cox et al., 2001b). Die Defekte in der Oogenese und auch in der Polarität der Oocyte in den homozygoten *DaPKC<sup>psu</sup>* Weibchen (vgl. 3.2.1) sowie deren Sterilität (vgl. 3.1.3) weisen auch darauf hin, dass die verschiedenen Allele die Oogenese beeinflussen. Daher wurden Keimbahnklone für die verschiedenen *DaPKC<sup>psu</sup>*-Allele hergestellt. Eikammern mit GFP-Expression in den Keimbahnzellen exprimieren auch die wildtypische DaPKC. Keimbahnzellen in denen nur das mutante Gen der *DaPKC* exprimiert wird, können anhand fehlender GFP-Expression identifiziert werden (vgl. 2.2.3.2).

Interessanterweise verhalten sich die Keimbahnklone aller *DaPKC<sup>psu</sup>* Allele für alle hier untersuchten Marker zur Polarität der Oocyte wildtypisch. In Abbildung 25B sind sowohl Gurken (rot, Pfeilkopf) als auch Staufen (blau, Pfeil) wie im Wildtyp (Abb. 25A) korrekt lokalisiert. Dies gilt auch für Vasa (Pfeilkopf in Abb. 25F, Wildtyp in Abb. 25D), welches wie Staufen posterior lokalisiert. Auch das Aktin-Cytoskelett (rot in Abb. 25H) zeigt sich wie im Wildtyp (rot in Abb. 25A und D). Selbst die Oocyten-Differenzierung, die in *DaPKC<sup>k06403</sup>* zu 72% (n=64) versagt (rot in Abb. 25E), findet hier korrekt statt, was durch die Lokalisation von Orb (rot, Pfeil in Abb. 25G) belegt wird.



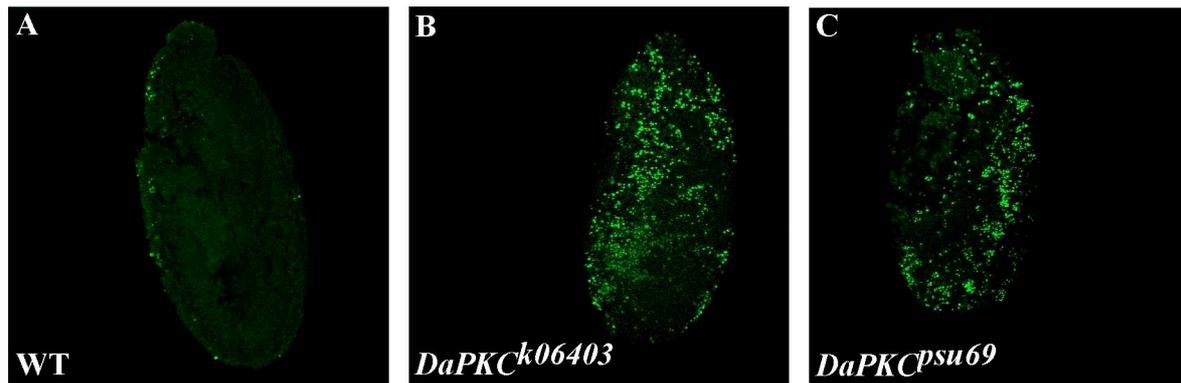
**Abbildung 25 (vorherige Seite, 53): Die Keimbahnklone der *DaPKC<sup>psu</sup>* Allele zeigen eine Polarität wie im Wildtyp.** B-H zeigen GFP in grün. In Keimbahnklonen der verschiedenen *DaPKC<sup>psu</sup>* Allele lokalisieren die hier eingesetzten Marker wie im Wildtyp. Die Klone sind durch den Verlust an GFP in den Keimzellen markiert. (A) Wildtypische Eikammer ohne GFP-Konstrukt mit Staufen (grün, Pfeil), Gurken (blau, Pfeilkopf) und der Färbung des Aktin-Cytoskeletts (rot). (B) *DaPKC<sup>psu417</sup>* zeigt eine korrekte Determination der Oocyte durch die Lokalisation von Staufen (blau, Pfeil) und Gurken (rot, Pfeilkopf) wie im Wildtyp. Die Lokalisation von Vasa posterior in der Oocyte findet in *DaPKC<sup>psu69</sup>* ebenso statt (rot in F, Pfeilkopf) wie im Wildtypen (blau in D, Pfeilkopf). (C) Die Lokalisation von Orb (rot) in der Oocyte (Pfeil) zeigt deren Differenzierung. (E) In *DaPKC<sup>k06403</sup>* findet die Selektion der Oocyte häufig nicht statt. Die obere Eikammer zeigt weder eine GFP-Markierung in der Keimbahn, noch Orb in irgendeiner Keimbahnzelle akkumuliert. (G) In *DaPKC<sup>psu265</sup>* und den anderen Allelen findet eine Orb Akkumulation in der Oocyte statt (Pfeil). Auch das Aktin-Cytoskelett (rot in H und D) zeigt ein Muster wie im Wildtyp (A). Die korrekte Lokalisation der jeweiligen Marker gilt für alle *DaPKC<sup>psu</sup>* Allele.

### 3.3 Untersuchung der Embryonen von Keimbahnklonen der *DaPKC<sup>psu</sup>* Allele

Homozygote *DaPKC<sup>k06403</sup>* Embryonen entwickeln sich normal weiter bis zum zweiten Larvenstadium und Keimbahnklone zeigen bereits während der Oogenese starke Defekte (Wodarz et al., 2000; Cox et al., 2001b; Rolls et al., 2003). Dies deutet auf eine sehr starke maternale Komponente hin, die in den hier durchgeführten Untersuchungen ausgeschaltet wurde. In den Embryonen der Keimbahnklone wurde die Ausbildung der Polarität in den Epithelzellen und Neuroblasten untersucht. Dabei wurde insbesondere auf die gegenseitige Abhängigkeit der Proteine des Par/aPKC-Komplexes in den verschiedenen *DaPKC<sup>psu</sup>* Allelen geachtet.

#### 3.3.1 Zelltodnachweis durch TUNEL-Färbung in *DaPKC* Keimbahnklonen

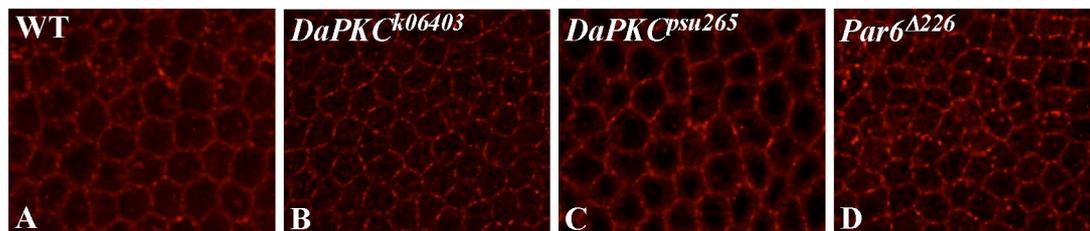
In verschiedenen Stadien der Entwicklung und auch später in ausdifferenzierten Geweben ist der programmierte Zelltod, Apoptose, absolut notwendig. Zum einen ist die Apoptose für die Strukturbildung wichtig und im reifen Gewebe, z.B. im Darm oder Knochenmark, wird die Zellzahl nicht nur über Zellproliferation, sondern auch durch Apoptose reguliert. Auch viele Nervenzellen sterben, um ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen ihnen und den zu innervierenden Zellen herzustellen. Im Gegensatz zur Nekrose, bei der die Zelle durch eine Schädigung stirbt und Nachbarzellen beeinflusst werden können, verläuft die Apoptose gezielt in der jeweiligen Zelle ab. In den Keimbahnklonen der *DaPKC<sup>k06403</sup>* und auch in den verschiedenen *DaPKC<sup>psu</sup>* Mutanten tritt Apoptose verstärkt in allen Bereichen des Embryos auf (Abbildung 26).



**Abbildung 26: Verstärkte Apoptose in Embryonen von Keimbahnklonen der *DaPKC*.** (A) Im Wildtyp tritt Apoptose in einigen Bereichen des Embryos auf, wohingegen in den Keimbahnklonen des Allels *DaPKC*<sup>k06403</sup> verstärkt Apoptose vorkommt (B). (C) *DaPKC*<sup>psu69</sup> zeigt wie auch die anderen *DaPKC*<sup>psu</sup> Allele ebenfalls ein verstärktes Auftreten von Apoptose.

### 3.3.2 Die Lokalisation der Par-Proteine in Epithelzellen ist voneinander abhängig

Zunächst wurde überprüft, inwieweit DaPKC, Baz und Par-6 in den Embryonen der Keimbahnklone noch an der Membran lokalisiert sind. Hierfür wurden die Epithelzellen zu Beginn der Gastrulation (Stadium 6) und später zum Ende der Keimstreifausstreckung (ca. Stadium 11) in der Aufsicht und im Längsschnitt aufgenommen. Im zellulären Blastoderm, wenn Baz beginnt, an der AJ zu akkumulieren, erscheint seine Lokalisation in allen Allelen noch wildtypisch (Abbildung 27). DaPKC und Par-6 sind zu diesem Zeitpunkt apikal an der Membran und im Cytoplasma angereichert.

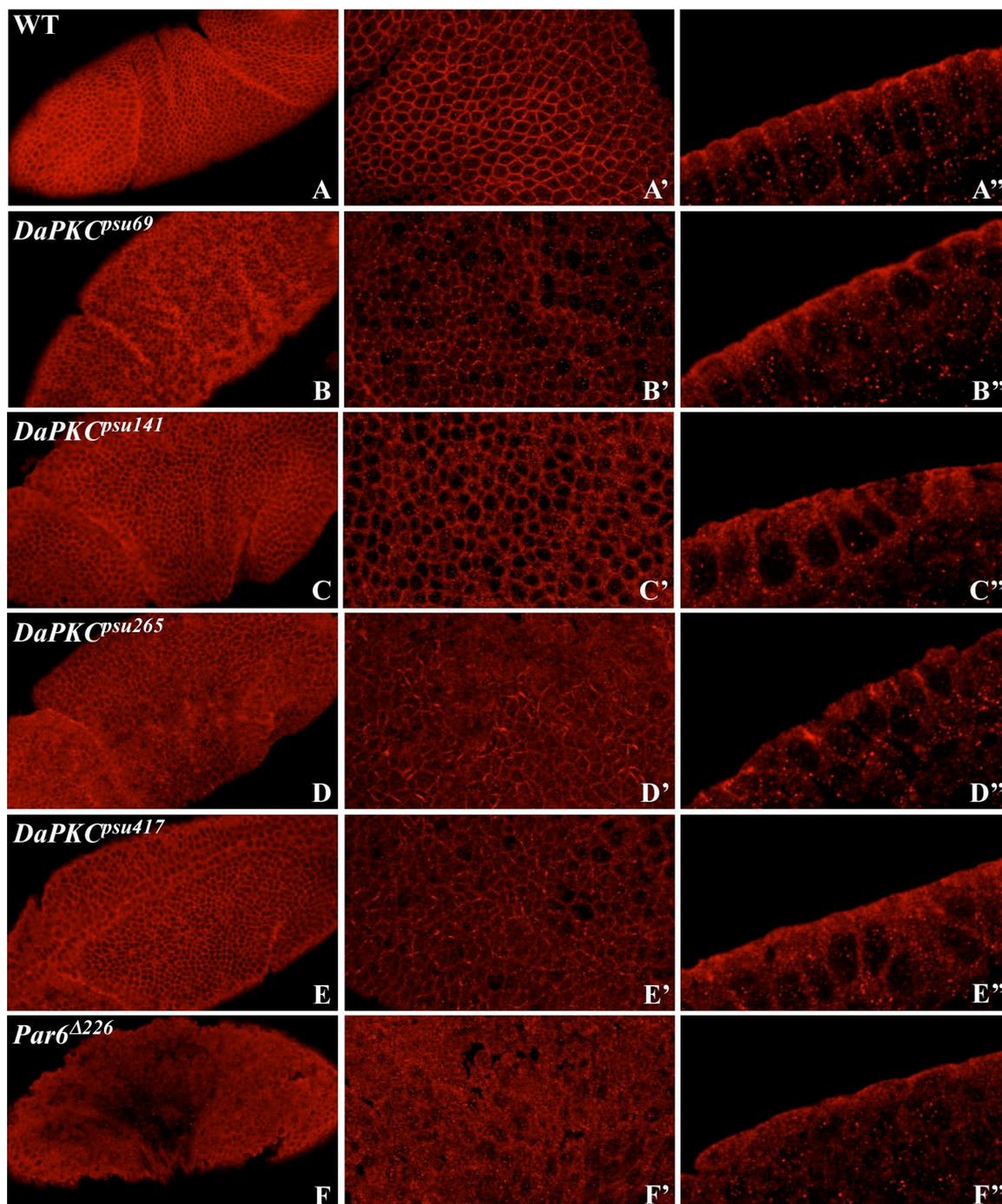


**Abbildung 27: Lokalisation von Baz im zellulären Blastoderm.** (A) Im Wildtyp lokalisiert Baz im zellulären Blastoderm an den AJ. In *DaPKC*<sup>k06403</sup> (B) und *DaPKC*<sup>psu265</sup> (C), stellvertretend für alle *DaPKC*<sup>psu</sup> Allele, zeigt sich in den Embryonen der Keimbahnklone eine Verteilung von Baz wie im Wildtyp. Auch in dem Null-Allel von *par-6* erscheint die Baz Lokalisation im zellulären Blastoderm wildtypisch (D).

#### 3.3.2.1 DaPKC lokalisiert in Mutanten der *DaPKC* Allele zu Beginn der Gastrulation unregelmäßig an der Membran

Bereits zu Beginn der Gastrulation sieht man Defekte in der Verteilung der DaPKC. Abbildung 28A und A' zeigen DaPKC im Wildtyp gleichmäßig an der apikalen Membran lokalisiert. Im Längsschnitt der Zellen sieht man DaPKC in der SAR akkumuliert (Abb. 28A''). In den *DaPKC*<sup>psu</sup> Allelen sieht man bereits in der Übersicht (Abb. 28B-E) und

besonders in der Vergrößerung (Abb. 28B'-E'), dass die DaPKC nicht mehr gleichmäßig an der Membran lokalisiert. In den Allelen *DaPKC<sup>psu69</sup>* und *DaPKC<sup>psu141</sup>* scheint das Protein punktuell an einigen Bereichen der Membran zu akkumulieren (Abb. 28B' und C'), während es in *DaPKC<sup>psu265</sup>* und *DaPKC<sup>psu417</sup>* eher an größeren Bereichen entlang der Membran lokalisiert (Abb. 28C' und E'). Im Längsschnitt ist die DaPKC diffus im Cytoplasma verteilt (Abb. 28B''-E'') und hier nur in *DaPKC<sup>psu265</sup>* noch teilweise an der Membran lokalisiert (Abb. 28D''). In dem Allel *Par6<sup>Δ226</sup>* ist die DaPKC bereits zu Beginn der Gastrulation nur diffus im Cytoplasma verteilt (Abb. 28F-F'').



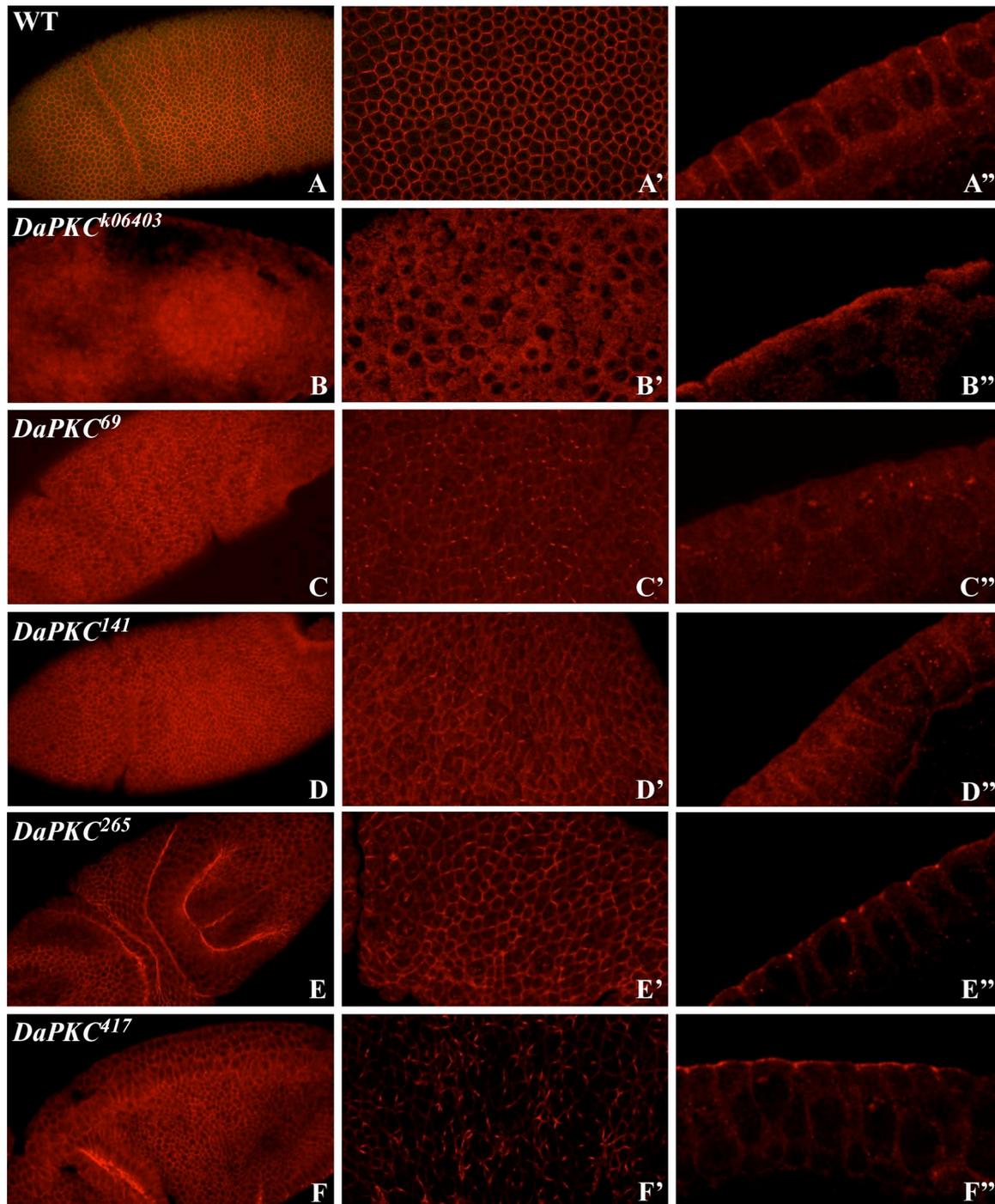
**Abbildung 28 (vorherige Seite, 56): Lokalisation der DaPKC in Keimbahnklon-Embryonen während der frühen Gastrulation.** A-F zeigt jeweils den Embryo in dem Stadium, aus dem die vergrößerten Aufnahmen stammen. (A') Im Wildtyp ist die DaPKC gleichmäßig an der apikalen Membran lokalisiert und akkumuliert in der SAR (A''). In B sieht man deutlich, dass die DaPKC nicht gleichmäßig an der Membran lokalisiert. (B' und C') DaPKC akkumuliert verstärkt in kleinen punktuellen Bereichen an der Membran in Keimbahnklonen von *DaPKC<sup>psu69</sup>* und *DaPKC<sup>psu141</sup>*. (D' und E') Im Gegensatz zu B' und C' ist hier die DaPKC Lokalisation an größeren Bereichen entlang der Membran auszumachen. Jedoch sieht man auch hier keine gleichmäßige Lokalisation wie im Wildtyp (A'). In B''-E'' ist das Protein nicht mehr nur in der SAR akkumuliert, sondern mehr diffus im Cytoplasma. *DaPKC<sup>psu265</sup>* zeigt in einigen Bereichen noch DaPKC an der Membran lokalisiert (D''). In *Par6<sup>Δ226</sup>* findet man die DaPKC nur diffus im Cytoplasma (F-F'').

### 3.3.2.2 Par-6 zeigt eine ähnliche Lokalisation wie DaPKC in Mutanten der *DaPKC* Allele

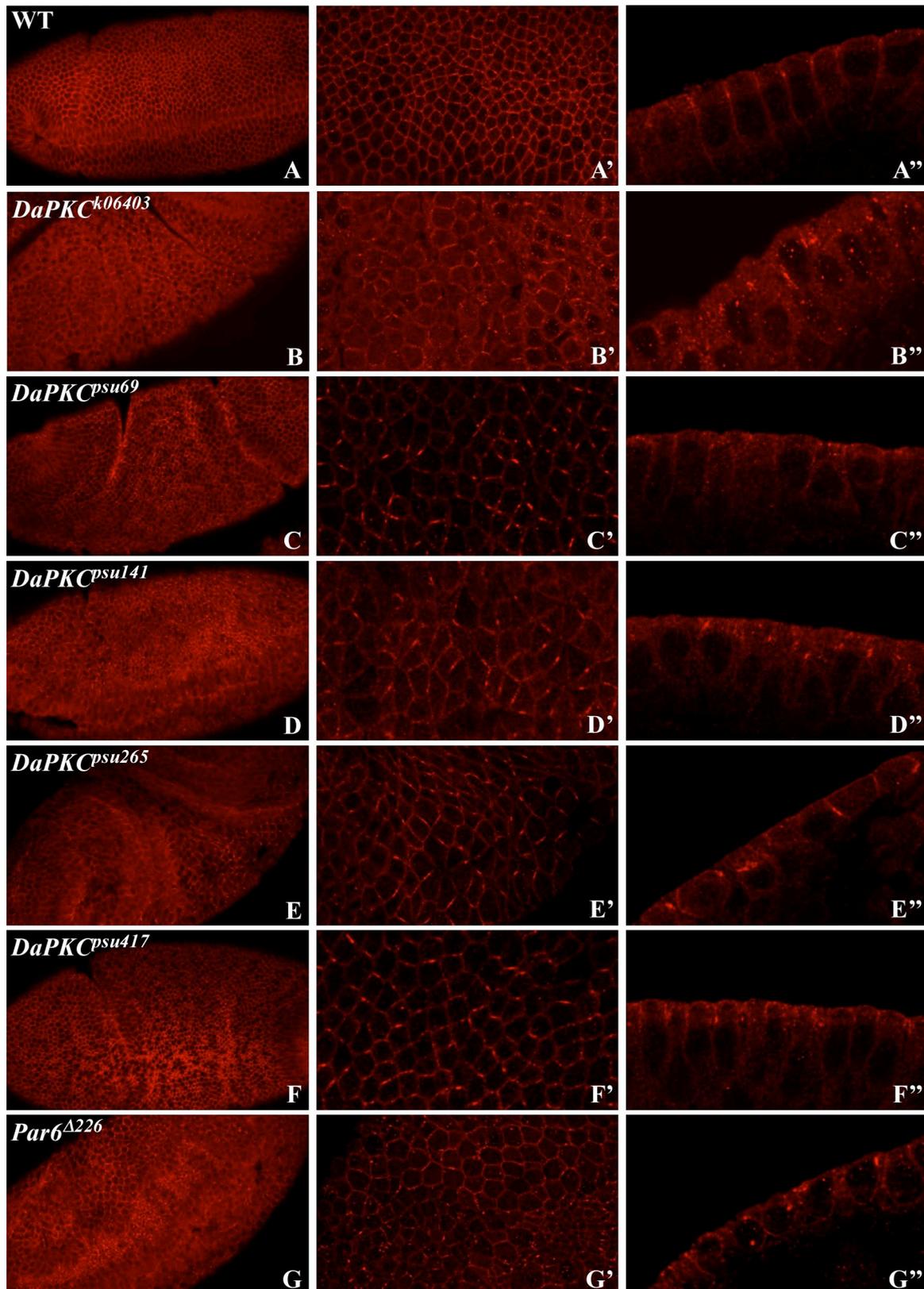
Wie DaPKC lokalisiert Par-6 im Wildtyp regelmäßig apikal an der Membran (Abbildung 29A-A''). In *DaPKC<sup>k06403</sup>* ist Par-6 komplett diffus (Abb. 29B-B''), wie umgekehrt die DaPKC Verteilung in den Keimbahnklonen von *Par6<sup>Δ226</sup>* (Abb. 28F-F''). Die Lokalisation von Par-6 in den Keimbahnklonen der verschiedenen *DaPKC* Allele ist der Lokalisation von DaPKC sehr ähnlich. Auch hier ist die Lokalisation in den *DaPKC<sup>psu69</sup>* und *DaPKC<sup>psu141</sup>* Allelen verstärkt punktuell an der Membran und zeigt sich im Längsschnitt komplett cytoplasmatisch (Abb. 29C'-D''). In *DaPKC<sup>psu265</sup>* und *DaPKC<sup>psu417</sup>* lokalisiert Par-6 eher in etwas größeren Bereichen entlang der Membran (Abb. 29E' und F'), jedoch nicht so regelmäßig wie im Wildtyp.

### 3.3.2.3 Baz lokalisiert unregelmäßig und diffus in den Epithelzellen der *DaPKC* Allele

Nachdem Baz während des zellulären Blastoderms noch wie im Wildtyp lokalisiert, ist Baz während der frühen Gastrulation nicht mehr korrekt lokalisiert. In der Aufsicht des Wildtyps ist es regelmäßig an der Membran lokalisiert (Abbildung 30A und A') und akkumuliert im Längsschnitt der Zellen auf Höhe der ZA (Abb. 29A''). In *DaPKC<sup>k06403</sup>* zeigt sich eine starke Fehlverteilung von Baz, das hier sowohl lateral an der Membran als auch im Cytoplasma zu finden ist (Abb. 30B' und B''). In der Aufsicht lokalisiert es nicht mehr gleichmäßig an der Membran (Abb. 30B') und im Längsschnitt sieht man auch deutlich, dass die Epithelzellen kein sauber abgrenzendes Epithel mehr bilden (Abb. 30B''). In den anderen Allelen tritt dieser Defekt noch nicht auf. Baz ist in den vier *DaPKC<sup>psu</sup>* Allelen, im Gegensatz zu DaPKC und Par-6, in gleicher Weise fehllokalisiert. In der Aufsicht sieht man Baz in allen Allelen unregelmäßig an der Membran lokalisiert (Abb. 30C'-F'). Im Längsschnitt sieht man Baz nicht nur auf Höhe der ZA, sondern auch in der SAR und lateral an der Membran verteilt (Abb. 30C''-F''). Auch in *Par6<sup>Δ226</sup>* zeigen sich ähnliche Defekte (Abb. 30G-G'').



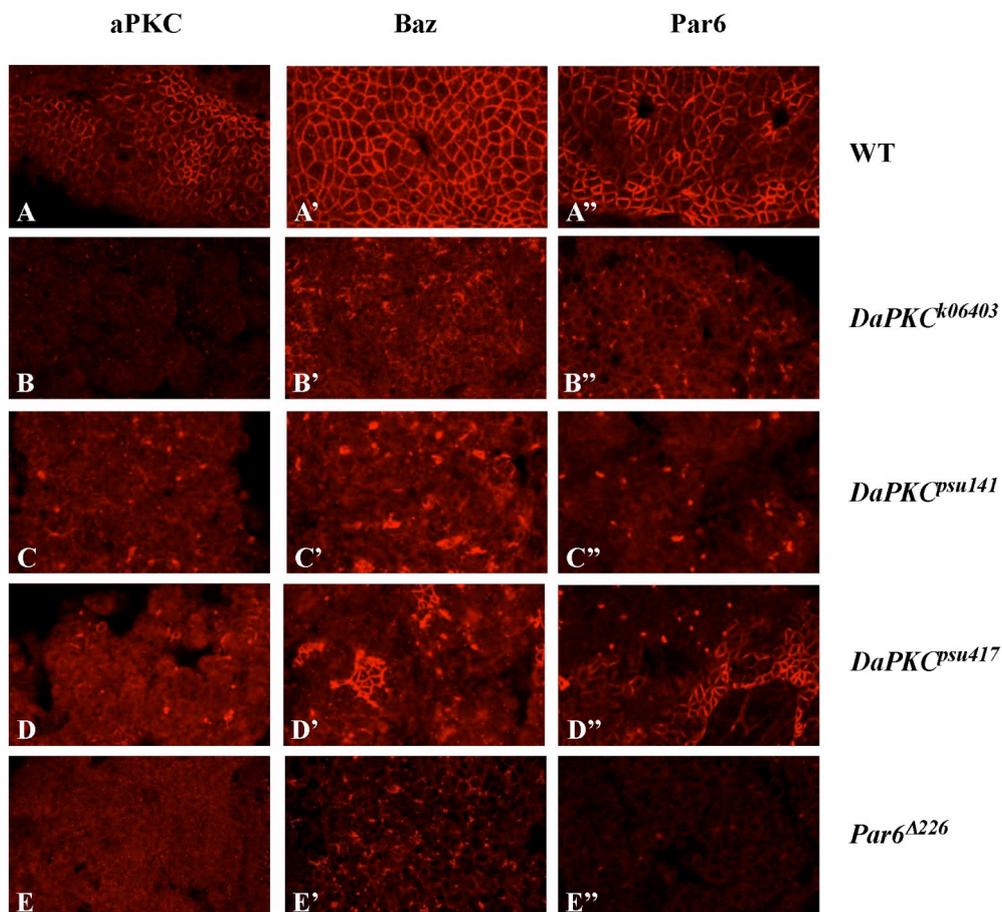
**Abbildung 29: Par-6 lokalisiert in Keimbahnklon-Embryonen von  $DaPKC^{k06403}$  komplett cytoplasmatisch.** (A-A'') zeigt die wildtypische Verteilung von Par-6 an der Membran zu Beginn der Gastrulation. In dem Allel  $DaPKC^{k06403}$  liegt Par-6 komplett cytoplasmatisch vor (B-B''), wie umgekehrt die DaPKC Lokalisation im *par-6* Null-Allel. Auch in  $DaPKC^{psu69}$  (C' und C'') und  $DaPKC^{psu141}$  (D' und D'') lokalisiert Par-6 kaum noch an der Membran. Dagegen liegt es in  $DaPKC^{psu265}$  und  $DaPKC^{psu417}$  noch teilweise an der Membran vor (E'-F') und akkumuliert auch in der SAR (E''-F'').



**Abbildung 30: Baz Lokalisation in der frühen Gastrulation zeigt Verlust der Polarität in Epithelzellen.** In der frühen Gastrulation ist auch Baz, wie DaPKC und Par-6, nicht mehr gleichmäßig an der Membran lokalisiert. A-G zeigt das jeweilige Stadium des Keimbahnklon-Embryos, in dem auch die Vergrößerungen aufgenommen wurden. Im Wildtyp lokalisiert Baz gleichmäßig an der Membran (A' und A''). In dem Null-Allel *DaPKC*<sup>k06403</sup> ist Baz nicht regelmäßig an der ZA, sondern auch entlang der lateralen Membran und im Cytoplasma (B' und B'') lokalisiert. Die vier *DaPKC*<sup>psu</sup> Allele und auch *Par6*<sup>Δ226</sup> zeigen Baz unregelmäßig an einigen wenigen Bereichen der Membran (C'-G') und im Längsschnitt der Zellen nicht nur auf die ZA beschränkt (C''-G'').

### 3.3.2.4 Verteilung der Par/aPKC-Komponenten während der Keimstreifenausstreckung in Mutanten der *DaPKC* Allele

Im Wildtyp sind alle drei Komponenten des Par/aPKC-Komplexes an der Membran lokalisiert (Abbildung 31A-A''). Ausgehend von den früheren Stadien setzt sich in den *DaPKC*-Mutanten die Fehlverteilung der Proteine fort. In der Aufsicht zeigen sich die Proteine jedoch nicht mehr entlang der Membran lokalisiert, sondern es scheint, als akkumulieren sie eher in kleineren und größeren punktuellen Bereichen. In *DaPKC<sup>k06403</sup>* ist die aPKC nicht detektierbar und Baz und Par-6 sind diffus im Cytoplasma verteilt und nur noch teilweise in kleinen Bereichen an der Membran (Abb. 31B-B'') akkumuliert. In Abb. 31C-C'' lokalisiert im Allel *DaPKC<sup>psu141</sup>*, ähnlich wie im Allel *DaPKC<sup>psu69</sup>*, die aPKC nur punktuell an der Membran und Baz und Par-6 findet man wie in *DaPKC<sup>k06403</sup>* meist diffus im Cytoplasma. Jedoch gibt es hier etwas größere Bereiche, in denen Baz und Par-6 akkumulieren. Das Allel *DaPKC<sup>psu417</sup>* scheint wie das Allel *DaPKC<sup>psu265</sup>* etwas schwächer zu sein, da es hier noch Bereiche in der Epidermis gibt, in denen Baz und Par-6 korrekt an der Membran lokalisieren (Abb. 31D-D''). In *Par6<sup>Δ226</sup>*, einem Null-Allel, ist die DaPKC diffus verteilt, Baz dagegen teilweise noch an der Membran und Par-6 nicht detektierbar (Abb. 31E-E'').



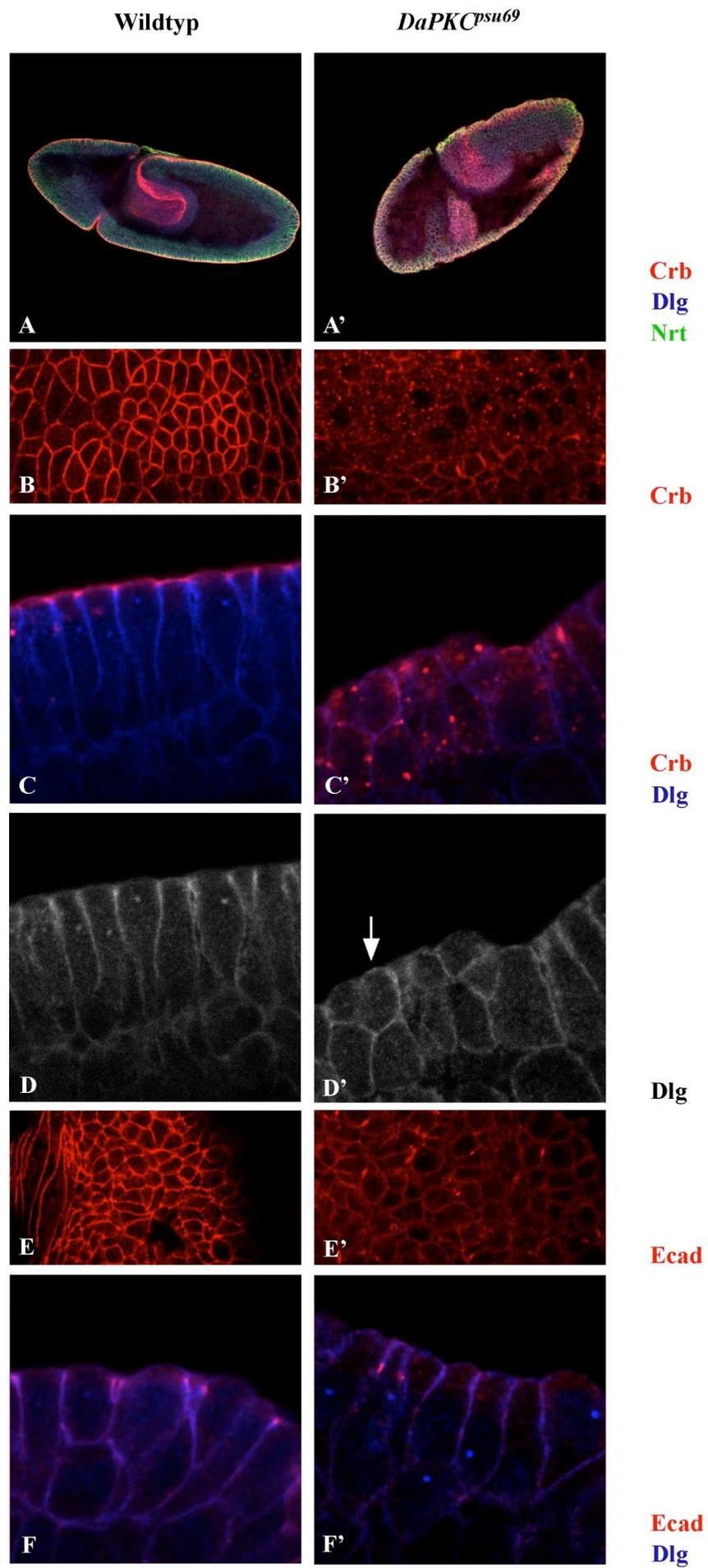
**Abbildung 31 (vorherige Seite, 60): Die Lokalisation der Proteine des Par/aPKC-Komplexes ist voneinander abhängig.** (A-A'') Im Wildtyp lokalisieren DaPKC, Baz und Par-6 an der Membran. In allen Keimbahnklon-Embryonen der Allelen von *aPKC* und *par6* kommt es zum Verlust der Membranständigkeit der Proteine des Par/aPKC-Komplexes. Das Allel *DaPKC<sup>psu417</sup>* scheint schwächer zu sein, da Baz und Par-6 über einige Bereiche noch an der Membran lokalisieren.

### 3.3.2.5 In *DaPKC* Mutanten zeigen sich Polaritätsdefekte entlang der gesamten Membran

Des Weiteren wurde anhand von Längsschnitten die Lokalisation von Proteinen überprüft, die in wildtypischen Epithelzellen in der SAR, an der ZA und an der SJ der basolateralen Membran vorkommen.

In wildtypischen Embryonen sind Crb und DE-Cad deutlich an der Membran lokalisiert (Abbildung 32B und E). Im Längsschnitt in Abb. 32C sieht man Crb (rot) in der SAR akkumuliert und Dlg (blau) basal zur SAR entlang der Membran. Dabei ist Dlg deutlich apikal an der SJ angereichert (Abb. 32C und D). In Abb. 32C und D sieht man die säulenartige Form der Epithelzellen. DE-Cad lokalisiert an der ZA (rot in Abb. 32F), basal zu Crb. In den *DaPKC<sup>psu69</sup>* Keimbahnklonen sieht man bereits in Abb. 32A', dass das Epithel, das den Embryo umgibt, nicht mehr so klar und sauber abgeschlossen ist wie im Wildtypen (Abb. 32A). Crb ist nicht mehr an der Membran lokalisiert, sondern in vesikelartigen Partikeln im Cytoplasma (Abb. 32B' und rot in Abb. C'). Dlg ist noch an der Membran lokalisiert, jedoch ist es nicht mehr im apikalen Bereich der basolateralen Membran angereichert. Dafür erstreckt sich Dlg auch über den apikalen Bereich (Pfeil in Abb. 32D'). Die Lokalisation von DE-Cad ist auch nach basolateral verschoben oder cytoplasmatisch (rot in Abb. 32F'). In Abb. 32D' sieht man deutlich im Vergleich zu Abb. 32D, dass sich die Zellen abgerundet haben. Diese morphologische Veränderung der Epithelzellen wurde auch schon früher für andere Gene, die in der Zellpolarität involviert sind, gezeigt (Tepass und Knust, 1990; Tepass und Knust, 1993). Die Defekte in der Form und Polarität der Epithelzellen sieht man in allen *DaPKC<sup>psu</sup>* Allelen und auch in *DaPKC<sup>k06403</sup>*.

**Abbildung 32 (nächste Seite, 62): Polarität und Form der Epithelzellen in Keimbahnklonen sind gestört.** In den Keimbahnklonen aller *DaPKC<sup>psu</sup>* Allele treten starke Defekte in der Polarität der Epithelzellen auf. Insgesamt wirkt das Epithel in A' nicht so fein abgetrennt wie im Wildtyp (A). B und D zeigen die wildtypische Lokalisation von Crb und Dlg an der Membran. C zeigt im Querschnitt die säulenartige Form der Zellen, in denen Crb (rot) ganz apikal akkumuliert und Dlg (blau) basolateral. Dabei ist Dlg apikal in der basolateralen Membran angereichert (D). (F) DE-Cad (rot) befindet sich apikal von Dlg (blau) an der ZA. In den Keimbahnklonen sieht man Crb deutlich in vesikelartigen Partikeln im Cytoplasma fehlverteilt (B' und rot in C'). In D' sieht man Dlg nicht mehr apikal an der basolateralen Membran angereichert, sondern an der gesamten Membran verteilt und somit auch apikal (Pfeil). D' zeigt auch deutlich, dass die Epithelzellen abgerundet sind im Vergleich zum Wildtyp (D). DE-Cad ist teilweise noch an der Membran lokalisiert (E'), jedoch ist es nicht mehr strikt auf den Bereich der ZA, die hier wahrscheinlich verloren ist, beschränkt (F').

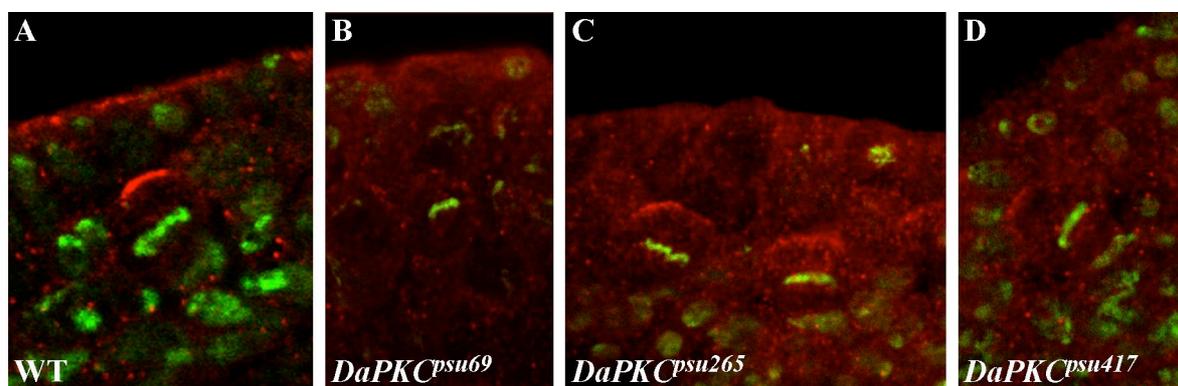


### 3.3.3 Die Neuroblasten zeigen in der Metaphase Defekte in der Polarität

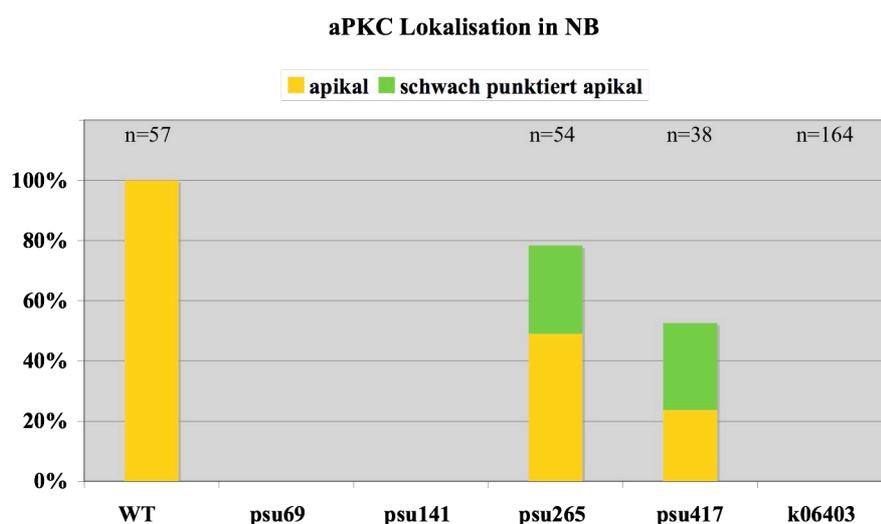
Die NB behalten ihre Polarität, die sie als Epithelzelle aufgebaut haben, bei. Es konnte bereits gezeigt werden, dass für die Polarität in den NB kein intaktes Epithel notwendig ist (Bachmann et al., 2001; Hong et al., 2001). In den Keimbahnklon-Embryonen ist im Gegensatz zu den Epithelzellen, in denen die Komponenten des Par/aPKC-Komplexes diffus verteilt sind, die Polarität in den NB auch hier teilweise noch erhalten. Die genaue Auswertung der ausgezählten NB ist im Anhang dargestellt.

### 3.3.3.1 DaPKC<sup>psu265</sup> und DaPKC<sup>psu417</sup> lokalisieren schwach apikal im Neuroblasten

Im Wildtyp akkumuliert DaPKC in Metaphase-NB in einem apikalen Halbmond (Abbildung 33A). Während DaPKC in *DaPKC<sup>k06403</sup>* nicht nachgewiesen werden kann und es in *DaPKC<sup>psu69</sup>* und *DaPKC<sup>psu141</sup>* cytoplasmatisch vorliegt (Abb. 33B), kann man in *DaPKC<sup>psu265</sup>* (zu 78%) und *DaPKC<sup>psu417</sup>* (zu 53%) geringe Mengen an DaPKC apikal in NB detektieren. Dabei variiert die Menge an Protein, die apikal nachgewiesen werden kann und ist manchmal nur schwach und punktiert detektierbar (rechter NB in Abb. 33C und D). Die prozentuale Verteilung der DaPKC in den verschiedenen *DaPKC* Allelen ist in Diagramm 1 wiedergegeben.



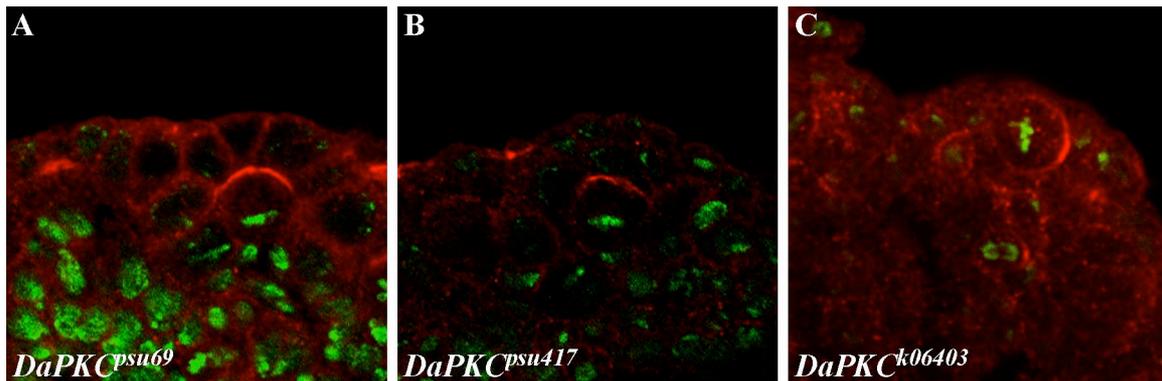
**Abbildung 33: Die apikale Lokalisation von DaPKC in NB variiert.** DaPKC in rot und DNA in grün. Im Wildtyp zeigt sich ein deutlich apikaler Halbmond im NB (A). In Mutanten des Allels *DaPKC<sup>psu69</sup>* ist kein apikaler Halbmond detektierbar (B). (C und D) In den Allelen *DaPKC<sup>psu265</sup>* und *DaPKC<sup>psu417</sup>* ist die DaPKC noch apikal in einem Halbmond detektierbar, kann aber manchmal nur schwach punktiert detektiert werden (rechter NB in C und D).



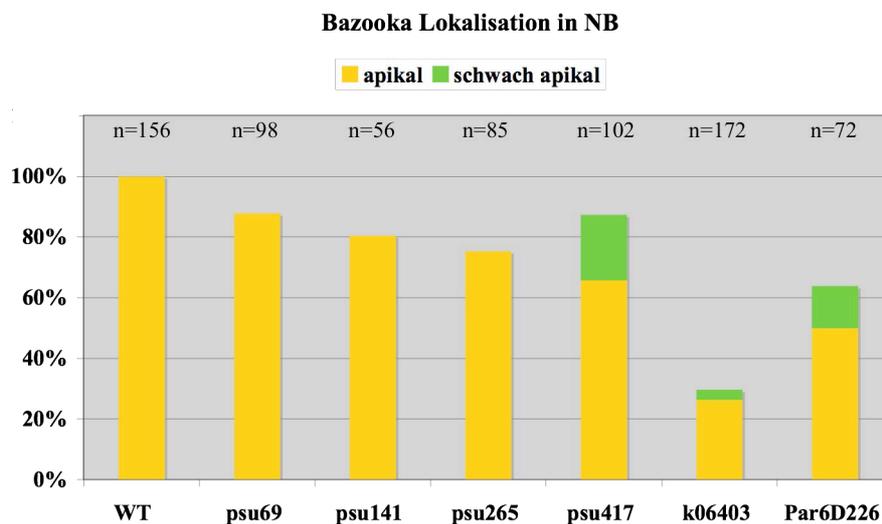
**Diagramm 1: Die apikale Lokalisation von DaPKC in den NB von mutanten *DaPKC* Allelen.** Auf der X-Achse sind der Wildtyp und die verschiedenen *DaPKC*-Allele aufgetragen. Auf der Y-Achse ist der prozentuale Wert abzulesen. n bezeichnet die Anzahl der ausgezählten NB. Für *DaPKC<sup>psu69</sup>* und *DaPKC<sup>psu141</sup>* gibt es keine Zahlenwerte, aber keine der beobachteten NB zeigte eine polarisierte oder cortikale Lokalisation der DaPKC (n>50). Für *DaPKC<sup>k06403</sup>* ist keine DaPKC nachweisbar.

### 3.3.3.2 Baz lokalisiert apikal in den NB der verschiedenen *DaPKC<sup>psu</sup>* Allele

Baz ist dagegen in allen *DaPKC<sup>psu</sup>* Allelen zum großen Prozentsatz (75%-88%) noch apikal in den Metaphase-NB lokalisiert (Abbildung 34A und B, Diagramm 2). Auch in *Par6<sup>Δ226</sup>* ist Baz noch in 64% der ausgezählten NB apikal. In der Null-Mutante *DaPKC<sup>k06403</sup>* zeigen nur 29% eine apikale Lokalisation von Baz im NB (Abb. 34C) und in 61% ist es cytoplasmatisch angereichert.



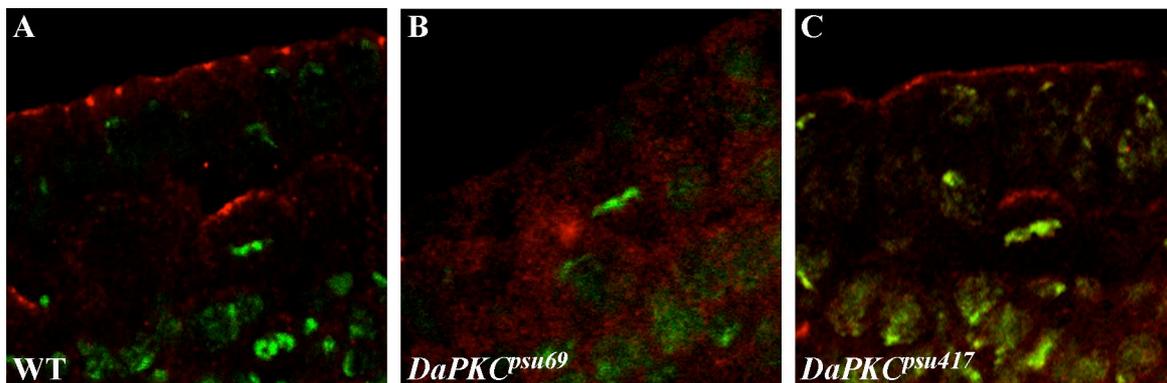
**Abbildung 34: Baz bleibt apikal im NB lokalisiert.** Baz in rot und DNA in grün. (A und B) In den *DaPKC<sup>psu69</sup>* und *DaPKC<sup>psu417</sup>* bleibt Baz meist apikal lokalisiert, im Gegensatz zur Situation in den darüber liegenden Epithelzellen. Auch in den NB von Keimbahnklonen des Null-Allels *DaPKC<sup>k06403</sup>* ist Baz noch in 29% in einem apikalen Halbmond lokalisiert (C).



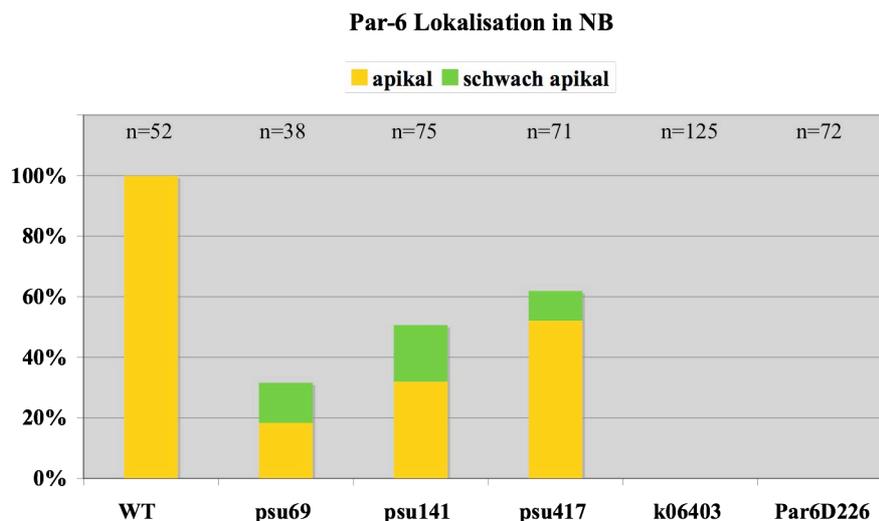
**Diagramm 2: Die apikale Lokalisation von Baz in den NB mutanter *DaPKC* und *par-6* Allele.** Auf der X-Achse sind der Wildtyp, die verschiedenen *DaPKC*-Allele und das Allel für *Par-6* aufgetragen. Auf der Y-Achse ist der prozentuale Wert abzulesen. n bezeichnet die Anzahl der ausgezählten NB. In den Keimbahnklonen aller Allele, außer *DaPKC<sup>k06403</sup>*, ist Baz in den meisten NB noch apikal lokalisiert.

### 3.3.3.3 Die Lokalisation von Par-6 in *DaPKC<sup>psu69</sup>* ist cytoplasmatisch

Wie *DaPKC* und *Baz* ist auch *Par-6* in wildtypischen NB in einem apikalen Halbmond lokalisiert (Abbildung 35A). *Par-6* ist in *Par6<sup>Δ226</sup>* nicht detektierbar und in *DaPKC<sup>k06403</sup>* in allen NB nur im Cytoplasma nachweisbar. In *DaPKC<sup>psu69</sup>* ist *Par-6* in 69% der Neuroblasten nicht mehr apikal lokalisiert (Abb. 35B, Diagramm 3). Für dieses Allel konnte gezeigt werden, dass die *DaPKC* nicht mehr an *Par-6* binden kann. In *DaPKC<sup>psu141</sup>* und *DaPKC<sup>psu417</sup>* lokalisiert *Par-6* in über der Hälfte der Fälle noch apikal. Dabei ist die apikale Lokalisation meist deutlich (Abb. 35C), teilweise aber auch nur schwach nachweisbar.



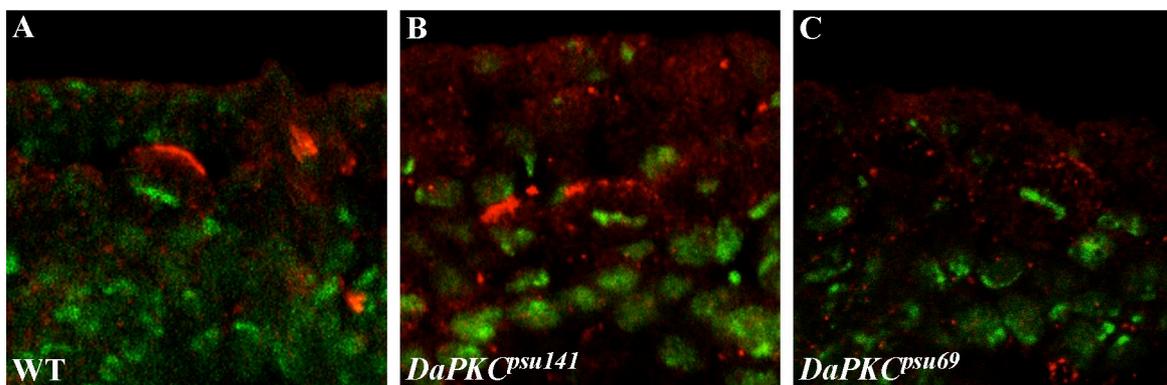
**Abbildung 35: Die Lokalisation von Par-6 ist variabel in den verschiedenen Allelen.** *Par-6* in rot und DNA in grün. Die apikale Lokalisation von *Par-6* zeigt im Wildtyp einen deutlichen Halbmond (A) und ist in *DaPKC<sup>psu69</sup>*, in dem die Bindung der *DaPKC* zu *Par-6* gestört ist, in 69% nicht lokalisiert (B). In *DaPKC<sup>psu417</sup>* ist *Par-6* in 62% der NB noch apikal (C).



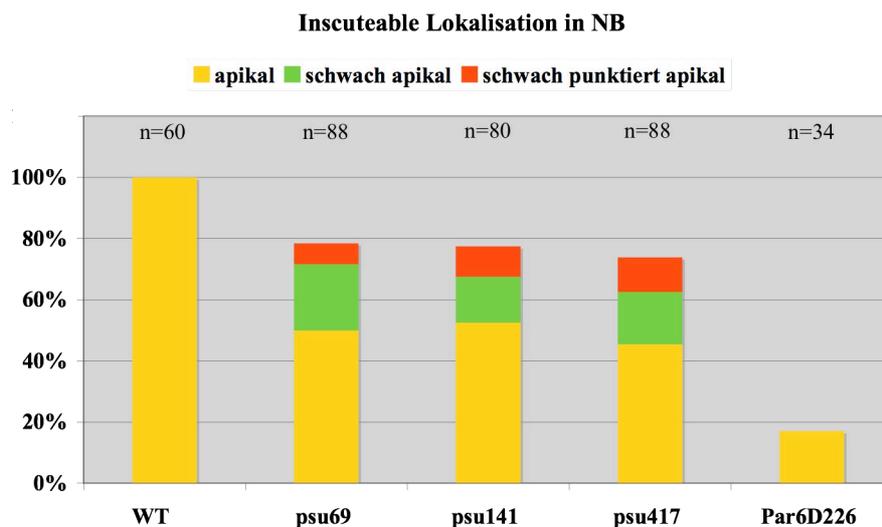
**Diagramm 3: Die apikale Lokalisation von Par-6 in den NB mutanter *DaPKC* und *par-6* Allele.** Auf der X-Achse sind der Wildtyp, die verschiedenen *DaPKC*-Allele und das Allel für *Par-6* aufgetragen. Auf der Y-Achse ist der prozentuale Wert abzulesen. n bezeichnet die Anzahl der ausgezählten NB. In *DaPKC<sup>k06403</sup>* ist *Par-6* cytoplasmatisch und in *Par6<sup>Δ226</sup>* nicht nachweisbar.

### 3.3.3.4 Insc ist in *DaPKC<sup>psu</sup>* Allelen noch apikal lokalisiert

Für Insc konnte gezeigt werden, dass seine Lokalisation von Baz abhängig ist (Wodarz et al., 1999). Da Baz in den Mutanten der *DaPKC<sup>psu</sup>* Allele meist noch apikal lokalisiert, ist eine apikale Lokalisation von Insc (Abbildung 36A), hier in 74%-79% der Fälle, zu erwarten. Jedoch ist der deutliche apikale Halbmond nur in 46%-53% der Fälle zu sehen. Die übrigen Neuroblasten zeigen apikal eine schwache (Abb. 36B) oder sehr schwach punktierte Lokalisation (Abb. 36C) von Insc. Interessanterweise ist die apikale Lokalisation von Insc in *Par6<sup>A226</sup>* Embryonen nur zu 17% gegeben. Eine schematische Übersicht der apikalen Insc Lokalisation ist in Diagramm 4 dargestellt.



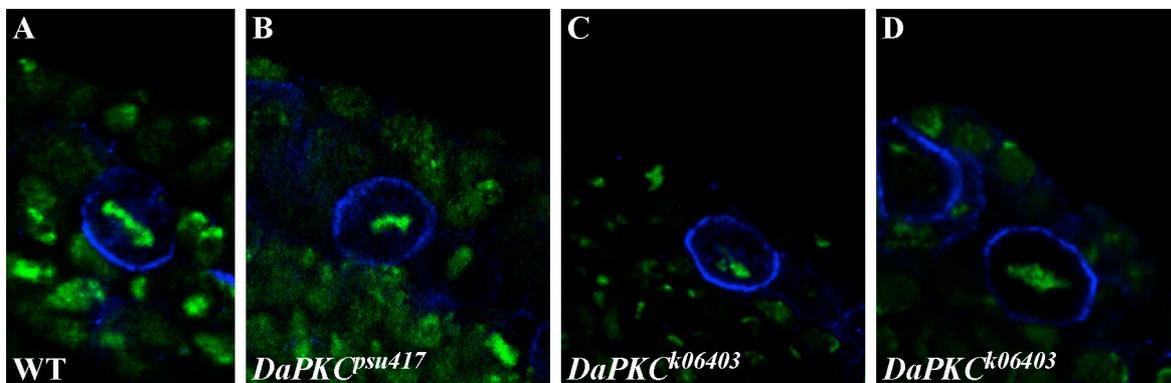
**Abbildung 36: Insc lokalisiert apikal in den NB der Keimbahnklone von den *DaPKC<sup>psu</sup>* Allelen.** Insc in rot und DNA in grün. Die Lokalisation von Insc zeigt im Wildtyp einen sauberen apikalen Halbmond (A). In den verschiedenen Keimbahnklonen der *DaPKC<sup>psu</sup>* Allele ist diese halbmondförmige Lokalisation auch mal schwächer (B) und manchmal nur punktiert (C) ausgeprägt.



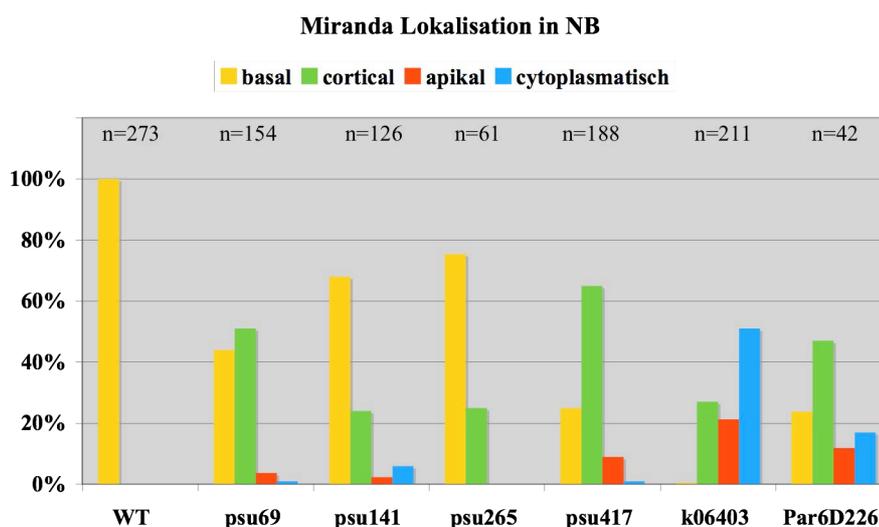
**Diagramm 4: Die apikale Lokalisation von Insc in den NB mutanter *DaPKC* und *par-6* Allele.** Auf der X-Achse sind der Wildtyp, die verschiedenen *DaPKC*-Allele und das Allel für *Par-6* aufgetragen. Auf der Y-Achse ist der prozentuale Wert abzulesen. n bezeichnet die Anzahl der ausgezählten NB. In den *DaPKC<sup>psu</sup>* Allelen ist Insc meist noch apikal lokalisiert wie auch Baz.

3.3.3.5 Mira lokalisiert in *DaPKC<sup>psu417</sup>* cortical

In wildtypischen Metaphase-NB ist Mira nach der Spindelrotation immer basal lokalisiert (Abbildung 37A). Die basale Lokalisation findet in dem Null-Allel *DaPKC<sup>k06403</sup>* nur zu 1% statt. Zu 27% lokalisiert Miranda cortical und in 51% der Fälle ist es gar nicht detektierbar bzw. sehr schwach cortical. Die cortikale Lokalisation von Mira variiert dabei und zeigt neben einer regelmäßigen Verteilung auch eine Akkumulation basal und schwach apikal (Abb. 37C) und auch umgekehrt apikal und schwach basal (Abb. 37D). Eine unpolare, cortikale Verteilung von Mira war in etwa der Hälfte der *DaPKC<sup>psu417</sup>* (65%), *DaPKC<sup>psu69</sup>* (51%) und *Par6<sup>A226</sup>* (47%) mutanten Neuroblasten zu beobachten (Abb. 37B), wohingegen Mira in *DaPKC<sup>psu141</sup>* und *DaPKC<sup>psu265</sup>* meist noch basal lokalisiert (68%-75%). Diagramm 5 zeigt die Mira Lokalisation in der Übersicht.



**Abbildung 37: Cortikale Mira Lokalisation in den NB.** Mira in blau und DNA in grün. (A) Im Wildtyp lokalisiert Mira basal im Metaphase-NB. In den NB der verschiedenen *DaPKC<sup>psu</sup>* Allele und vor allem in *DaPKC<sup>psu417</sup>* lokalisiert es cortical (B). Dabei variiert die cortikale Lokalisation und zeigt sich teilweise basal und zusätzlich schwach apikal (C) oder auch umgekehrt apikal mit einer schwächeren Lokalisation basal (D).

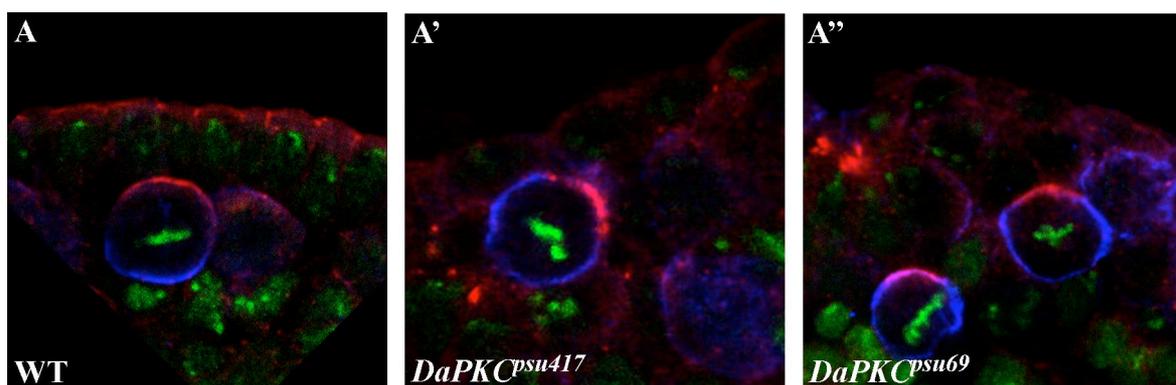
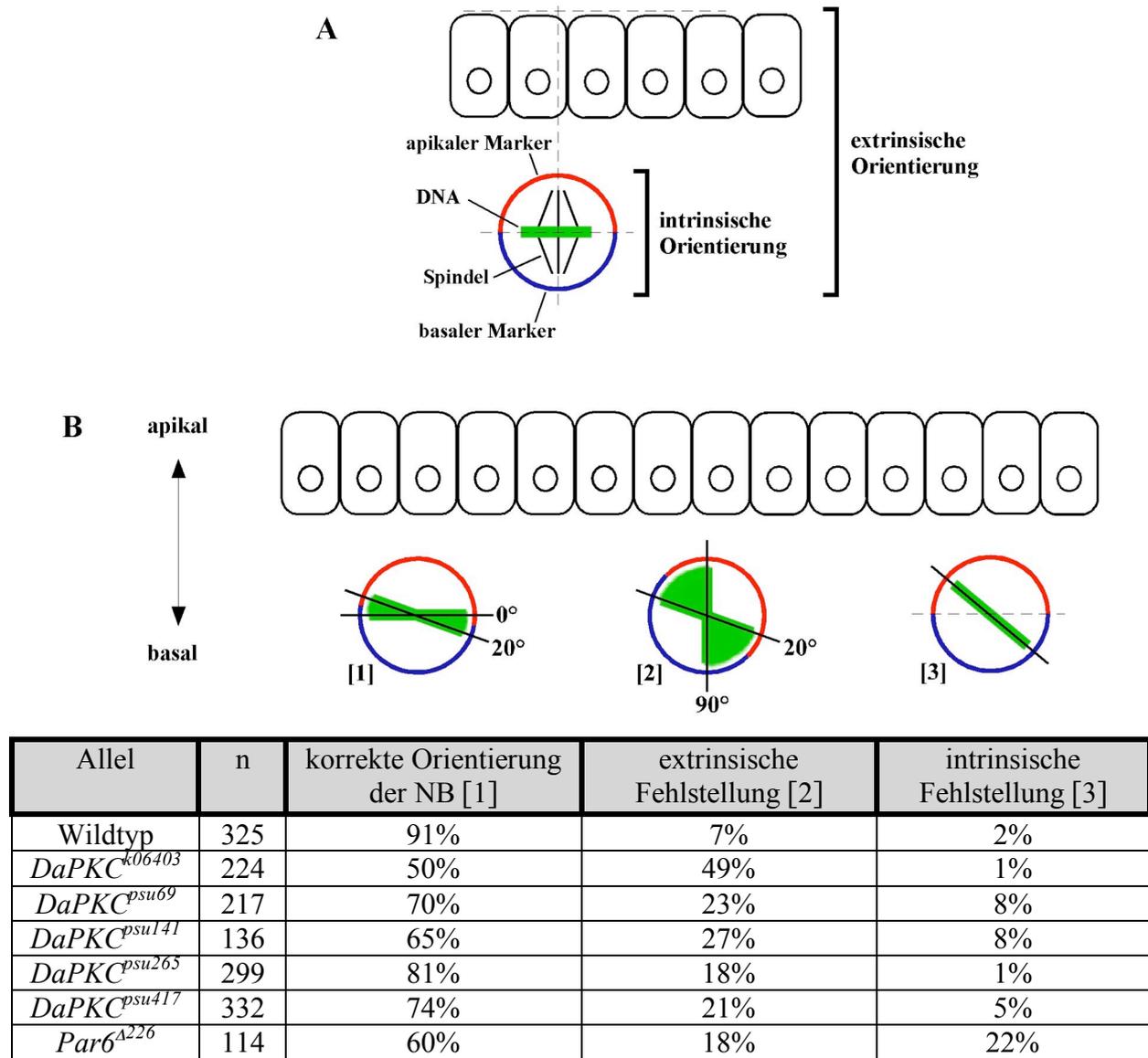


**Diagramm 5: Mira Lokalisation in den NB mutanter *DaPKC* und *par-6* Allele.** Auf der X-Achse sind der Wildtyp, die verschiedenen *DaPKC*-Allele und das Allel für *par-6* aufgetragen. Auf der Y-Achse ist der prozentuale Wert abzulesen. n bezeichnet die Anzahl der ausgezählten NB. In den NB des Allels *DaPKC<sup>psu417</sup>*, in dem die Mutation in der Substratbindetasche liegt, beträgt die basale Lokalisation von Mira nur 25%.

### 3.3.3.6 Die extrinsische Orientierung des NB ist in *DaPKC*<sup>k06403</sup> gestört

Nach der Delamination in das Innere des Embryos kommen die NB in einer bestimmten Orientierung zwischen dem Ektoderm und dem Mesoderm zu liegen. Der NB selbst weist eine intrinsische Orientierung auf. Diese beschreibt die Lage der polar verteilten Marker und der Spindel zueinander. In wildtypischen Metaphase-NB steht die Spindel senkrecht zum apikalen und basalen Marker (Abbildung 38A und C). Bei einer intrinsischen Fehlstellung, die in wildtypischen NB zu 1% auftritt, steht die Spindel nicht mehr senkrecht zu den polaren Markern (Abb. 38B[3] und E). Die extrinsische Orientierung beschreibt die Stellung des NB im Verhältnis zum darüber liegenden Epithel. Ausgehend von einer korrekten intrinsischen Orientierung liegt der NB mit seiner Spindel senkrecht zum darüber liegenden Epithel. Mit einer Abweichung von bis zu 20° findet man diese Orientierung zu 91% in den wildtypischen NB (Abb. 38A, B[1] und C). Eine Abweichung von über 20° wird hier als Fehlstellung definiert (Abb. 38B[2] und D).

In den Keimbahnklon-Embryonen des Allels *DaPKC*<sup>k06403</sup> weisen die NB zu 49% eine extrinsische Fehlstellung auf. Nur 50% aller ausgezählter NB weisen eine korrekte Orientierung auf. Die NB der vier *DaPKC*<sup>psu</sup> Allele zeigen deutlich niedrigere und untereinander ähnliche Werte, wobei die Allele *DaPKC*<sup>psu69</sup> und *DaPKC*<sup>psu141</sup> stärkere Defekte in der Orientierung zeigen als die NB der Allele *DaPKC*<sup>psu265</sup> und *DaPKC*<sup>psu417</sup>. In den NB der Allele *DaPKC*<sup>psu69</sup> und *DaPKC*<sup>psu141</sup> liegt die intrinsische Fehlstellung mit 8% nicht hoch, allerdings höher als in dem Null-Allel *DaPKC*<sup>k06403</sup>. In der Null-Mutanten kann man die intrinsische Fehlstellung schlecht belegen, da zwar die Spindel oft nicht mehr senkrecht zum Epithel stand, aber auch keine bestimmte apikale oder basale Lokalisation eines Markers festgemacht werden konnte. Durch eine falsche Orientierung der Spindel kommt es bei der Zellteilung zu einer fehlerhaften Verteilung der Zellschicksalsdeterminanten und der entstehende NB und die GMC kommen nicht wie üblicherweise apikal und basal zu liegen. Der Wert der intrinsischen Fehlstellung ist bei den NB des *par6*<sup>A226</sup> Allels mit 22% deutlich höher.



**Abbildung 38: Die intrinsische und extrinsische Fehlorientierung des Metaphase-NB im Embryo.** (A) Schematische Darstellung der intrinsischen und extrinsischen Orientierung eines NB. Die korrekte intrinsische Orientierung beschreibt die senkrechte Lage der Spindel zu den polaren Markern (A, C und D). Die extrinsische Orientierung geht von einer korrekten intrinsischen Orientierung aus und beschreibt die Lage des gesamten NB im Verhältnis zum darüber liegenden Epithel. Normalerweise steht auch hier die Spindel senkrecht zum Epithel (A und C). Eine Abweichung von über 20° wird hier als Fehlorientierung definiert (D und B[2]). Bei einer intrinsischen Fehlorientierung steht die Spindel nicht mehr senkrecht zu den polaren Marken, hier Baz und Mira (B[3] und E). D und E zeigen Beispiele für die Fehlorientierung eines NB in den Embryonen der Keimbahnklone. Baz in rot, Mira in blau und DNA in grün.

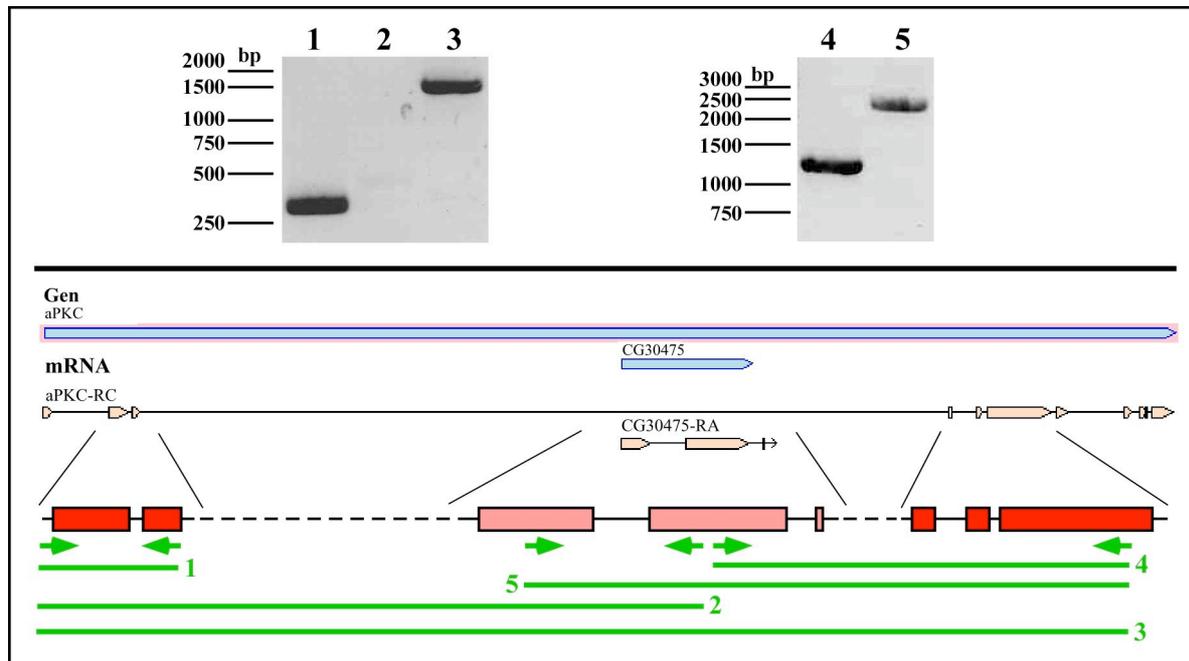
### 3.4 Molekulare Charakterisierung von Exzisionslinien der Linie *DaPKC*<sup>k06403</sup>

Von der P-Element Linie *DaPKC*<sup>k06403</sup> wurden durch Mobilisierung des P-Elements Allele erzeugt, von denen einige homozygot lebensfähig sind und im Rahmen dieser Arbeit weiter molekular charakterisiert wurden.

#### 3.4.1 Ein alternatives Transkript der *DaPKC*

In der ersten Version der Annotierung des *Drosophila* Genoms wurde für den *DaPKC*-Lokus nur das Transkript *aPKC-RC* vorausgesagt und die genomische Region, in der das P-Element in der Linie *DaPKC*<sup>k06403</sup> inseriert ist, als drittes Intron des *DaPKC* Lokus angegeben (Wodarz et al., 2000). In einer überarbeiteten Annotierung des *Drosophila* Genoms wurde, neben weiteren Transkripten der *DaPKC*, in unmittelbarer Umgebung der Insertionsstelle des P-Elements ein neues Gen, *CG30475*, vorausgesagt. Das P-Element inseriert im ersten von drei Exons von *CG30475*. Es war bekannt, dass durch proteolytische Spaltung eine trunkierte, konstitutiv aktive Form der DaPKC, aPKM genannt, in *Drosophila*-Köpfen vorkommt und essentiell für die Gedächtnisentwicklung ist (Schwartz, 1993; Drier et al., 2002). Daher wurde überlegt, ob durch alternatives Spleißen der Exons von *CG30475* und der *DaPKC* ein Transkript für diese Isoform entstehen könnte. In Köpfen von wildtypischen Fliegen konnte auf mRNA-Ebene nach RT-PCR tatsächlich ein Produkt nachgewiesen werden, dass sowohl aus Exons von *CG30475* als auch der *DaPKC* besteht. Abbildung 39 zeigt schematisch welche Primer für die RT-PCR eingesetzt wurden. Das PCR-Produkt 1 beinhaltet den Translationsstart und dient als Kontrolle. Ein mögliches Produkt 2, welches die ersten Exons der *DaPKC* an die Exons von *CG30475* spleißen könnte, konnte nicht nachgewiesen werden. Dagegen konnten Transkripte aufgezeigt werden, die das erste und zweite Exon von *CG30475* und das vierte, fünfte und sechste Exon der *DaPKC* enthalten. Allerdings beinhaltet weder das Produkt 4 noch das Produkt 5 das vorhergesagte dritte Exon von *GC30475* (Sequenz im Anhang). Das Produkt 3 hat eine Länge von ca. 1400bp, was den Exons der *DaPKC*, ohne *CG30475* entspricht. Neben den bereits bekannten Transkripten existiert also noch ein weiteres, das die ersten beiden Exons von *CG30475* an das vierte Exon der *DaPKC* spleißt. In diesem Transkript gibt es ein offenes Leseraster bis zum neunten Exon der DaPKC ohne 5'UTR (ORF im Anhang). Die ersten beiden Exons von *CG30475* codieren nicht für bekannte Proteindomänen. Das vierte bis neunte Exon der DaPKC codieren für das Zinkfinger-Motiv und die Kinase-Domäne. Im Gegensatz zur DaPKC fehlt hier also die PB-1-Domäne, die die Bindung an Par-6 ermöglicht. Es ist möglich, dass nach Translation dieses

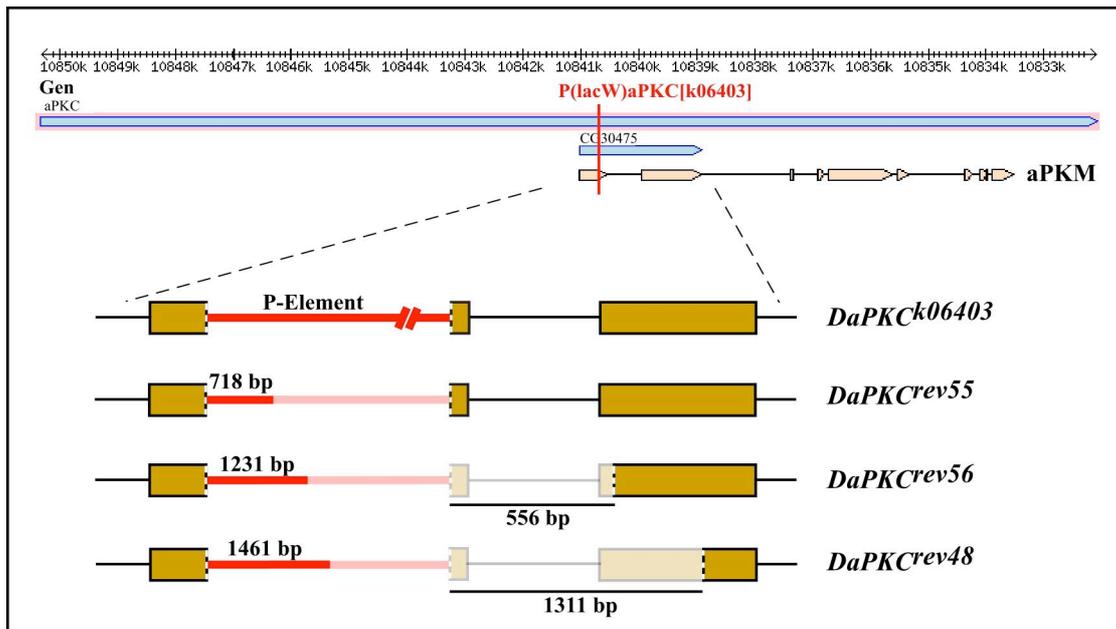
Transkriptes durch proteolytische Spaltung vor der Kinase-Domäne in der Linker-Region die trunkierte aPKM entsteht.



**Abbildung 39: RT-PCR auf mRNA von Köpfen wildtypischer Fliegen.** *CG30475* stellen Exons für ein alternatives Transkript der *DaPKC* dar. Nach Poly-A<sup>+</sup>-Isolierung aus Köpfen von wildtypischen Fliegen konnten mittels RT-PCR mit Primern im ersten oder zweiten Exon von *CG30475* und dem sechsten Exon der *DaPKC* jeweils die Produkte 5 und 4 amplifiziert werden. Beide enthalten aber nicht das dritte Exon von *CG30475*. Dagegen konnte mit den angegebenen Primer kein Produkt 2 nachgewiesen werden. Das Produkt 3 enthält seiner Größe nach nur die Exons der *DaPKC*, aber nicht die Exons von *CG30475*. Das PCR-Produkt 1, welches das zweite Exon mit dem Translationsstart und das dritte Exons der *DaPKC* enthält, dient als Positiv-Kontrolle.

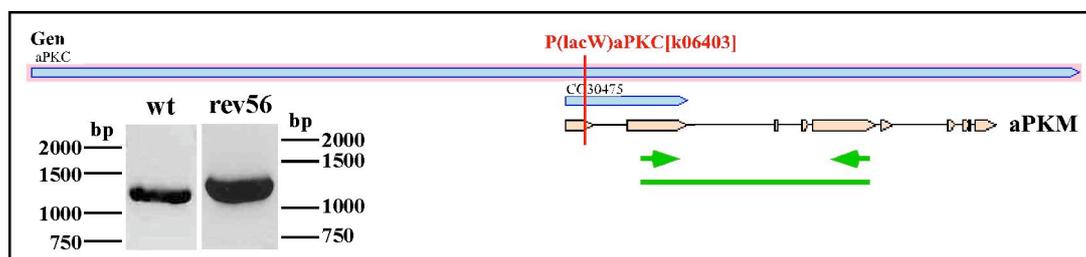
### 3.4.2 Durch die P-Element Exzision werden Teile des Exons von *CG30475* deletiert

In Abbildung 40 ist der genomische Bereich der *DaPKC* und *CG30475* mit der P-Element Insertion schematisch dargestellt. In den drei Exzisions-Allelen *DaPKC<sup>rev48</sup>*, *DaPKC<sup>rev55</sup>* und *DaPKC<sup>rev56</sup>* ist jeweils der größte Teil des P-Elements deletiert, lediglich ein kleiner Teil des P-Elements ist jeweils noch vorhanden. Zusätzlich ist in *DaPKC<sup>rev48</sup>* und *DaPKC<sup>rev56</sup>* ein Teil genomischer DNA 3' hinter dem P-Element deletiert (Marcella Tello-Ruiz, persönliche Mitteilung). Homozygote Fliegen dieser drei Allele sind lebensfähig, die Weibchen sind jedoch steril und die Morphologie der Ovarien zeigte sich gestört. Die Eikammern und Eier erscheinen runder und kompakter als im Wildtyp und der Schweregrad der Defekte korreliert mit der Größe der Deletion. Die Exzisions-Linie *DaPKC<sup>rev48</sup>* trägt die größte Deletion und legt kaum Eier.



**Abbildung 40: Deletierte Bereiche in den durch P-Element Exzision entstandenen *DaPKC<sup>rev</sup>* Allelen.** Das P-Element inseriert nicht nur im dritten Intron der *DaPKC*, sondern auch im ersten Exon von *CG30475*, das möglicherweise Teil eines alternativen Transkriptes für die *aPKM* ist. Durch die Mobilisierung des P-Elementes liegt in den Revertanten nur noch ein kleiner Teil des P-Elementes vor und in *DaPKC<sup>rev48</sup>* und *DaPKC<sup>rev56</sup>* sind zusätzlich Bereiche des ersten und zweiten Exons deletiert.

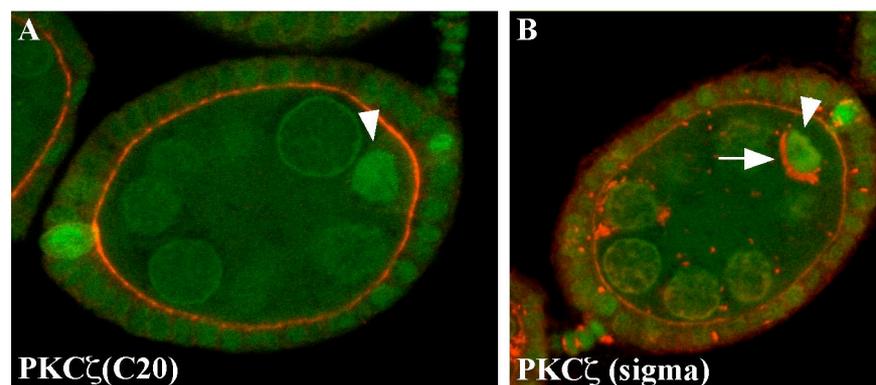
Durch die Folgen der P-Element Mobilisierung wurde erwartet, dass das zuvor nachgewiesene PCR-Produkt eines Transkripts für eine *aPKM* nicht mehr gebildet werden kann. Dies ist jedoch nicht der Fall. Zumindest kann mit einem Primer, der im 3'-Bereich des zweiten Exons von *CG30475*, also hinter der Deletion, bindet, noch ein Produkt nachgewiesen werden (Abbildung 41). Es ist aber möglich, dass durch den Rest des P-Elements und die Deletion ein Transkript entstanden ist, dass keine korrekte Translation ermöglicht. Daher muss überprüft werden, ob auch eine Translation erfolgt.



**Abbildung 41: Das Transkript für die *aPKM* kann auch in den Revertanten noch gebildet werden.** Das durch alternatives Spleißen entstandene Transkript der *aPKM* kann in den Köpfen von *DaPKC<sup>rev56</sup>* wie auch in wildtypischen Köpfen nachgewiesen werden.

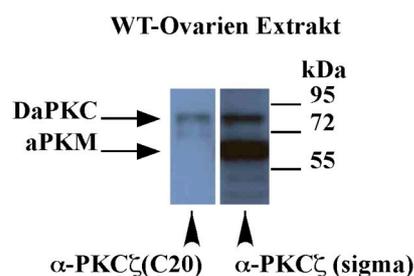
### 3.4.3 Die subzelluläre Lokalisation der konstitutiv aktiven Form der DaPKC, aPKM, in wildtypischen *Drosophila* Ovarien

Es war bekannt, dass eine konstitutiv aktive Form der DaPKC, aPKM, in *Drosophila*-Köpfen vorkommt und essentiell für die Gedächtnisentwicklung ist (Drier et al., 2002). Daher ist es möglich, dass das hier nachgewiesene alternative Transkript für die aPKM kodiert. Wegen der Defekte während der Oogenese in den für die *DaPKC<sup>rev</sup>* Allele homozygoten Weibchen wurden zunächst wildtypische Ovarien untersucht. Antikörper-Färbungen in wildtypischen Ovarien zeigten, dass zwei Antikörper von unterschiedlichen Firmen, aber gegen das identische Epitop gerichtet, nicht exakt das gleiche Signal erzeugten (Abbildung 42). In Eikammern der Stadien 4-5 zeigt sich beim Antikörper von *Santa Cruz* (C20), (Abb. 42A), der in den vorhergehenden Untersuchungen eingesetzt wurde, ausschließlich eine Färbung apikal in den Follikelzellen. Dagegen zeigt der Antikörper von *Sigma* (Abb. 42B) zusätzlich ein stärkeres Signal anterior in der Oocyte (Pfeil). Der Oocytenzellkern ist jeweils durch einen Pfeilkopf markiert.



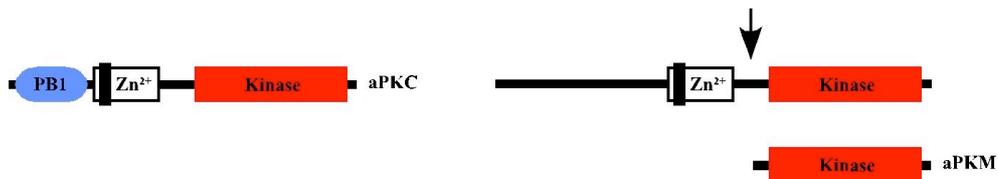
**Abbildung 42: Lokalisation der DaPKC in Wildtyp-Ovarien.** Stadium 4-5 Eikammern wurden hier mit Antikörpern gegen das identische Epitop angefärbt. In der GFP-Kernfärbung ist der Oocytenzellkern durch einen Pfeilkopf markiert. (A) Der Antikörper von *Santa Cruz* (C20) detektiert die DaPKC nur apikal in den Follikelzellen. (B) Der *Sigma* Antikörper detektiert zusätzlich ein Signal anterior in der Oocyte (Pfeil).

In Western Blots mit Wildtyp-Ovarien ergibt sich neben dem Signal der DaPKC bei 75kDa auch eine zusätzliche Bande bei 60kDa, die dem vorausgesagten Molekulargewicht einer trunkierten, konstitutiv aktiven aPKM entspricht (Abbildung 43).



**Abbildung 43: Western Blot an Proteinextrakten aus wildtypischen Ovarien.** Im Western Blot erkennt der *Sigma* Antikörper eine zusätzliche Bande bei 60kDa, vermutlich die aPKM. Beide Antikörper erkennen dazu die DaPKC bei 75kDa.

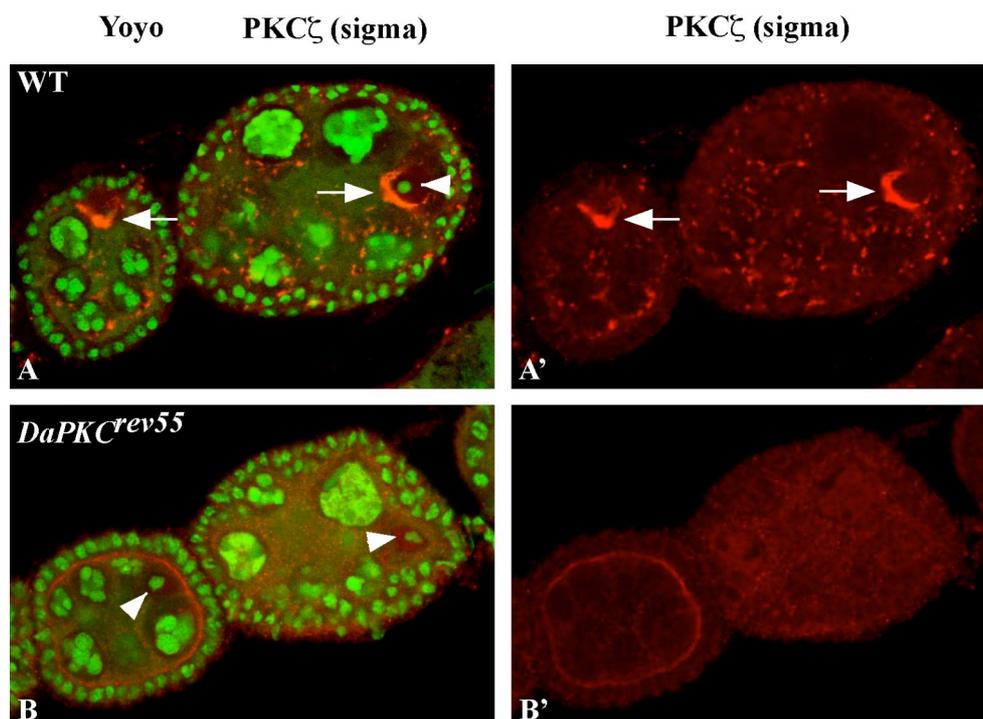
Das zuvor nachgewiesene alternative Transkript würde aber für ein 107kDa großes Protein codieren. Da im Western Blot jedoch nur ein Signal bei ca. 60kDa nachgewiesen werden kann, vermutlich die aPKM, ist es sehr wahrscheinlich, dass nach der Translation des alternativen Transkripts das Protein zur aPKM prozessiert wird (Abbildung 44). Da sich die Transkripte für die *DaPKC* und eine mögliche *aPKM* nur in den ersten Exons unterscheiden, die Antikörper jedoch gegen den C-Terminus gerichtet sind, sollte man ansonsten auch eine größere Isoform der *DaPKC* nachweisen können.



**Abbildung 44: Die aPKM entsteht möglicherweise durch posttranslationale Prozessierung.** Ein zuvor nachgewiesenes alternatives Transkript codiert für ein Protein, das im Gegensatz zur *DaPKC* am N-Terminus keine PB-1 Domäne vorweist. Das Zinkfinger-Motiv mit dem Pseudosubstrat könnte aber immer noch eine Inaktivierung der Kinase ermöglichen. Durch proteolytische Spaltung durch z.B. Calpain, kann die trunkierte, konstitutiv aktive aPKM entstehen.

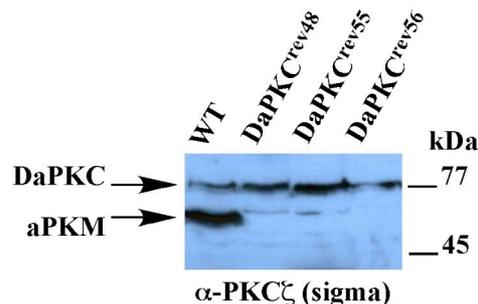
#### 3.4.4 Die aPKM Isoform fehlt in den *DaPKC<sup>rev</sup>* Allelen

Des Weiteren wurde in den *DaPKC<sup>rev</sup>* Allelen das Vorhandensein der aPKM überprüft. Die Abbildung 45 zeigt, dass in *DaPKC<sup>rev55</sup>* die anteriore Lokalisation der *DaPKC* um den Oocytenzellkern (Pfeilkopf) herum fehlt (Abb. 45B und B'). Dies gilt auch für *DaPKC<sup>rev48</sup>* und *DaPKC<sup>rev56</sup>*. Das lässt vermuten, dass es sich bei der anterioren Färbung in wildtypischen Oozyten (Abb. 45A und A') tatsächlich um die aPKM (Pfeil) handelt.



**Abbildung 45 (vorherige Seite, 75): *DaPKC<sup>rev55</sup>* zeigt den Verlust der DaPKC anterior in der Oocyte.** In der Yoyo-Kernfärbung ist der Oocytenzellkern mit einem Pfeilkopf markiert. (A-A') Lokalisation der putativen aPKM Isoform (Pfeil) anterior in der Oocyte in wildtypischen Eikammern Stadium 4-5. In *DaPKC<sup>rev55</sup>* wird in der Oocyte keine Akkumulation der aPKM sichtbar (B-B').

In Western Blots mit Ovarienextrakten der *DaPKC<sup>rev</sup>* Allele fehlt die kürzere aPKM Form, die in Proteinextrakten von wildtypischen Ovarien vom *Sigma* Antikörper detektiert werden kann (Abbildung 46). Dagegen kann die DaPKC in den mutanten Allelen nachgewiesen werden.

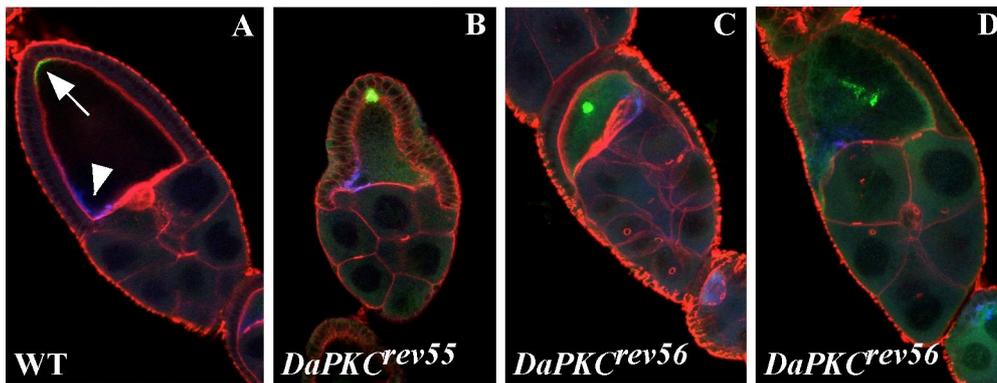


**Abbildung 46: Die aPKM ist in Proteinextrakten aus Ovarien von *DaPKC<sup>rev</sup>*-Tieren stark reduziert.** Alle aufgetragenen Proben zeigen die DaPKC bei 75kDa. Die im Wildtyp vorkommende kürzere Form, aPKM, kann in den Ovarien der verschiedenen Revertanten Allele nicht detektiert werden.

Es ist also anzunehmen, dass es sich bei dem vorausgesagten Gen *CG30475* tatsächlich um alternative Exons des *DaPKC*-Lokus handelt, die für eine verkürzte Isoform, die aPKM, alternativ gespleißt werden. Nachdem das Vorhandensein eines Transkriptes für eine aPKM nachgewiesen werden konnte, ist es möglich, dass das Transkript nicht translatiert wird und somit auch eine nachfolgende Prozessierung zur aPKM nicht stattfinden kann.

#### 3.4.5 Untersuchung homozygoter *DaPKC<sup>rev</sup>* Allele

Die Ovarien der homozygoten *DaPKC<sup>rev</sup>* Allele zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie die homozygoten *DaPKC<sup>psu</sup>* Allele und gleichen auch den hypomorphen *par-1* bzw. *baz* Mutanten (Shulman et al., 2000; Tomancak et al., 2000; Benton und St Johnston, 2003b). In Aktin-Färbungen (rot in Abbildung 47A-D) sieht man bereits, dass während der Oogenese starke Defekte auftreten. Auch hier entwickeln sich die Eikammern nicht immer bis zu Stadium 10. Die Abb. 46A zeigt die wildtypische Lokalisation von Staufen posterior in der Oocyte (grün, Pfeil) und von Gurken anterior auf der zukünftigen Dorsalseite (blau, Pfeilkopf). Die *DaPKC<sup>rev</sup>* Allele zeigen die Staufen Lokalisation wie die *DaPKC<sup>psu</sup>* Allele nicht halbmondförmig am posterioren Ende der Oocyte, sondern posterior oder mittig in einem Punkt konzentriert (grün in Abb. 47C und D). Die Gurken Lokalisation scheint jedoch noch korrekt zu sein (blau in Abb. 47B-D).



**Abbildung 47: Homozygote  $DaPKC^{rev}$  Allele zeigen Defekte in der Oogenese und Polarität der Oocyte.** Eikammern in Stadium 8-11 mit Aktin-Färbung (rot). (A) In der wildtypischen Oocyte ist Staufen (grün, Pfeil) posterior lokalisiert und Gurken (blau, Pfeilkopf) bestimmt dorsal. Staufen akkumuliert als Fleck posterior (grün in B) oder in der Mitte der Oocyte (grün in C und D). Die Gurken Lokalisation erscheint wildtypisch (blau in B-D).

Wie in den homozygoten  $DaPKC^{psu}$  Allelen ist es auch hier möglich, dass die Fehlverteilung von Staufen eine Folge der morphologischen Defekte im Follikelepithel ist. Um genaue Aussagen machen zu können, müssten auch hier Keimbahnklone erzeugt werden.

## 4 Diskussion

Der Par/aPKC-Komplex ist ein in diversen Spezies evolutionär hochkonservierter Proteinkomplex und tritt auch in *Drosophila* in verschiedenen Geweben auf. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Allele der *Drosophila atypischen Proteinkinase C* (*DaPKC*) molekularbiologisch und auf ihre Funktionalität hin untersucht, um genauere Informationen über die Bedeutung einzelner Domänen des Proteins zu erhalten. Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die DaPKC durch unterschiedliche Mechanismen in (i) den epidermalen Epithelzellen des Embryos, (ii) den Neuroblasten, (iii) den Follikel epithelzellen und (iiii) der Oocyte für die korrekte Ausbildung der Polarität verantwortlich ist.

Im Folgenden werden Aussagen über die verschiedenen *DaPKC* Allele gemacht. Dabei handelt es sich, wenn nicht ausdrücklich anders beschrieben, um Keimbahnklone bzw. Embryonen, die aus Keimbahnklonen der jeweiligen Allele entstanden sind.

### 4.1 Charakterisierung hypomorpher *DaPKC* Allele

In einem EMS-Screen zur Identifizierung neuer maternaler Gene, die in die Entwicklung des *Drosophila* Embryos involviert sind, wurden vier neue Allele der *DaPKC* (*DaPKC<sup>psu</sup>*) gefunden (Luschnig et al., 2004). Alle Allele weisen jeweils eine Punktmutation auf, die zu einem Aminosäureaustausch in einem hoch konservierten Bereich der DaPKC führt. Keimbahnklone zeigen, dass die Funktion der DaPKC in allen Allelen durch den Aminosäureaustausch stark beeinträchtigt ist. Die aus Keimbahnklonen entstandenen maternal mutanten Embryonen der verschiedenen Allele zeigen ein verstärktes Auftreten von Apoptose und sterben mit starken morphologischen Defekten.

Zygotische Mutanten des Null-Allels *DaPKC<sup>k06403</sup>* sind bis ins zweite Larvenstadium lebensfähig. Im späten L2 Stadium können weder das Transkript noch das Protein nachgewiesen werden (Rolls et al., 2003). Dagegen sind einige der zygotisch mutanten *DaPKC<sup>psu</sup>* Allele bis ins adulte Stadium homozygot lebensfähig. Das lässt sich darauf zurückführen, dass in den *DaPKC<sup>psu</sup>* Allelen das Protein exprimiert wird, durch die Mutation seine Funktion jedoch eingeschränkt ist. Interessanterweise treten bei den Allelen *DaPKC<sup>psu69</sup>* und *DaPKC<sup>psu141</sup>*, die in Keimbahnklonen die stärksten Defekte zeigen, regelmäßig homozygot mutante Fliegen auf. Die Entwicklung dieser kurzlebigen Tiere ist jedoch verlangsamt, so dass entsprechende adulte Fliegen später schlüpfen. Die Anzahl der

homozygoten Tiere beträgt auch nicht 1/3 aller Tiere, wie es statistisch der Fall sein sollte, sondern ist reduziert, was auf eine Semiletalität hinweist.

In dem Allel *DaPKC<sup>psu69</sup>* kann die DaPKC durch den Austausch C122Y in der regulatorischen Domäne, hinter der Par-6 Bindedomäne, nicht mehr an Par-6 binden. Par-6 und aPKC bilden das Grundgerüst des hochkonservierten Par/aPKC-Komplexes. In diversen Spezies wird dieser Komplex durch GTP-Cdc42, das an Par-6 bindet, rekrutiert und die Kinase-Aktivität der aPKC dadurch erhöht (Henrique und Schweisguth, 2003; Etienne-Manneville, 2004). Auf diese Weise kann die aPKC räumlich und zeitlich reguliert werden und Proteine wie Lethal giant larvae (Lgl), Par-1 oder Par-3 in verschiedenen Zelltypen binden und phosphorylieren. In den anderen drei *DaPKC<sup>psu</sup>* Allele ist die DaPKC höchst wahrscheinlich in ihrer Kinase-Aktivität beeinträchtigt. Das Allel *DaPKC<sup>psu141</sup>* führt zu einem Aminosäureaustausch, F423I, direkt neben der PDK-1 Phosphorylierungsstelle. In Säugern konnte nachgewiesen werden, dass PKC $\zeta$  durch PDK-1 am T410, homolog zu T422 in *Drosophila*, phosphoryliert und somit aktiviert wird. In *Drosophila* führt eine durch RNAi herbeigeführte Reduktion der PDK-1 in S2 Zellen zu einer Reduktion der an T422 phosphorylierten Form der DaPKC und auch in homozygot adulten Fliegen des Allels *DaPKC<sup>psu141</sup>* ist diese phosphorylierte Form nicht mehr detektierbar. Wahrscheinlich führt der Aminosäureaustausch direkt neben der PDK-1 Phosphorylierungsstelle dazu, dass die DaPKC nicht mehr von der PDK-1 phosphoryliert und somit aktiviert werden kann. In dem Allel *DaPKC<sup>psu265</sup>* könnte die DaPKC, mit dem Aminosäureaustausch A291V in der ATP-Bindetasche, einen dominant-negativen Effekt haben. Eine Aktivierung und Konformationsänderung der DaPKC findet statt, und auch eine Bindung an ihr Substrat kann erfolgen. Jedoch erfolgt keine Phosphorylierung, da das nötige Phosphat vom ATP nicht übertragen werden kann. Dagegen kann in dem Allel *DaPKC<sup>psu417</sup>* die DaPKC durch den Aminosäureaustausch G347N in der Substrat-Bindetasche ihr Substrat nicht mehr binden und dadurch nicht phosphorylieren. Die Phänotypen der Mutationen in der regulatorischen bzw. Kinase-Domäne zeigen, dass die DaPKC als Gerüstprotein und auch als Kinase wichtige Funktionen besitzt.

#### 4.2 Mutationen in der DaPKC beeinträchtigen die Stabilität des Par/aPKC-Komplexes in den Epithelzellen

Für die Polarität der Epithelzellen ist die Stabilität des Par/aPKC-Komplexes essentiell. Der Verlust einer Komponente des Komplexes beeinflusst zumindest die Lokalisation der jeweils

anderen Proteine. Phänotypische Defekte in den Keimbahnklon-Embryonen der *DaPKC<sup>psu</sup>* Allele weisen darauf hin, dass bereits ein einziger Aminosäureaustausch zur Instabilität des gesamten Par/aPKC-Komplexes führt.

Die Lokalisation des Par-3 Homologs Bazooka (Baz) verhält sich in allen *DaPKC*-Allelen identisch. Die Zellularisierung verläuft noch normal und Baz lokalisiert apikal an den AJ. Es konnte gezeigt werden, dass Baz als erste Komponente des Par/aPKC-Komplexes unabhängig von DaPKC und Par-6 apikal in den Epithelzellen akkumuliert (Harris und Peifer, 2005). Während der Gastrulation ist Baz jedoch nicht mehr regelmäßig apikal an der Membran lokalisiert. Dagegen variiert die Lokalisation von Par-6 in den verschiedenen *DaPKC*-Allelen. Par-6 ist in den *DaPKC* Null-Mutanten diffus verteilt und so verhält es sich auch umgekehrt für DaPKC in *par-6* Null-Mutanten (Harris und Peifer, 2005). In den Allelen *DaPKC<sup>psu69</sup>* und *DaPKC<sup>psu141</sup>* zeigt sich eine ähnliche Fehllokalisation von Par-6 wie in dem Null-Allel *DaPKC<sup>k06403</sup>*. In den beiden *DaPKC<sup>psu</sup>* Allelen ist vermutlich die Bindung der DaPKC an jeweils eine der anderen Komponenten des Par/aPKC-Komplexes gestört und somit eine Stabilisierung des Par/aPKC-Komplexes nicht möglich. Das Protein, das in dem Allel *DaPKC<sup>psu69</sup>* exprimiert wird, kann nachweislich nicht an Par-6 binden. In dem Allel *DaPKC<sup>psu141</sup>* ist es möglich, dass die Bindung über die Kinase-Domäne an Baz verhindert ist. Es ist anzunehmen, dass im Wildtyp durch die Phosphorylierung der PDK-1 die Phosphorylierungsstelle im Turn-Motiv frei wird und es daraufhin zu einer Konformationsänderung und zur sterischen Freisetzung der Kinase-Domäne kommt. Durch den Aminosäureaustausch F423I findet wahrscheinlich keine Phosphorylierung durch die PDK-1 mehr statt und damit bleibt auch die Bindung zwischen der eigenen Pseudosubstrat-Sequenz, die in der Nähe zur PB1-Domäne liegt, und der Kinase-Domäne bestehen.

Keimbahnklon-Embryonen der Allele *DaPKC<sup>psu265</sup>* und *DaPKC<sup>psu417</sup>* zeigen etwas schwächere Defekte. In diesen Allelen kommt es wahrscheinlich trotz der jeweiligen Mutation zu einer Aktivierung und Konformationsänderung der DaPKC. Es findet jedoch vermutlich keine Phosphorylierung von anderen Komponenten wie Baz, Crumbs (Crb) und Lgl statt, die an der Ausbildung der Polarität beteiligt sind. Die Aktivität der anderen Proteinkomplexe ist aber notwendig, um die Polarität in den Epithelzellen zu kontrollieren.

Der Verlust der Polarität, der sich durch die Fehlverteilung der verschiedenen Proteine zeigt, deutet darauf hin, dass in den Epithelzellen die Funktion der DaPKC als Gerüstprotein und als Kinase absolut notwendig ist.

### 4.3 Die Funktion der DaPKC in den Neuroblasten

#### 4.3.1 Die Stabilität des Par/aPKC-Komplexes in NB

Obwohl die NB ihre Polarität anscheinend von den Epithelzellen übernehmen, verläuft der Mechanismus zur Ausbildung der Polarität in den NB anders. In den Keimbahnklon-Embryonen der *DaPKC<sup>psu</sup>* Allele sind die Proteine des Par/aPKC-Komplexes diffus in den Epithelzellen verteilt. Dagegen sind die Proteine in den NB teilweise wieder polar lokalisiert. Vor allem Baz nimmt hier eine wichtige Rolle ein, da es in *DaPKC*, *par-6* und *insc* Mutanten teilweise noch apikal lokalisiert (Schober et al., 1999; Wodarz et al., 1999) und auch in den Keimbahnklon-Embryonen der *DaPKC<sup>psu</sup>* Allele meist noch apikal vorliegt. Dagegen liegen in *baz* Mutanten DaPKC und Insc fehlverteilt im Cytoplasma vor (Wodarz et al., 1999; Wodarz et al., 2000). Dies zeigt, dass die korrekte Lokalisation der DaPKC von Baz abhängig ist. Wie in den Epithelzellen führt der Verlust der DaPKC auch zu einer cytoplasmatischen Lokalisation von Par-6 und umgekehrt. Beide Proteine scheinen gegenseitig für ihre apikale Lokalisation verantwortlich zu sein. Möglicherweise ist die Stabilität des gesamten Par/aPKC-Komplexes von der Bindung aller drei Proteine untereinander abhängig. Baz dient dabei als Gerüstprotein, das unbedingt notwendig ist, um den Komplex apikal zu lokalisieren und auch in Abwesenheit von DaPKC und Par-6 noch apikal akkumulieren kann.

In den Allelen *DaPKC<sup>psu265</sup>* und *DaPKC<sup>psu417</sup>* liegt die DaPKC wahrscheinlich in einer offenen Konformation vor. Dies bedeutet, dass die DaPKC über den N-Terminus an Par-6 und über die Kinase-Domäne an Baz binden kann. Da in *DaPKC<sup>psu417</sup>* eine Mutation in der Substratbindedomäne vorliegt, ist es möglich, dass ein anderer Teil der Kinase-Domäne nicht an die aPKC-Bindedomäne, sondern an die zweite und dritte PDZ-Domäne von Baz bindet (Wodarz et al., 2000). So kann der Komplex durch drei Bindungen der Proteine untereinander stabilisiert werden. In *DaPKC<sup>psu69</sup>* fehlt die Bindung der DaPKC zu Par-6 und in *DaPKC<sup>psu141</sup>* kann die DaPKC keine offene Konformation annehmen und die Kinase-Domäne bleibt durch die Pseudosubstrat-Sequenz für eine Bindung verschlossen. Durch das Fehlen einer Bindung wird der Komplex instabil, nur Baz bleibt, durch ein unbekanntes Protein an den Cortex gebunden, apikal lokalisiert. Da in den Allelen *DaPKC<sup>psu69</sup>* und *DaPKC<sup>psu141</sup>* die DaPKC nicht apikal lokalisiert, kann man vermuten, dass Baz die DaPKC über eine Bindung an die Kinase-Domäne rekrutiert. Diese Bindung muss dann aber durch die Bindung von Par-6 an Baz und DaPKC stabilisiert werden. Im Gegensatz zu den Epithelzellen scheint der Par/aPKC-Komplex in den NB eher dynamisch zu sein und die apikale Lokalisation von Baz unabhängig von Par-6 und DaPKC. Es konnte für Säuger und in vitro gezeigt werden, dass

Par-6 und DaPKC entweder mit Baz oder mit Lgl im Komplex vorliegen, jedoch niemals alle vier Proteine gemeinsam (Betschinger et al., 2003; Plant et al., 2003; Yamanaka et al., 2003).

#### 4.3.2 Die DaPKC dient als Gerüstprotein in den NB

In wildtypischen NB ist die DaPKC indirekt für die Segregierung von Miranda (Mira) in die Ganglien-Mutterzelle verantwortlich. In der Metaphase ist Lgl überall am Cortex lokalisiert und wird apikal durch die DaPKC phosphoryliert. Dadurch wird Lgl inaktiv und gelangt ins Cytoplasma (Betschinger et al., 2003). Lgl ist dann im NB nur basal aktiv, wo es für die Rekrutierung von Mira erforderlich ist (Ohshiro et al., 2000). In Keimbahnklon-Embryonen des Allels *DaPKC<sup>k06403</sup>* liegt Mira in den Metaphase-NB nur noch zu 1% basal vor. Fehlt Par-6 oder die Möglichkeit zur Bindung an Par-6, wie in den Allelen *par6<sup>A226</sup>* und *DaPKC<sup>psu69</sup>*, dann liegt Mira noch mit 20-43% basal vor. Ähnlich hoch ist der Wert in dem Allel *DaPKC<sup>psu417</sup>*, in dem eine Mutation in der Substratbindetasche vorliegt. Eine deutlich geringere Fehlverteilung von Mira, zu 68-75% basal, zeigt sich in den beiden Allelen *DaPKC<sup>psu141</sup>* und *DaPKC<sup>psu265</sup>*, in denen vermutlich die Aktivierung der Kinase beeinträchtigt bzw. eine Übertragung des Phosphatrestes nicht möglich ist. Dies deutet auf eine wichtige Funktion der DaPKC als Gerüstprotein und eine untergeordnete Funktion als Kinase hin.

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zur Lokalisation von Mira in zygotisch mutanten *DaPKC<sup>k06403</sup>* Allelen zeigen Mira meist im gesamten Cortex larvaler NB lokalisiert (Rolls et al., 2003; Lee et al., 2006a). Hier liegt die cortikale Lokalisation von Mira in den Keimbahnklonen embryonaler NB nur bei 27% und meist liegt das Protein cytoplasmatisch vor. Es ist möglich, dass die larvalen NB sich anders verhalten als die embryonalen NB, jedoch ist darüber bisher nichts bekannt. Vielleicht ist Mira in den embryonalen NB auch nicht so stabil und wird schneller degradiert.

#### 4.3.3 Die extrinsische Orientierung des NB ist von einem intakten Epithel abhängig

Die NB kommen nach der Delamination basal zu den Epithelzellen zu liegen und beginnen dort, sich stammzellartig zu teilen. Bisher ist noch nicht bekannt, wie die NB sich nach der Delamination und der ersten Teilung wieder orientieren, dass heißt, wie apikale Marker in der Prophase wieder apikal lokalisieren und die Spindel wieder senkrecht zum Epithel rotiert. Eine intrinsische Fehlstellung des NB, in der die Spindel nicht senkrecht zu den apikalen bzw. basalen Markern vorliegt, tritt in den Keimbahnklonen der *DaPKC* Allele nur in geringem Maße verstärkt auf. Daher kann man hier auch nicht von einem direkten Einfluss der DaPKC ausgehen. Es konnte gezeigt werden, dass Pins über seine Bindung an Mushroom Body Defect (Mud) für die korrekte Orientierung der Spindel notwendig ist (Bowman et al., 2006).

In zygotisch mutanten Larven von *DaPKC*<sup>k06403</sup> liegt Pins noch apikal im NB vor (Rolls et al., 2003) und auch die apikale Lokalisation von Baz und Insc in den Keimbahnklon-Embryonen der *DaPKC* Allele lässt eine apikale Lokalisation von Pins erwarten.

Liegt eine korrekte intrinsische Orientierung der Spindel im NB vor, dann beschreibt die Lage des NB im Verhältnis zum darüber liegenden Epithel die extrinsische Orientierung. Dabei steht die Spindel üblicherweise senkrecht zum Epithel. Vergleichende Untersuchungen an NB, die aus Embryonen präpariert und entweder isoliert oder im Zellverband in Zellkultur vorlagen, weisen darauf hin, dass die Epithelzellen einen Einfluss auf diese Orientierung haben. Dabei beeinflussen Signale vom Epithel die Lokalisation der Proteine des Par/aPKC-Komplexes in der Prophase und die Verankerung des Centrosoms im NB (Siegrist und Doe, 2005). Die hier in dieser Arbeit in vivo ausgezählten NB deuten ebenfalls auf einen Einfluss des Epithels hin. Je stärker das Epithel in den Keimbahnklonen der verschiedenen *DaPKC* Allele defekt ist, desto höher ist der Anteil von NB, die eine extrinsische Fehlorientierung aufweisen. Es ist daher anzunehmen, dass der Verlust der Integrität des Epithels für die Fehlorientierung der NB verantwortlich ist.

#### 4.4 Die Follikelepithelzellen benötigen den Kontakt mit den Zellen der Keimbahn zur Ausbildung der Polarität

Die Epithelzellen einer Eikammer sind nicht, wie andere Epithelzellen, mit der apikalen Membran einem Lumen oder der Außenwelt zugewandt, sondern stehen in direktem Kontakt mit den Zellen der Keimbahn. Für die korrekte Ausbildung des Follikelepithels sind alle drei Plasmamembrandomänen, apikal, lateral und basal, notwendig (Tanentzapf et al., 2000).

Wie in den epidermalen Epithelzellen führt der vollständige Verlust der *DaPKC* zum Verlust der Polarität in den betroffenen Follikelzellen. Die Zellen haben neben ihrer Polarität auch ihre säulenartige Form und einschichtige Anordnung verloren. Auch die Integrität der Keimbahn- und Follikelzellen wirkt gestört. In einer Eikammer wird die Integrität der Zellen durch DE-Cadherin und DN-Cadherin gewährleistet. Eine Reduzierung der Cadherine führt zu einer Umwandlung von epithelialen zu mesenchymalen Zellen (Tepass, 1999). Möglicherweise ist auch die *DaPKC* an diesem Prozess beteiligt. Untersuchungen an Embryonen der Wachtel haben gezeigt, dass aPKC und N-Cadherin in Epithelien apikal kolokalisieren und eine Inaktivierung der aPKC auch zu einer Umwandlung von epithelialen zu mesenchymalen Zellen führt (Minichiello et al., 1999).

Interessanterweise bleibt die Polarität in den Follikelzellklonen der *DaPKC<sup>psu</sup>* Allele im Gegensatz zu den epidermalen Epithelzellen erhalten, solange die Zellen in direktem Kontakt mit den Keimbahnzellen stehen. Sowohl die DaPKC, die den jeweiligen Aminosäureaustausch trägt, als auch Baz und Par-6 kolokalisieren dann weiter apikal. Die Kinase-Aktivität, die in drei der *DaPKC<sup>psu</sup>* Allele höchst wahrscheinlich beeinträchtigt ist, spielt also keine entscheidende Rolle in der Ausbildung der Polarität. Das lässt sich darin begründen, dass auch Phosphorylierungsziele wie Crb keinen direkten Einfluss auf die Polarität haben (Tanentzapf et al., 2000). Der Mechanismus zur Ausbildung der Polarität verläuft in den Follikelepithelzellen also nicht so wie in den Epithelzellen der Epidermis. Die einzelnen Komponenten des Par/aPKC-Komplexes sind in den Follikelzellen nicht so stark voneinander abhängig, da im Gegensatz zu den Epithelzellen der Epidermis Baz und Par-6 auch in Gegenwart einer defekten DaPKC noch apikal lokalisieren können. Die hier vorliegenden Mutationen in der DaPKC behindern also nicht die Polarität der Zellen, ihre Anwesenheit als Gerüstprotein ist aber für die Integrität des Follikelepithels notwendig.

## 4.5 Die Funktion der DaPKC in der Oocyte

### 4.5.1 Die DaPKC ist als Gerüstprotein in der Keimbahn notwendig

Der vollständige Verlust der DaPKC in den Zellen der Keimbahn führt mit hoher Penetranz (72%) dazu, dass keine Oocyte differenziert wird. Im Gegensatz zum Allel *DaPKC<sup>k06403</sup>* treten in den Keimbahnklonen der verschiedenen *DaPKC<sup>psu</sup>* Allele keinerlei Defekte in der Ausbildung der Oocyte und deren Polarität auf. Da die Allele *DaPKC<sup>psu141</sup>*, *DaPKC<sup>psu265</sup>* und *DaPKC<sup>psu417</sup>* durch ihre Mutation höchst wahrscheinlich in ihrer Kinase-Aktivität beeinträchtigt sind, ist die Kinase-Aktivität in der Keimbahn offenbar nicht notwendig. Es konnte gezeigt werden, dass Baz durch Par-1 phosphoryliert wird. Par-1 akkumuliert posterior in der Oocyte und begrenzt Baz durch die Phosphorylierung auf anterior. Dieser Prozess ist für die Aufrechterhaltung der Polarität notwendig. Andere bekannte Phosphorylierungsziele der DaPKC, wie Lgl und Crb, spielen in der Keimbahn keine Rolle, da ein Fehlen dieser Proteine keinen Einfluss auf die Etablierung und Aufrechterhaltung der Polarität hat (Benton und St Johnston, 2003b). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Kinase-Aktivität der DaPKC in der Keimbahn nicht erforderlich ist. Dagegen ist die Kinase-Domäne mit ihrer Möglichkeit zur Bindung anderer Proteine wahrscheinlich wichtig. Eine Bindung an Baz könnte in allen *DaPKC<sup>psu</sup>* Allelen noch stattfinden. Es ist möglich, dass Baz und DaPKC aneinander binden und dadurch, dass die Kinase nicht aktiv ist, diese Bindung auch stabil

bleibt. In MDCK Zellen konnte gezeigt werden, dass durch die Phosphorylierung von Par-3 durch aPKC deren Bindung stark geschwächt wird (Nagai-Tamai et al., 2002). Ist eine Bindung zwischen beiden verhindert, ist auch die Ausbildung von interzellulären Verbindungen zwischen Epithelzellen gestört (Hirose et al., 2002). Par-6 konnte bisher weder in der Oocyte noch an den Ringkanälen nachgewiesen werden (Huynh et al., 2001a). Daher ist es möglich, dass DaPKC und Par-6 in der Keimbahn nicht aneinander binden und dies könnte erklären, warum auch in Keimbahnklonen des Allels *DaPKC<sup>psu69</sup>*, in dem die Bindung an Par-6 verhindert ist, keine Defekte auftreten. In der Keimbahn besitzt die DaPKC offenbar eine wichtige Funktion als Gerüstprotein, während die Kinase-Aktivität für ihre Funktion nicht essentiell ist.

#### 4.5.2 Die aPKM entsteht durch alternatives Spleißen von *CG30475* und der *DaPKC*

In dem Allel *DaPKC<sup>k06403</sup>* liegt die Insertionsstelle des P-Elements im dritten Intron. In genau diesem Bereich wird mit *CG30475* ein weiteres Gen vorausgesagt. Durch RT-PCR konnte gezeigt werden, dass *CG30475* einen Teil eines alternativen Transkriptes der *DaPKC* darstellt. Durch alternatives Spleißen entsteht ein Transkript, das die beiden ersten Exons von *CG30475* an das vierte Exon der *DaPKC* spleißt. Der ORF für dieses Transkript beginnt direkt mit dem ersten Exon von *CG30475* und endet im neunten Exon, wie in dem Transkript für die *DaPKC*. Dadurch könnte im Vergleich zur DaPKC ein mit 107kDa deutlich größeres Protein translatiert werden. In Western-Blots wird durch einen PKC $\zeta$  Antikörper von der Firma *Sigma*, der gegen das identische Epitop gerichtet wie der PKC $\zeta$ (C20) Antikörper von *Santa Cruz*, aber zusätzlich zur DaPKC ein deutlich kleineres Protein von ca. 60kDa detektiert. Dies entspräche der Größe der aPKM, die bereits in den Köpfen nachgewiesen werden konnte und eine essentielle Funktion bei der Gedächtnisentwicklung einnimmt. Es ist möglich, dass aus dem alternativen Transkript durch posttranslationale Prozessierung eine trunkierte, konstitutiv aktive Form der DaPKC, auch aPKM genannt, entsteht. Beispielsweise ist dies durch eine proteolytische Spaltung mit Calpain möglich, das in verschiedenen Entwicklungsstadien und auch in einigen Neuronen nachgewiesen werden konnte (Theopold et al., 1995; Friedrich et al., 2004). In Antikörper-Färbungen zeigt die aPKM eine Proteinlokalisierung anterior in der Oocyte in Stadium 4/5 Eikammern. In den homozygot mutanten Weibchen der *DaPKC<sup>rev</sup>* Allele, die durch unpräzise Exzision des P-Elementes entstanden sind, kann weder in AK-Färbungen noch in Western Blots die aPKM nachgewiesen werden. Diese homozygot lebensfähigen Fliegen zeigen jedoch Defekte in der Oogenese. Trotz der unpräzisen Exzision des P-Elementes wird die DaPKC normal translatiert und dies ist vermutlich für die Lebensfähigkeit der Tiere ausreichend. Weitere

Untersuchungen zur aPKM und auch die Herstellung von Keimbahnklonen der *DaPKC<sup>rev</sup>* Allele sind notwendig, um genauere Aussagen zur Funktion der aPKM in der Oogenese machen zu können.

#### 4.6 Der dynamische Par/aPKC-Komplex – in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration

Par-6 und DaPKC sind die Kernkomponenten des Par/aPKC-Komplexes. In fast allen Zelltypen von diversen Spezies können beide Proteine in einem Komplex nachgewiesen werden. Eine dritte Komponente des Komplexes, die an Par-6 bindet und von der DaPKC phosphoryliert wird, ist meist räumlich und zeitlich beschränkt. Oft kann der Nachweis eines solchen Komplexes durch Überexpression der beteiligten Komponenten herbeigeführt werden. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Baz zu einer Rekrutierung von DaPKC und Par-6 zu den ektopischen Kompartimenten von Baz in der Zelle führt (Wodarz et al., 2000; Harris und Peifer, 2004). In dieser Arbeit konnten in S2 Zellen DaPKC und Par-6 problemlos in einem Komplex nachgewiesen werden. Der Nachweis einer dritten Komponente erwies sich allerdings als schwierig. Bei alleiniger Überexpression von DaPKC konnten endogenes Baz und Lgl nicht nachgewiesen werden, obwohl beide Proteine durch einen Western-Blot deutlich detektiert werden konnten. Oftmals führt aber eine zusätzliche Überexpression von Baz bzw. Lgl dazu, dass sie dann als dritte Komponente an DaPKC und Par-6 binden. Das legt die Vermutung nahe, dass neben der räumlichen und zeitlichen Komponente auch eine bestimmte Menge bzw. ein bestimmtes Verhältnis der Proteine untereinander für eine Komplexbildung verantwortlich ist. Wird wie in dieser Arbeit nur die DaPKC überexprimiert, ist wahrscheinlich nicht ausreichend Baz bzw. Lgl frei in der Zelle verfügbar, um eine Bindung nachzuweisen. Durch Überexpression beider Komponenten kann dies aber ermöglicht werden.

## 5 Zusammenfassung

Die Fähigkeit von Zellen, eine Polarität aufzubauen, ist eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung von mehrzelligen Organismen. Die Polarität einer Zelle wird dabei sowohl durch das Cytoskelett als auch durch Lipide und Proteine kontrolliert, die spezifisch in verschiedenen Domänen der Plasmamembran und des Cytokortex lokalisiert sind.

Der hochkonservierte Par/aPKC-Komplex spielt eine entscheidende Rolle bei der Etablierung der Zellpolarität. Die atypische Proteinkinase C (aPKC) und Par-6 bilden das Grundgerüst des Komplexes, der desweiteren noch das PDZ-Domänen-Protein Par-3 enthält. Der Verlust der aPKC in *Drosophila* führt zu Defekten in verschiedenen Zelltypen und zur Letalität des Embryos. Im Rahmen dieser Arbeit wurde anhand des Modellorganismus *Drosophila melanogaster* die Funktion der DaPKC in der Etablierung der Zellpolarität in den Epithelzellen, den Neuroblasten und der Oocyte untersucht.

Der Verlust der DaPKC führt zur Instabilität des gesamten Par/aPKC-Komplexes und zum Verlust der Zellpolarität in den Epithelzellen. In *DaPKC* Allelen, in denen spezifisch die Bindung an Par-6 oder die Funktion der Kinasedomäne beeinträchtigt ist, zeigen sich diese Effekte ebenfalls. In den Epithelzellen ist daher die Funktion der DaPKC als Gerüstprotein und als Kinase absolut notwendig.

In den neuronalen Vorläuferzellen, den Neuroblasten (NB), ist anscheinend der Konformationszustand der DaPKC essentiell für die Stabilität des Par/aPKC-Komplexes. Kann die DaPKC nicht über ihre PB-1 Domäne an Par-6 und gleichzeitig über ihre Kinase-Domäne an Baz binden, dann bleibt nur Baz, das *Drosophila* Homolog von Par-3, apikal lokalisiert, während Par-6 destabilisiert wird. Im Null-Allel der DaPKC ist eine Fehlverteilung des Adapterproteins Miranda in Metaphase-NB mit wesentlich höherer Penetranz zu beobachten als in Mutanten, in denen die Kinasefunktion beeinträchtigt ist. Dies lässt auf eine wichtige Funktion der DaPKC als Gerüstprotein und auf eine untergeordnete Funktion als Proteinkinase schließen.

Fehlt die DaPKC in den Zellen der Keimbahn, dann wird mit hoher Penetranz keine Oocyte differenziert. Ist die DaPKC jedoch vorhanden und lediglich in ihrer Kinase-Aktivität beeinträchtigt, zeigen sich keine Defekte während der Oogenese. Offenbar besitzt die DaPKC in den Zellen der Keimbahn eine wichtige Funktion als Gerüstprotein, die Kinase-Aktivität ist für ihre Funktion jedoch nicht essentiell. In der Oocyte akkumuliert eine verkürzte Isoform der DaPKC, aPKM genannt. Die aPKM entsteht vermutlich durch alternatives Spleißen von Exons des Gens *CG30475* an Exons der *DaPKC* und posttranslationale Prozessierung.

## Summary

Polarity is a common feature of many different cell types and a prerequisite for the development of multicellular organisms. Cell polarity is characterised by different lipid and protein compositions in separate plasma membrane domains and at the cytocortex.

The evolutionarily conserved Par/aPKC-complex is required for the establishment of cell polarity. The core of this complex consists of the atypical protein kinase C (aPKC) and Par-6 together with the scaffold protein Par-3. In *Drosophila* loss of aPKC results in polarity defects in different cell types and lethality of the embryo. In this thesis the function of DaPKC in the establishment of cell polarity in epithelia cells, neuroblasts and the oocyte was investigated in the model organism *Drosophila melanogaster*. Several mutant alleles of *DaPKC* generated by EMS mutagenesis and imprecise P-element excision were characterised molecularly and with regard to their phenotype.

Loss of DaPKC in epithelial cells results in loss of polarity and mislocalisation of Par-6 and Bazooka, the *Drosophila* homologue of Par-3. Germ line clone embryos of mutant *DaPKC* alleles deficient in binding to Par-6 or the kinase activity, phenocopy this defects. Hence, function of DaPKC as a kinase and as a scaffold protein is indispensable for epithelial cell polarity.

In neuronal precursor cells called neuroblasts the conformational state of the DaPKC protein appears to be essential for the stability of the Par/aPKC-complex. The apical localisation of Baz is independent of the other components, whereas Par-6 and DaPKC require mutual binding of all three components for their correct localisation. To stabilise the complex a simultaneous binding of DaPKC to Par-6 via its PB-1 domain, as well as binding of the DaPKC kinase domain to Baz appears to be necessary. In metaphase neuroblasts of a *DaPKC* null mutant mislocalisation of the adaptor protein Miranda occurs more frequently compared to various *DaPKC* alleles containing a single amino acid exchange in the kinase domain. These data point to an essential function for DaPKC as a scaffold protein and a minor function as a kinase in the establishment of polarity in neuroblasts.

In germ line clones of a *DaPKC* null allele differentiation of the oocyte fails frequently. However, germ line clones of various *DaPKC* mutant alleles impaired in DaPKC kinase activity do not show any defect, indicating an important function of DaPKC as a scaffold protein, but not as a kinase. In egg chambers at stage 4-5 a shorter isoform of DaPKC localises to the anterior of the oocyte. A novel transcript of *DaPKC* containing exons from *DaPKC* and *CG30475* presumably gives rise to the shorter form of the kinase, called aPKM.

## 6 Literatur

Abdelilah-Seyfried, S., Cox, D. N., and Jan, Y. N. (2003). Bazooka is a permissive factor for the invasive behavior of discs large tumor cells in *Drosophila* ovarian follicular epithelia. *Development* 130, 1927-1935.

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

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

Barros, C. S., Phelps, C. B., and Brand, A. H. (2003). *Drosophila* nonmuscle myosin II promotes the asymmetric segregation of cell fate determinants by cortical exclusion rather than active transport. *Dev Cell* 5, 829-840.

Baumgartner, S., Littleton, J. T., Broadie, K., Bhat, M. A., Harbecke, R., Lengyel, J. A., Chiquet-Ehrismann, R., Prokop, A., and Bellen, H. J. (1996). A *Drosophila* neurexin is required for septate junction and blood-nerve barrier formation and function. *Cell* 87, 1059-1068.

Bello, B., Reichert, H., and Hirth, F. (2006). The brain tumor gene negatively regulates neural progenitor cell proliferation in the larval central brain of *Drosophila*. *Development* 133, 2639-2648.

Benton, R., and 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., and 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., Eisenhaber, F., and Knoblich, J. A. (2005). Phosphorylation-induced autoinhibition regulates the cytoskeletal protein Lethal (2) giant larvae. *Curr Biol* 15, 276-282.

Betschinger, J., Mechtler, K., and Knoblich, J. A. (2003). The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl. *Nature* 422, 326-330.

Betschinger, J., Mechtler, K., and Knoblich, J. A. (2006). Asymmetric segregation of the tumor suppressor brat regulates self-renewal in *Drosophila* neural stem cells. *Cell* 124, 1241-1253.

Bilder, D. (2003). PDZ domain polarity complexes. *Curr Biol* 13, R661-662.

Bilder, D. (2004). Epithelial polarity and proliferation control: links from the *Drosophila* neoplastic tumor suppressors. *Genes Dev* 18, 1909-1925.

- Bilder, D., Li, M., and Perrimon, N. (2000). Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science* 289, 113-116.
- Bilder, D., and Perrimon, N. (2000). Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature* 403, 676-680.
- Bilder, D., Schober, M., and Perrimon, N. (2003). Integrated activity of PDZ protein complexes regulates epithelial polarity. *Nat Cell Biol* 5, 53-58.
- Bowman, S. K., Neumuller, R. A., Novatchkova, M., Du, Q., and Knoblich, J. A. (2006). The *Drosophila* NuMA Homolog Mud regulates spindle orientation in asymmetric cell division. *Dev Cell* 10, 731-742.
- Cai, Y., Yu, F., Lin, S., Chia, W., and Yang, X. (2003). Apical Complex Genes Control Mitotic Spindle Geometry and Relative Size of Daughter Cells in *Drosophila* Neuroblast and  $\rho$ I Asymmetric Divisions. *Cell* 112, 51-62.
- Campos-Ortega, J. A. (1997). Asymmetric division: dynastic intricacies of neuroblast division. *Curr Biol* 7, R726-728.
- Chou, T. B., and Perrimon, N. (1992). Use of a yeast site-specific recombinase to produce female germline chimeras in *Drosophila*. *Genetics* 131, 643-653.
- Chu, D. T., and Klymkowsky, M. W. (1989). The appearance of acetylated alpha-tubulin during early development and cellular differentiation in *Xenopus*. *Dev Biol* 136, 104-117.
- Cox, D. N., Lu, B., Sun, T. Q., Williams, L. T., and Jan, Y. N. (2001a). *Drosophila* par-1 is required for oocyte differentiation and microtubule organization. *Curr Biol* 11, 75-87.
- Cox, D. N., Seyfried, S. A., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (2001b). 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., Kempfues, K., and Seydoux, G. (2003). Polarization of the *C. elegans* zygote proceeds via distinct establishment and maintenance phases. *Development* 130, 1255-1265.
- de Cuevas, M., and Spradling, A. C. (1998). Morphogenesis of the *Drosophila* fusome and its implications for oocyte specification. *Development* 125, 2781-2789.
- Diaz-Meco, M. T., Municio, M. M., Frutos, S., Sanchez, P., Lozano, J., Sanz, L., and Moscat, J. (1996). The product of par-4, a gene induced during apoptosis, interacts selectively with the atypical isoforms of protein kinase C. *Cell* 86, 777-786.
- Doe, C. Q., Chu-LaGraff, Q., Wright, D. M., and Scott, M. P. (1991). The prospero gene specifies cell fates in the *Drosophila* central nervous system. *Cell* 65, 451-464.
- Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W. J., and 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.

- Drier, E. A., Tello, M. K., Cowan, M., Wu, P., Blace, N., Sacktor, T. C., and Yin, J. C. (2002). Memory enhancement and formation by atypical PKM activity in *Drosophila melanogaster*. *Nat Neurosci* 5, 316-324.
- Ebnet, K., Suzuki, A., Horikoshi, Y., Hirose, T., Meyer Zu Brickwedde, M. K., Ohno, S., and Vestweber, D. (2001). The cell polarity protein ASIP/PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM). *Embo J* 20, 3738-3748.
- Etienne-Manneville, S. (2004). Cdc42--the centre of polarity. *J Cell Sci* 117, 1291-1300.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2001). Integrin-Mediated Activation of Cdc42 Controls Cell Polarity in Migrating Astrocytes through PKCzeta. *Cell* 106, 489-498.
- Friedrich, P., Tompa, P., and Farkas, A. (2004). The calpain-system of *Drosophila melanogaster*: coming of age. *Bioessays* 26, 1088-1096.
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1998). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141, 1539-1550.
- Fuse, N., Hisata, K., Katzen, A. L., and Matsuzaki, F. (2003). Heterotrimeric G proteins regulate daughter cell size asymmetry in *Drosophila* neuroblast divisions. *Curr Biol* 13, 947-954.
- Gangar, A., Rossi, G., Andreeva, A., Hales, R., and Brennwald, P. (2005). Structurally conserved interaction of Lgl family with SNAREs is critical to their cellular function. *Curr Biol* 15, 1136-1142.
- Garrard, S. M., Capaldo, C. T., Gao, L., Rosen, M. K., Macara, I. G., and Tomchick, D. R. (2003). Structure of Cdc42 in a complex with the GTPase-binding domain of the cell polarity protein, Par6. *Embo J* 22, 1125-1133.
- Gates, J., and Peifer, M. (2005). Can 1000 reviews be wrong? Actin, alpha-Catenin, and adherens junctions. *Cell* 123, 769-772.
- Godt, D., and Tepass, U. (1998). *Drosophila* oocyte localization is mediated by differential cadherin-based adhesion [see comments]. *Nature* 395, 387-391.
- Golic, K. G., and Lindquist, S. (1989). The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* 59, 499-509.
- Gonzalez-Reyes, A., and St Johnston, D. (1998). Patterning of the follicle cell epithelium along the anterior-posterior axis during *Drosophila* oogenesis. *Development* 125, 2837-2846.
- Gotta, M., Abraham, M. C., and Ahringer, J. (2001). CDC-42 controls early cell polarity and spindle orientation in *C. elegans*. *Curr Biol* 11, 482-488.
- Grewal, S. S., Li, L., Orian, A., Eisenman, R. N., and Edgar, B. A. (2005). Myc-dependent regulation of ribosomal RNA synthesis during *Drosophila* development. *Nat Cell Biol* 7, 295-302.

- Grieder, N. C., de Cuevas, M., and Spradling, A. C. (2000). The fusome organizes the microtubule network during oocyte differentiation in *Drosophila*. *Development* 127, 4253-4264.
- Guo, Q., Fu, W., Xie, J., Luo, H., Sells, S. F., Geddes, J. W., Bondada, V., Rangnekar, V. M., and Mattson, M. P. (1998). Par-4 is a mediator of neuronal degeneration associated with the pathogenesis of Alzheimer disease. *Nat Med* 4, 957-962.
- Guo, S., and Kemphues, K. J. (1996). A non-muscle myosin required for embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 382, 455-458.
- Harris, T. J., and Peifer, M. (2004). Adherens junction-dependent and -independent steps in the establishment of epithelial cell polarity in *Drosophila*. *J Cell Biol* 167, 135-147.
- Harris, T. J., and Peifer, M. (2005). The positioning and segregation of apical cues during epithelial polarity establishment in *Drosophila*. *J Cell Biol* 170, 813-823.
- Henrique, D., and Schweisguth, F. (2003). Cell polarity: the ups and downs of the Par6/aPKC complex. *Curr Opin Genet Dev* 13, 341-350.
- Hirai, T., and Chida, K. (2003). Protein kinase Czeta (PKCzeta): activation mechanisms and cellular functions. *J Biochem (Tokyo)* 133, 1-7.
- Hirano, Y., Yoshinaga, S., Ogura, K., Yokochi, M., Noda, Y., Sumimoto, H., and Inagaki, F. (2004). Solution structure of atypical protein kinase C PB1 domain and its mode of interaction with ZIP/p62 and MEK5. *J Biol Chem* 279, 31883-31890.
- Hirano, Y., Yoshinaga, S., Takeya, R., Suzuki, N. N., Horiuchi, M., Kohjima, M., Sumimoto, H., and Inagaki, F. (2005). Structure of a cell polarity regulator, a complex between atypical PKC and Par6 PB1 domains. *J Biol Chem* 280, 9653-9661.
- Hirose, T., Izumi, Y., Nagashima, Y., Tamai-Nagai, Y., Kurihara, H., Sakai, T., Suzuki, Y., Yamanaka, T., Suzuki, A., Mizuno, K., and Ohno, S. (2002). Involvement of ASIP/PAR-3 in the promotion of epithelial tight junction formation. *J Cell Sci* 115, 2485-2495.
- Hong, Y., Stronach, B., Perrimon, N., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (2001). *Drosophila* Stardust interacts with Crumbs to control polarity of epithelia but not neuroblasts. *Nature* 414, 634-638.
- Hortsch, M., Patel, N. H., Bieber, A. J., Traquina, Z. R., and Goodman, C. S. (1990). *Drosophila* neurotactin, a surface glycoprotein with homology to serine esterases, is dynamically expressed during embryogenesis. *Development* 110, 1327-1340.
- Hung, T. J., and Kemphues, K. J. (1999). PAR-6 is a conserved PDZ domain-containing protein that colocalizes with PAR-3 in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development* 126, 127-135.
- Hurd, T. W., Gao, L., Roh, M. H., Macara, I. G., and Margolis, B. (2003). Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. *Nat Cell Biol* 5, 137-142.

- Hurd, T. W., and Margolis, B. (2005). Pars and polarity: taking control of Rac. *Nat Cell Biol* 7, 205-207.
- Hutterer, A., Betschinger, J., Petronczki, M., and Knoblich, J. A. (2004). Sequential roles of Cdc42, Par-6, aPKC, and Lgl in the establishment of epithelial polarity during *Drosophila* embryogenesis. *Dev Cell* 6, 845-854.
- Huynh, J. R., Petronczki, M., Knoblich, J. A., and St Johnston, D. (2001a). Bazooka and PAR-6 are required with PAR-1 for the maintenance of oocyte fate in *Drosophila*. *Curr Biol* 11, 901-906.
- Huynh, J. R., Shulman, J. M., Benton, R., and St Johnston, D. (2001b). PAR-1 is required for the maintenance of oocyte fate in *Drosophila*. *Development* 128, 1201-1209.
- Itoh, M., Sasaki, H., Furuse, M., Ozaki, H., Kita, T., and Tsukita, S. (2001). Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *J Cell Biol* 154, 491-497.
- Izumi, Y., Hirose, T., Tamai, Y., Hirai, S., Nagashima, Y., Fujimoto, T., Tabuse, Y., Kemphues, K. J., and Ohno, S. (1998). An atypical PKC directly associates and colocalizes at the epithelial tight junction with ASIP, a mammalian homologue of *Caenorhabditis elegans* polarity protein PAR-3 [In Process Citation]. *J Cell Biol* 143, 95-106.
- Izumi, Y., Ohta, N., Hisata, K., Raabe, T., and Matsuzaki, F. (2006). *Drosophila* Pins-binding protein Mud regulates spindle-polarity coupling and centrosome organization. *Nat Cell Biol* 8, 586-593.
- Izumi, Y., Ohta, N., Itoh-Furuya, A., Fuse, N., and Matsuzaki, F. (2004). Differential functions of G protein and Baz-aPKC signaling pathways in *Drosophila* neuroblast asymmetric division. *J Cell Biol* 164, 729-738.
- Joberty, G., Petersen, C., Gao, L., and Macara, I. G. (2000). The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat Cell Biol* 2, 531-539.
- Johnson, K., and Wodarz, A. (2003). A genetic hierarchy controlling cell polarity. *Nat Cell Biol* 5, 12-14.
- Kaltschmidt, J. A., Davidson, C. M., Brown, N. H., and Brand, A. H. (2000). Rotation and asymmetry of the mitotic spindle direct asymmetric cell division in the developing central nervous system. *Nat Cell Biol* 2, 7-12.
- Kay, A. J., and Hunter, C. P. (2001). CDC-42 regulates PAR protein localization and function to control cellular and embryonic polarity in *C. elegans*. *Curr Biol* 11, 474-481.
- Kemphues, K. (2000). PARsing embryonic polarity. *Cell* 101, 345-348.
- Keranen, L. M., Dutil, E. M., and Newton, A. C. (1995). Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Curr Biol* 5, 1394-1403.

- Knust, E., and Bossinger, O. (2002). Composition and formation of intercellular junctions in epithelial cells. *Science* 298, 1955-1959.
- Knust, E., Tepass, U., and Wodarz, A. (1993). crumbs and stardust, two genes of *Drosophila* required for the development of epithelial cell polarity. *Dev Suppl* 1993, 261-268.
- Kraut, R., Chia, W., Jan, L. Y., Jan, Y. N., and Knoblich, J. A. (1996). Role of inscuteable in orienting asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Nature* 383, 50-55.
- Lantz, V., Chang, J. S., Horabin, J. I., Bopp, D., and Schedl, P. (1994). The *Drosophila* orb RNA-binding protein is required for the formation of the egg chamber and establishment of polarity. *Genes Dev* 8, 598-613.
- Le Bivic, A. (2005). E-cadherin-mediated adhesion is not the founding event of epithelial cell polarity in *Drosophila*. *Trends Cell Biol* 15, 237-240.
- Le Good, J. A., Ziegler, W. H., Parekh, D. B., Alessi, D. R., Cohen, P., and Parker, P. J. (1998). Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* 281, 2042-2045.
- Lecuit, T. (2004). Junctions and vesicular trafficking during *Drosophila* cellularization. *J Cell Sci* 117, 3427-3433.
- Lee, C. Y., Robinson, K. J., and Doe, C. Q. (2006a). Lgl, Pins and aPKC regulate neuroblast self-renewal versus differentiation. *Nature* 439, 594-598.
- Lee, C. Y., Wilkinson, B. D., Siegrist, S. E., Wharton, R. P., and Doe, C. Q. (2006b). Brat is a Miranda cargo protein that promotes neuronal differentiation and inhibits neuroblast self-renewal. *Dev Cell* 10, 441-449.
- Lehman, K., Rossi, G., Adamo, J. E., and Brennwald, P. (1999). Yeast homologues of tomosyn and lethal giant larvae function in exocytosis and are associated with the plasma membrane SNARE, Sec9. *J Cell Biol* 146, 125-140.
- Lemmers, C., Michel, D., Lane-Guermonprez, L., Delgrossi, M. H., Medina, E., Arsanto, J. P., and Le Bivic, A. (2004). CRB3 binds directly to Par6 and regulates the morphogenesis of the tight junctions in mammalian epithelial cells. *Mol Biol Cell* 15, 1324-1333.
- Li, L., and Vaessin, H. (2000). Pan-neural Prospero terminates cell proliferation during *Drosophila* neurogenesis. *Genes Dev* 14, 147-151.
- Liliental, J., Moon, S. Y., Lesche, R., Mamillapalli, R., Li, D., Zheng, Y., Sun, H., and Wu, H. (2000). Genetic deletion of the Pten tumor suppressor gene promotes cell motility by activation of Rac1 and Cdc42 GTPases. *Curr Biol* 10, 401-404.
- Lin, D., Edwards, A. S., Fawcett, J. P., Mbamalu, G., Scott, J. D., and Pawson, T. (2000). A mammalian Par-3-Par-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat Cell Biol* 2, 540-547.

- Lin, H., Yue, L., and Spradling, A. C. (1994). The *Drosophila* fusome, a germline-specific organelle, contains membrane skeletal proteins and functions in cyst formation. *Development* 120, 947-956.
- Ling, D. S., Benardo, L. S., Serrano, P. A., Blace, N., Kelly, M. T., Crary, J. F., and Sacktor, T. C. (2002). Protein kinase Mzeta is necessary and sufficient for LTP maintenance. *Nat Neurosci* 5, 295-296.
- Luschnig, S., Moussian, B., Krauss, J., Desjeux, I., Perkovic, J., and Nusslein-Volhard, C. (2004). An F1 genetic screen for maternal-effect mutations affecting embryonic pattern formation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 167, 325-342.
- Macara, I. G. (2004). Parsing the polarity code. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 220-231.
- Matter, K. (2000). Epithelial polarity: sorting out the sorters. *Curr Biol* 10, R39-42.
- Minichiello, J., Ben-Ya'acov, A., Hearn, C. J., Needham, B., and Newgreen, D. F. (1999). Induction of epithelio-mesenchymal transformation of quail embryonic neural cells by inhibition of atypical protein kinase-C. *Cell Tissue Res* 295, 195-206.
- Musch, A., Cohen, D., Yeaman, C., Nelson, W. J., Rodriguez-Boulan, E., and Brennwald, P. J. (2002). Mammalian homolog of *Drosophila* tumor suppressor lethal (2) giant larvae interacts with basolateral exocytic machinery in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* 13, 158-168.
- Müller, H. A., and Bossinger, O. (2003). Molecular networks controlling epithelial cell polarity in development. *Mech Dev* 120, 1231-1256.
- Müller, H. A., and Wieschaus, E. (1996). armadillo, bazooka, and stardust are critical for early stages in formation of the zonula adherens and maintenance of the polarized blastoderm epithelium in *Drosophila*. *J Cell Biol* 134, 149-163.
- 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., and 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.
- Nam, S. C., and Choi, K. W. (2003). Interaction of Par-6 and Crumbs complexes is essential for photoreceptor morphogenesis in *Drosophila*. *Development* 130, 4363-4372.
- Nelson, W. J. (2003). Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature* 422, 766-774.
- Neuman-Silberberg, F. S., and Schupbach, T. (1993). The *Drosophila* dorsoventral patterning gene *gurken* produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF alpha-like protein. *Cell* 75, 165-174.
- Newton, A. C. (2001). Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev* 101, 2353-2364.

- Noda, Y., Kohjima, M., Izaki, T., Ota, K., Yoshinaga, S., Inagaki, F., Ito, T., and Sumimoto, H. (2003). Molecular recognition in dimerization between PB1 domains. *J Biol Chem* 278, 43516-43524.
- Noda, Y., Takeya, R., Ohno, S., Naito, S., Ito, T., and Sumimoto, H. (2001). Human homologues of the *Caenorhabditis elegans* cell polarity protein PAR6 as an adaptor that links the small GTPases Rac and Cdc42 to atypical protein kinase C. *Genes Cells* 6, 107-119.
- Ohno, S. (2001). Intercellular junctions and cellular polarity: the PAR-aPKC complex, a conserved core cassette playing fundamental roles in cell polarity. *Curr Opin Cell Biol* 13, 641-648.
- Ohshiro, T., Yagami, T., Zhang, C., and Matsuzaki, F. (2000). Role of cortical tumour-suppressor proteins in asymmetric division of *Drosophila* neuroblast. *Nature* 408, 593-596.
- Peifer, M., Sweeton, D., Casey, M., and Wieschaus, E. (1994). wingless signal and Zeste-white 3 kinase trigger opposing changes in the intracellular distribution of Armadillo. *Development* 120, 369-380.
- Peng, C. Y., Manning, L., Albertson, R., and Doe, C. Q. (2000). The tumour-suppressor genes *lgl* and *dlg* regulate basal protein targeting in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* 408, 596-600.
- Peri, F., and Roth, S. (2000). Combined activities of Gurken and decapentaplegic specify dorsal chorion structures of the *Drosophila* egg. *Development* 127, 841-850.
- Petronczki, M., and Knoblich, J. A. (2001). DmPAR-6 directs epithelial polarity and asymmetric cell division of neuroblasts in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* 3, 43-49.
- Plant, P. J., Fawcett, J. P., Lin, D. C., Holdorf, A. D., Binns, K., Kulkarni, S., and Pawson, T. (2003). A polarity complex of mPar-6 and atypical PKC binds, phosphorylates and regulates mammalian Lgl. *Nat Cell Biol* 5, 301-308.
- Price, J. V., Clifford, R. J., and Schupbach, T. (1989). The maternal ventralizing locus torpedo is allelic to faint little ball, an embryonic lethal, and encodes the *Drosophila* EGF receptor homolog. *Cell* 56, 1085-1092.
- Queenan, A. M., Barcelo, G., Van Buskirk, C., and Schupbach, T. (1999). The transmembrane region of Gurken is not required for biological activity, but is necessary for transport to the oocyte membrane in *Drosophila*. *Mech Dev* 89, 35-42.
- Riechmann, V., and Ephrussi, A. (2001). Axis formation during *Drosophila* oogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 11, 374-383.
- Rodriguez-Boulan, E., and Nelson, W. J. (1989). Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science* 245, 718-725.
- Roegiers, F., and Jan, Y. N. (2004). Asymmetric cell division. *Curr Opin Cell Biol* 16, 195-205.

- Rolls, M. M., Albertson, R., Shih, H. P., Lee, C. Y., and Doe, C. Q. (2003). *Drosophila* aPKC regulates cell polarity and cell proliferation in neuroblasts and epithelia. *J Cell Biol* 163, 1089-1098.
- Rose, L. S., and Kemphues, K. J. (1998). Early patterning of the *C. elegans* embryo. *Annu Rev Genet* 32, 521-545.
- Roth, S. (2001). *Drosophila* oogenesis: coordinating germ line and soma. *Curr Biol* 11, R779-781.
- Sapir, A., Schweitzer, R., and Shilo, B. Z. (1998). Sequential activation of the EGF receptor pathway during *Drosophila* oogenesis establishes the dorsoventral axis. *Development* 125, 191-200.
- Schaefer, M., Petronczki, M., Dorner, D., Forte, M., and Knoblich, J. A. (2001). Heterotrimeric G proteins direct two modes of asymmetric cell division in the *Drosophila* nervous system. *Cell* 107, 183-194.
- Schaefer, M., Shevchenko, A., and Knoblich, J. A. (2000). A protein complex containing Inscuteable and the Galphai-binding protein Pins orients asymmetric cell divisions in *Drosophila* [see comments]. *Curr Biol* 10, 353-362.
- Schneider, S. Q., and Bowerman, B. (2003). Cell polarity and the cytoskeleton in the *Caenorhabditis elegans* zygote. *Annu Rev Genet* 37, 221-249.
- Schober, M., Schaefer, M., and Knoblich, J. A. (1999). Bazooka recruits Inscuteable to orient asymmetric cell divisions in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* 402, 548-551.
- Schwartz, J. H. (1993). Cognitive kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8310-8313.
- Sells, S. F., Wood, D. P., Jr., Joshi-Barve, S. S., Muthukumar, S., Jacob, R. J., Crist, S. A., Humphreys, S., and Rangnekar, V. M. (1994). Commonality of the gene programs induced by effectors of apoptosis in androgen-dependent and -independent prostate cells. *Cell Growth Differ* 5, 457-466.
- Shulman, J. M., Benton, R., and St Johnston, D. (2000). The *Drosophila* homolog of *C. elegans* PAR-1 organizes the oocyte cytoskeleton and directs oskar mRNA localization to the posterior pole. *Cell* 101, 377-388.
- Siegrist, S. E., and Doe, C. Q. (2005). Microtubule-induced Pins/Galphai cortical polarity in *Drosophila* neuroblasts. *Cell* 123, 1323-1335.
- Sotillos, S., Diaz-Meco, M. T., Caminero, E., Moscat, J., and Campuzano, S. (2004). DaPKC-dependent phosphorylation of Crumbs is required for epithelial cell polarity in *Drosophila*. *J Cell Biol* 166, 549-557.
- Spradling, A. C. (1993). Developmental genetics of oogenesis, In *The development of Drosophila melanogaster*, M. Bate, and A. Martinez-Arias, eds. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 1-70.

- St Johnston, D., Beuchle, D., and Nusslein-Volhard, C. (1991). *Staufen*, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell* 66, 51-63.
- Strand, D., Jakobs, R., Merdes, G., Neumann, B., Kalmes, A., Heid, H. W., Husmann, I., and Mechler, B. M. (1994). The *Drosophila* lethal(2)giant larvae tumor suppressor protein forms homo-oligomers and is associated with nonmuscle myosin II heavy chain. *J Cell Biol* 127, 1361-1373.
- Suzuki, A., Hirata, M., Kamimura, K., Maniwa, R., Yamanaka, T., Mizuno, K., Kishikawa, M., Hirose, H., Amano, Y., Izumi, N., *et al.* (2004). aPKC acts upstream of PAR-1b in both the establishment and maintenance of mammalian epithelial polarity. *Curr Biol* 14, 1425-1435.
- Suzuki, A., and Ohno, S. (2006). The PAR-aPKC system: lessons in polarity. *J Cell Sci* 119, 979-987.
- Suzuki, A., Yamanaka, T., Hirose, T., Manabe, N., Mizuno, K., Shimizu, M., Akimoto, K., Izumi, Y., Ohnishi, T., and 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.
- Tabuse, Y., Izumi, Y., Piano, F., Kempfues, K. J., Miwa, J., and Ohno, S. (1998). Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 125, 3607-3614.
- Tanentzapf, G., Smith, C., McGlade, J., and Tepass, U. (2000). Apical, lateral, and basal polarization cues contribute to the development of the follicular epithelium during *Drosophila* oogenesis. *J Cell Biol* 151, 891-904.
- Tanentzapf, G., and Tepass, U. (2003). Interactions between the crumbs, lethal giant larvae and bazooka pathways in epithelial polarization. *Nat Cell Biol* 5, 46-52.
- Tepass, U. (1996). Crumbs, a component of the apical membrane, is required for zonula adherens formation in primary epithelia of *Drosophila*. *Dev Biol* 177, 217-225.
- Tepass, U. (1997). Epithelial differentiation in *Drosophila*. *Bioessays* 19, 673-682.
- Tepass, U. (1999). Genetic analysis of cadherin function in animal morphogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 11, 540-548.
- Tepass, U., and Hartenstein, V. (1994). The development of cellular junctions in the *Drosophila* embryo. *Dev Biol* 161, 563-596.
- Tepass, U., and Knust, E. (1990). Phenotypic and developmental analysis of mutations at the crumbs locus, a gene required for the development of epithelia in *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch Dev Biol* 199, 189-206.
- Tepass, U., and Knust, E. (1993). Crumbs and stardust act in a genetic pathway that controls the organization of epithelia in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 159, 311-326.

- Theopold, U., Pinter, M., Daffre, S., Tryselius, Y., Friedrich, P., Nassel, D. R., and Hultmark, D. (1995). CalpA, a *Drosophila* calpain homolog specifically expressed in a small set of nerve, midgut, and blood cells. *Mol Cell Biol* 15, 824-834.
- Tomancak, P., Guichet, A., Zavorszky, P., and Ephrussi, A. (1998). Oocyte polarity depends on regulation of gurken by Vasa. *Development* 125, 1723-1732.
- Tomancak, P., Piano, F., Riechmann, V., Gunsalus, K. C., Kempfues, K. J., and Ephrussi, A. (2000). A *Drosophila melanogaster* homologue of *Caenorhabditis elegans* par-1 acts at an early step in embryonic-axis formation. *Nat Cell Biol* 2, 458-460.
- Tzivion, G., Shen, Y. H., and Zhu, J. (2001). 14-3-3 proteins; bringing new definitions to scaffolding. *Oncogene* 20, 6331-6338.
- Uemura, T., Oda, H., Kraut, R., Hayashi, S., Kotaoka, Y., and Takeichi, M. (1996). Zygotic *Drosophila* E-cadherin expression is required for processes of dynamic epithelial cell rearrangement in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 10, 659-671.
- Vaessin, H., Grell, E., Wolff, E., Bier, E., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1991). prospero is expressed in neuronal precursors and encodes a nuclear protein that is involved in the control of axonal outgrowth in *Drosophila*. *Cell* 67, 941-953.
- van Eeden, F., and St Johnston, D. (1999). The polarisation of the anterior-posterior and dorsal-ventral axes during *Drosophila* oogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 9, 396-404.
- Vasioukhin, V. (2006). Lethal giant puzzle of Lgl. *Dev Neurosci* 28, 13-24.
- von Stein, W., Ramrath, A., Grimm, A., Muller-Borg, M., and Wodarz, A. (2005). Direct association of Bazooka/PAR-3 with the lipid phosphatase PTEN reveals a link between the PAR/aPKC complex and phosphoinositide signaling. *Development* 132, 1675-1686.
- Watts, J. L., Etemad-Moghadam, B., Guo, S., Boyd, L., Draper, B. W., Mello, C. C., Priess, J. R., and Kempfues, 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. *Development* 122, 3133-3140.
- Wilson, M. I., Gill, D. J., Perisic, O., Quinn, M. T., and Williams, R. L. (2003). PB1 domain-mediated heterodimerization in NADPH oxidase and signaling complexes of atypical protein kinase C with Par6 and p62. *Mol Cell* 12, 39-50.
- Wirtz-Peitz, F., and Knoblich, J. A. (2006). Lethal giant larvae take on a life of their own. *Trends Cell Biol* 16, 234-241.
- Wodarz, A., and Gonzalez, C. (2006). Connecting cancer to the asymmetric division of stem cells. *Cell* 124, 1121-1123.
- Wodarz, A., Hinz, U., Engelbert, M., and Knust, E. (1995). Expression of Crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *Drosophila*. *Cell* 82, 67-76.

- Wodarz, A., and Huttner, W. B. (2003). Asymmetric cell division during neurogenesis in *Drosophila* and vertebrates. *Mech Dev* 120, 1297-1309.
- Wodarz, A., Ramrath, A., Grimm, A., and Knust, E. (2000). *Drosophila* atypical protein kinase C associates with Bazooka and controls polarity of epithelia and neuroblasts. *J Cell Biol* 150, 1361-1374.
- Wodarz, A., Ramrath, A., Kuchinke, U., and Knust, E. (1999). Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* 402, 544-547.
- Woods, D. F., and Bryant, P. J. (1991). The discs-large tumor suppressor gene of *Drosophila* encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. *Cell* 66, 451-464.
- Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Sugiyama, Y., Ishiyama, C., Suzuki, A., Hirose, T., Iwamatsu, A., Shinohara, A., and Ohno, S. (2003). Mammalian Lgl Forms a Protein Complex with PAR-6 and aPKC Independently of PAR-3 to Regulate Epithelial Cell Polarity. *Curr Biol* 13, 734-743.
- Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Suzuki, A., Sugiyama, Y., Kitamura, K., Maniwa, R., Nagai, Y., Yamashita, A., Hirose, T., Ishikawa, H., and Ohno, S. (2001). PAR-6 regulates aPKC activity in a novel way and mediates cell-cell contact-induced formation of the epithelial junctional complex. *Genes Cells* 6, 721-731.
- Yeh, E., Gustafson, K., and Boulianne, G. L. (1995). Green fluorescent protein as a vital marker and reporter of gene expression in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7036-7040.
- Yu, F., Cai, Y., Kaushik, R., Yang, X., and Chia, W. (2003). Distinct roles of G $\alpha$  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.
- Yu, F., Morin, X., Cai, Y., Yang, X., and Chia, W. (2000). Analysis of partner of inscuteable, a novel player of *Drosophila* asymmetric divisions, reveals two distinct steps in inscuteable apical localization. *Cell* 100, 399-409.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungen

$\alpha$ -...	anti-...
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	kodierende DNA
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
g	Gramm
h	Stunden
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
LB-Medium	Luria Bertani Broth-Medium
m...	milli... ( $10^{-3}$ )
M	Molarität (mol/l)
min	Minuten
$\mu$ ...	mikro... ( $10^{-6}$ )
mRNA	messenger-RNA
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster
rNTP	Ribonukleotid-Triphosphat
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
ssRNA	einzelsträngige RNA
Tab.	Tabelle
U	Unit
UV-Licht	ultraviolettes Licht
ü.N.	über Nacht
V	Volt

### 7.2 Sequenzen

#### 7.2.1 Sequenzierung des Allels *DaPKC<sup>psu69</sup>*

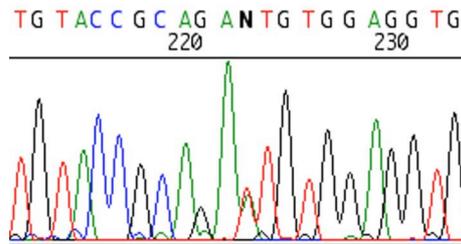
Sequenzierung des Allels *DaPKC<sup>psu69</sup>* auf genomischer DNA homozygoter Fliegen mit dem Primer aPKC14913

```
cTTtGTCTTtCagTATTTCCCAATGTTCCCTCAGCGCCGGGATTGTCTTACGATGGCGAAGATCGTAAGT
ATTTGCGAAAGTAACTAATTTTAAATATATTTTCATTCAAACGATAACTGCTCGAACAGCGAACTTT
GCAATATGAATAAAACGACTAAAGATTACCACTTGTTATTGATTCATCGATCGTTTGACTCATTATG
CCGCTTTTCACGGCCTGTACTTTGATTTAAAAAACGCGGACTTTCTTAAAAAGGGTTAAATGTTTA
GATTTTAAAAGTTAATTTAAATTGCTGTCAGAAAACTAATTTGTTCTCTGATATCGCTTTTCGTTGG
AACATTTGCACATATTTGACAAGTGGTGTGTCAAAAAGTGAA
```

### 7.2.2 Sequenzierung des Allels *DaPKC<sup>psu141</sup>*

Sequenzierung des Allels *DaPKC<sup>psu141</sup>* auf genomischer DNA mit dem Primer aPKC16580rev mit Elektropherogramm der markierten Basen:

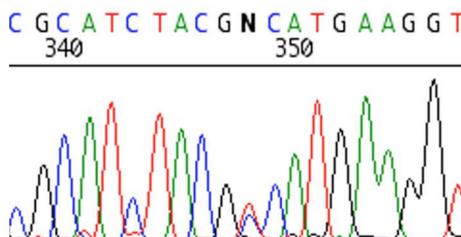
TCCTCAGTGGTTCTGCGAAAAAAAAACCAACAAATTAGAATTTCTCAAATAAATGAATATGGTTA  
CCTGATCGGGATTCTCTGAGGCTCCTGCCAGATCAAACGGACTACGGCCGGCCAACATCTCATAGA  
GCAAGACGCCTAGTGCCACCAGTCCACCGAGAAGCCATAGTCCTCGCCCCTCAGTATCTCAGGGG  
CAATGTAATTGGGTGTACCGCAGANTGTGGAGGTGGTGTCTCCAGGTCGAATGCCCTCCTTACACA  
TGCCGTAATCCGTTAGCTTGATGTGGCCCTCGTGATCCAGCAGCACGTTGTCCAGCTTCAGATCGCG  
ATAAATGATGCCCTTCTCGTGAAGGAAATTCAGCGCCAAACTGATCTCG



### 7.2.3 Sequenzierung des Allels *DaPKC<sup>psu265</sup>*

Sequenzierung des Allels *DaPKC<sup>psu265</sup>* auf genomischer DNA mit dem Primer aPKC15517 mit Elektropherogramm der markierten Basen:

TGCaTCCAGTGCAAGCTGTTGGAiGCACAAGAAGTGCCATAAGCTTGTGCAGAACACTGCACCGAC  
CAGCCGGAGCCGCTGGTCAAGGAGCGGGCGGAGGAGTCCAGTGACCCTATAACGGTGCCTTTGCC  
GCCACTTCCCTACGAAGCGATGAGCGGGGAGCCGAAGCCTGCGAGACGCACGACCATGCGCACA  
TAGTGCGCCACC GCCACCGGAGGATCCATTGGAGCCGGGCACTCAGCGCCAGTATTCGCTGAAC  
GACTTCGAGCTGATACGGGTCAATCGGACGCGGCAGCTATGCCAAGGTGCTAATGGTGGAGCTACG  
ACGCACACGGCGCATCTACGNCATGAAGGTGATCAAGAAGGCGCTGGTCAACGACGACGAGGACA  
TCGACTGGGTGCAAACGGAGAAGCATGTGTTTCGAGACGGCCTcGAACCACCCGTTCTGGTCCGAT  
TGCACTCGTGCTTCCAGACGCCCTCGcGGcTCTTCTTTGTCATCGAGTTTGTGCGCgGtGGCgATTTGA  
TGTACCACATGCagcGGcAACGGCGGcTGcCCgAgGAgcACNCCCgTTTcTATGCAGcCgAgATCAgtTTG  
GgcTGAATTTccTTCNNNANAANGNNATNNTTTATNNNNANNNNANNTNGNNCACNNNCTNNTNNN  
NNACNANNNNNNATNNTNNNCNN

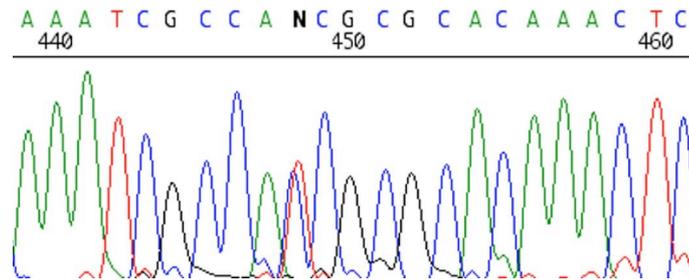


### 7.2.4 Sequenzierung des Allels *DaPKC<sup>psu417</sup>*

Sequenzierung des Allels *DaPKC<sup>psu417</sup>* auf genomischer DNA mit dem Primer aPKC16580rev mit Elektropherogramm der markierten Basen:

TcagtGTTCTGCGAAAAAAAAACCAACAAATTAGAATTTCTCAAATAAATGAATATGGTTACCT  
GATCGGGATTCTCTGAGGCTCCTGCCAGATCAAACGGACTACGGCCGGCCAACATCTCATAGAGCA  
AGACGCCTAGTGCCACCAGTCCACCGAGAAGCCATAGTCCTCGCCCCTCAGTATCTCAGGGGCAA  
TGTAATTGGGTGTACCGCAgAATGTGGAGGTGGTGTCTCCAGGTCGAATGCCCTCCTTACACATGCC  
GTAATCCGTTAGCTTGATGTGGCCCTCGTGATCCAGCAGCACGTTGTCCAGCTTCAGATCGCGATA  
AATGATGCCCTTCTCGTGAAGGAAATTCAGCGCCAAACTGATCTCGGCTGCATAGAAACGGGCGTG  
CTCCTCGGGCAGCCGCCGTTGCCGCTGCATGTGGTACATCAAAATCGCCA<sup>N</sup>CGCGCAAAACTCGAT  
GACAAAGAAGAGCCGCGAGGGCGTCTGGAAGCACGAGTGCAATCCGACCAGGAACGGGTGGTTC  
GAGGCCGTCTCGAACACATGCTTCTCCGTTTGACCCAGTCGATGTCTCTCGTCTCGGTGACCAGC

GCCTTCTTGATCACCTTCATGGCGTA<sub>g</sub>ATGCGCCGTGTGCGTCGTAGCTCCACCATTAGCACCTTGG  
 CATAGCTGCCGCGTCCGATGACCCGTATCAGCTCGAAGTCGTTTCAGCGAATACTGGCGCTGAGTGC  
 CCGGCTCC<sub>a</sub>ATGGATCCTCCGGTGGCGGTGGCGCCACTATGTGCGCATGGTCGTGCGTCTCGCA<sub>g</sub>GC  
 TTC<sub>g</sub>GCTCCGCCGCTCATCGCTTC<sub>g</sub>TAgGGA<sub>g</sub>TGGCGGC<sub>a</sub>AA<sub>g</sub>GCACC



### 7.2.5 Sequenzierung der RT-PCR mit dem Primer aPKC11011

GCCCCAGCACACCGTCGGCCAATCAGCAGGGCAGTGGCAACTTGTGCTACAGCCCCACCTGTCGAT  
 CGCGCTGCTCGAGTCCTTGTCCGGGATCTCCGTGCGGCTCCATTACGCCGCCACCTCCGCCGATGCT  
 CACGTCCTCGCAGCAGCACCTGCATTCCAATAAGAATTGCCAGCGGCGCAGCAACTGATGACCCA  
 CTTGGATTACGCCGCTCGGAGACAATCGCTCGACCAGCTGGATAGTCCACAGGCCAACCAGYTGTC  
 GGACATCATGTGCCGCGGAGCGGWGGTCAGTTCCATTTCAGTCGGCGAACAACACGCTGACCCGTG  
 GCGTATCGATGCACAGTAGGAGTGGCAGTGCCACGGGAGTCACCATGGCAGCCACCACAGTCAC  
 AGTCA TCATGGCAGTGCCACGGA TCKCTGGGCTGTTTGCAGGGMGGCGTGGGAGTGGGCGTGGG  
 CACAGGAAGTACGGGCAGCATTGGCATGATGTCGGCCGGACATATCGACACTGGTGACTACGATG  
 TGCCGCATCCGCACCCGTATACGCATCATTATATGCAGACGACGGCATCNGNGACACCCGNCACACA  
 CGTCACTCAGNCGACCCGGATCGGCGGGTGCCGTGNGCCAGNNTCAGACTCTGGATCGGATTCTA  
 GTCAAGGTTGCGNGGATCNATAATGGGCGGCATGTNGTCATGGNTCATCCGNGNNTATGGGAGNT  
 TGGNTCACCACACGCCGTAGNGGATCGCTGGGCGNGGTGCTCGNGNGATGTNNCATANNANNACNN  
 CCNCNACGNATGATTNNGCGTNGNNTACNGCNNNNCNNN

### 7.2.6 Sequenzierung der RT-PCR mit dem Primer aPKC12596rev

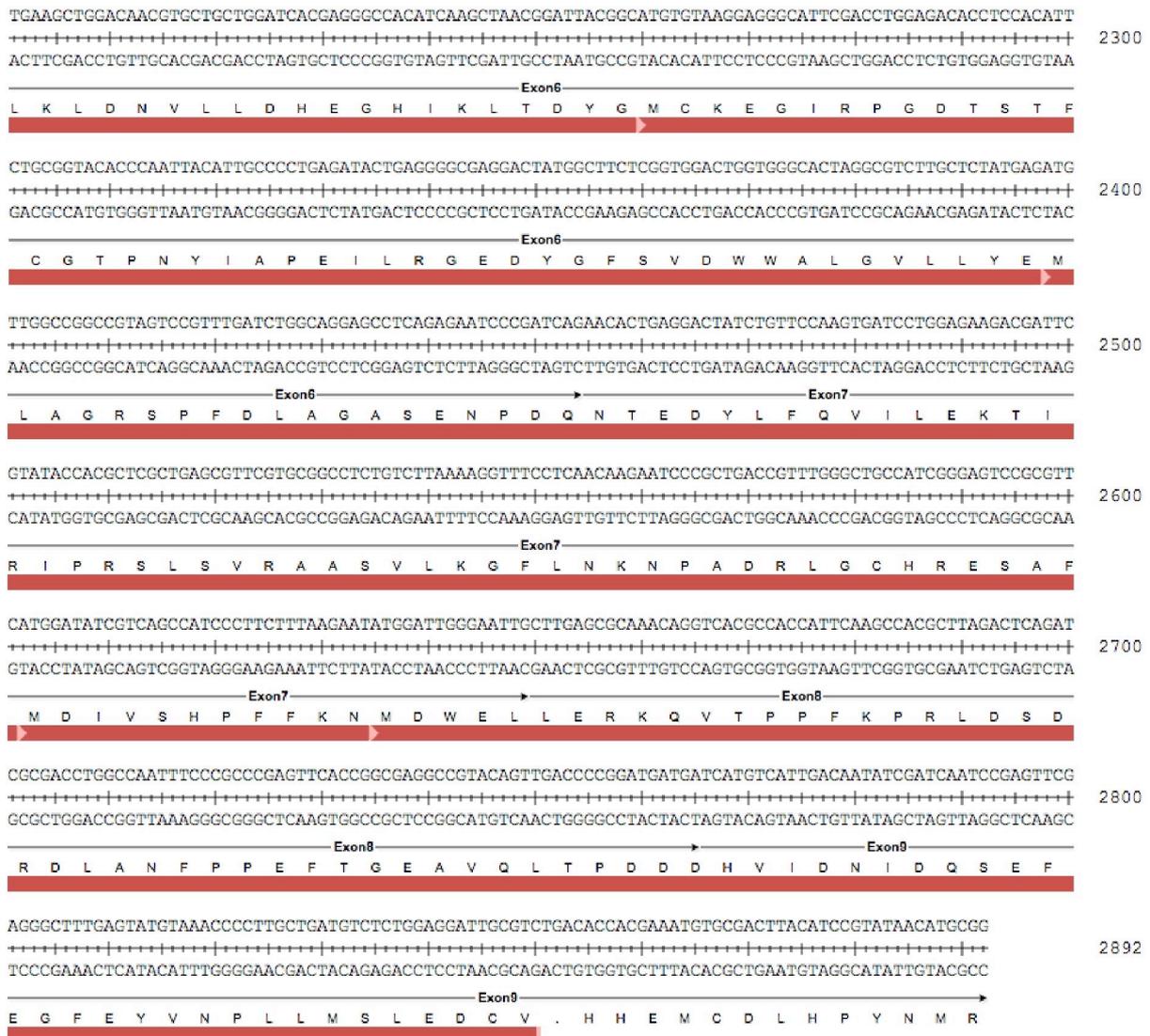
CGATTGCCATTCCCGTGCCATACCCACAGTGCCGATGGGCGTGGCACCGTCCCTCGCAGCAGATG  
 TCACAGCACCAGCTTCAATCGGAGGAGGAGATCGAGCCAGCCTATGCGACAGTATTCCCAATGTT  
 CCTCAAGCGCCGGGATGTCTTGCGATGGCGAAGATCGCAGCATCTATCGACGCGGTGCTCGACGC  
 TGGCGCAAGTGTATCGCGTCAACGGACACATCTTCCAGGCCAAGCGTTTCAACCGGCGTGCTTTC  
 TGTGCCTACTGCCAGGATCGAATCTGGGGTTTGGGACGTCAGGGTTTCAAGTGCATCCAGTGCAAG  
 CTGTTGGTGCACAAGAAGTGCCATAAGCTTGTGCAGAAGCACTGCACCGACCAGCCGGAGCCGCT  
 GGTCAAGGAGCGGGCGGAGGAGTCCAGTGACCTATAACCGGTGCCTTTGCCGCCACTTCCCTACGA  
 AGCGATGAGCGGCGGAGCCGAAGCCTGCGAGACGCACGACCATGCGCACATAGTGGCGCCACCCG  
 CACCGGAGGATCCATTGGAGCCGGGCACTCAGCGCCAGTATTCGCTGAACGACTTCGAGCTGATAC  
 GGGTCATCGGACGCGGACGCTATGCCAAGGTGCTAATGGTGGAGCTACGACGCACACGGCGCATC  
 TACGCCATGAAGGTGATCAAGAAGGCGCTGGTCAACGACGACGAGGACATCGACTGGGTGCAAAC  
 GGAGAAGCATGTGTTTCGAGACGGCCTCGAACCACCCGTTTCTGGTTCGGATTGCACTCGTGCTTCCA  
 GACGCCCTCGCGGCTTCTTTGTTCATCGAGTTTGTGCGCGGTGGCGATTTGATGTACCACATGCAG  
 CGGCAACGGCGGCTGCCCGAGGAGCACGCCCGTTTCTATGCAGCCGAGATCAGTTTGGCGCTGAA



1. Exon *GC30475*
2. Exon *GC30475*
4. Exon *DaPKC*
5. Exon *DaPKC*
6. Exon *DaPKC*







Gezeigt ist die 2892bp lange Sequenz eines alternativen Transkriptes, in dem die ersten beiden Exons von *CG30475* an das vierte Exon der *DaPKC* gespleißt werden. Die Basenpaare von *CG30475* sind in kleinen Buchstaben angegeben und die Basenpaare der *DaPKC* in großen Buchstaben. Der ORF ist als roter Balken dargestellt und beginnt direkt mit der ersten Aminosäure. Möglicherweise wird dieses Protein nach der Translation zur aPKM prozessiert.

## 7.3 Tabellen

### 7.3.1 Lokalisation diverser Proteine in NB von Keimbahnklonen

Durch Rundungen ist es möglich, dass die Gesamtwerte nicht 100% betragen.

<b>aPKC</b>	<b>WT</b> (n=57)	<b>psu69</b>	<b>psu141</b>	<b>psu265</b> (n=54)	<b>psu417</b> (n=38)	<b>k06403</b> (n=164)	<b>Par6<math>\Delta</math>226</b> (n=8)
apikal	100,0%	0,0%	0,0%	49,0%	23,7%	0,0%	0,0%
schwach apikal	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	5,3%	0,0%	0,0%
schwach punktiert apikal	0,0%	0,0%	0,0%	29,4%	23,7%	0,0%	37,5%
$\Sigma$ apical	100,0%	0,0%	0,0%	78,4%	52,7%	0,0%	37,5%
keine Lokalisation	0,0%	100,0%	100,0%	17,6%	47,4%	-	62,5%

<b>Bazooka</b>	<b>WT</b> (n=156)	<b>psu69</b> (n=98)	<b>psu141</b> (n=56)	<b>psu265</b> (n=85)	<b>psu417</b> (n=102)	<b>k06403</b> (n=172)	<b>Par6<math>\Delta</math>226</b> (n=72)
apical	100,0%	87,8%	80,4%	75,3%	65,7%	26,3%	50,0%
schwach apikal	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	21,6%	3,4%	13,8%
$\Sigma$ apikal	100,0%	87,8%	80,4%	75,3%	87,3%	29,7%	63,8%
überall am Cortex	0,0%	1,0%	1,8%	1,2%	0,0%	8,5%	0,0%
keine Lokalisation	0,0%	9,0%	17,9%	22,4%	9,8%	61,9%	33,3%

<b>Par-6</b>	<b>WT</b> (n=52)	<b>psu69</b> (n=38)	<b>psu141</b> (n=75)	<b>psu265</b>	<b>psu417</b> (n=71)	<b>k06403</b> (n=125)	<b>Par6<math>\Delta</math>226</b> (n=72)
apikal	100%	18,40%	32%	k.A.	52,10%	0,0%	0,0%
schwach apikal	0	13,20%	18,70%	k.A.	9,90%	0,0%	0,0%
$\Sigma$ apikal	100%	31,60%	50,70%	k.A.	62%	0,0%	0,0%
keine Lokalisation	0	68,40%	46,70%	k.A.	36,60%	100,0%	-

<b>Inscuteable</b>	<b>WT</b> (n=60)	<b>psu69</b> (n=88)	<b>psu141</b> (n=80)	<b>psu265</b>	<b>psu417</b> (n=88)	<b>k06403</b>	<b>Par6<math>\Delta</math>226</b> (n=34)
apikal	100,0%	50,0%	52,5%	k.A.	45,5%	k.A.	17,1%
schwach apikal	0,0%	21,6%	15,0%	k.A.	17,0%	k.A.	0,0%
schwach punktiert apikal	0,0%	6,8%	10,0%	k.A.	11,4%	k.A.	0,0%
$\Sigma$ apikal	100,0%	78,4%	77,5%	k.A.	73,9%	k.A.	17,1%
keine Lokalisation	0,0%	19,3%	18,8%	k.A.	20,5%	k.A.	82,9%

<b>Miranda</b>	<b>WT</b> (n=273)	<b>psu69</b> (n=154)	<b>psu141</b> (n=126)	<b>psu265</b> (n=61)	<b>psu417</b> (n=188)	<b>k06403</b> (n=211)	<b>Par6<math>\Delta</math>226</b> (n=42)
überall am Cortex	0,0%	24,0%	10,3%	4,9%	46,8%	19,4%	26,2%
basal und schwach apikal	0,0%	7,1%	6,3%	16,4%	5,3%	1,4%	4,8%
apikal und schwach basal	0,0%	0,0%	0,8%	0,0%	5,3%	5,2%	2,4%
lateral, beidseitig	0,0%	19,5%	7,1%	0,0%	6,9%	1,4%	7,1%
lateral, einseitig	0,0%	0,7%	0,0%	3,3%	1,0%	0,0%	7,1%
$\Sigma$ corical	0,0%	51,3%	24,5%	24,6%	65,3%	27,4%	47,6%
basal	100,0%	43,5%	67,5%	75,4%	25,0%	0,5%	23,8%
apikal	0,0%	3,9%	2,4%	0,0%	8,5%	21,3%	11,9%
keine Lokalisation	0,0%	1,2%	5,6%	0,0%	1,0%	50,7%	16,7%

### 7.3.2 Stellung der Metaphaseplatte in den NB von Keimbahnklonen

Durch Rundungen ist es möglich, dass die Gesamtwerte nicht 100% betragen.

<b>DNA</b>	<b>WT</b> (n=325)	<b>psu69</b> (n=224)	<b>psu141</b> (n=217)	<b>psu265</b> (n=136)	<b>psu417</b> (n=299)	<b>k06403</b> (n=332)	<b>Par6<math>\wedge</math>226</b> (n=114)
Metaphaseplatte parallel [1]	84,6%	51,8%	46,5%	61,0%	54,8%	18,1%	34,2%
NB bis 20° Abw. [2]	91,1%	58,9%	54,4%	72,8%	62,5%	19,6%	36,0%
NB mit 20° bis 45° Abw. [3]	6,5%	8,5%	6,4%	5,1%	10,4%	3,6%	5,3%
NB über 45° Abw. [4]	0,0%	7,1%	8,8%	5,2%	2,7%	4,2%	1,8%
Spindelfehlstellung kleiner 20° [5]	1,2%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	7,0%
Spindelfehlstellung größer 20° [6]	1,2%	7,6%	8,3%	0,7%	4,7%	1,5%	14,9%
keine Färbung, Spindel parallel [7]	0,0%	10,7%	10,6%	8,1%	11,7%	30,1%	23,7%
keine Färbung, Spindelfehlstellung [8]	0,0%	7,1%	11,5%	8,1%	8,0%	41,0%	10,5%
$\Sigma$ [2] und [7]	91,1%	69,6%	65,0%	80,9%	74,2%	49,7%	59,7%
$\Sigma$ [3], [4] und [8]	6,5%	22,7%	26,7%	18,4%	21,1%	48,8%	17,6%

[1] alle NB, deren MPP parallel zu mindestens einem polar ausgebildeten Marker und dem darüber liegendem Epithel liegen.

[2] alle NB, deren MPP parallel zu mindestens einem polar ausgebildeten Marker und mit bis zu 20° Abweichung zu dem darüber liegendem Epithel liegen.

[3] alle NB, deren MPP parallel zu mindestens einem polar ausgebildeten Marker liegen. Die MPP weicht von 20° bis 45° von dem darüber liegendem Epithel ab.

[4] alle NB, deren MPP parallel zu mindestens einem polar ausgebildeten Marker liegen. Die MPP weicht mit über 45° von dem darüber liegendem Epithel ab.

[5] alle NB, bei denen die MPP mit einer Abweichung von bis zu 20° zu polar ausgebildeten Markern liegt.

[6] alle NB, bei denen die MPP mit einer Abweichung von über 20° zu polar ausgebildeten Markern liegt.

[7] alle NB, deren MPP parallel zu dem darüber liegendem Epithel liegen und keine polaren Marker ausgebildet haben.

[8] alle NB, die keine polaren Marker ausgebildet haben und deren MPP nicht parallel zum darüber liegenden Epithel liegt.

MPP Metaphaseplatte

## **Danksagung**

Diese Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Andreas Wodarz am Institut für Genetik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und in der Abteilung Stammzellbiologie der Georg-August-Universität Göttingen angefertigt.

Bei Ihm möchte ich mich für die Betreuung, seine stetige Ansprechbereitschaft, die sehr gute Arbeitsatmosphäre und alle Möglichkeiten zur Teilnahme an wissenschaftlichen Meetings bedanken.

Herrn Prof. Dr. Uli Rütter danke ich für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens.

Bernard Moussian und Marcella Tello-Ruiz danke ich für die Überlassung von Materialien und Informationen vor ihrer Veröffentlichung.

Ein großes Dankeschön geht an alle Mitarbeiter in Düsseldorf und Göttingen – André Bachmann, Sandra Berger, Olaf Bossinger, Manual Breuer, Claudia Buabe, Hans Bünemann, Stefanie Chmielewski, Frau Czakainski, Diane Egger, Nannette Fischer, Ankathrin Förster, Karen Fricke, Ieva Gailite, Ferdi Grawe, Alexandra Grimm, Tanja Gryzik, Nils Halbsgut, Brigitte Haumann, Elke Henze, Nora Hinssen, Mic Hoffmann, Mona Honemann, Kevin Johnson, Özlem Kempkens, Miriana und Thomas Kessler, Anna Klingseisen, Elisabeth Knust, Carmen Koch, Michael Krahn, Monika Meyer, Wibke Meyer de Márquez, Tobi Morawe, Arno Müller, Marion Müller-Borg, Nadine Muschalik, Susann Özüyaman, Sirin Otte, Patricia Räke-Kügler, Melisande Richards, Sabine Schumacher, Christoph Segbert, Chieko Takizawa, Sylvia Tannebaum, Eva Theilenberg, Daniela van Fürden, Andreas van Impel, Walter von Stein und Gang Zhang - für die immer gegenwärtige Hilfsbereitschaft und die super Arbeitsatmosphäre, insbesondere im A-Team Lab.

Besonders bedanken möchte ich mich nochmal bei Tanja und André für so viele Dinge, Carmen für das Schwimmen und die Zeit in Göttingen, Britta Heuschen für die gemeinsame Zeit während des Studiums und meinem Bruder Olaf für die technischen Updates.

Meiner Familie danke ich für Ihre Unterstützung während der gesamten Studienzeit.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Göttingen, den 22.02.2007

Soya Kim