

**T48 reguliert mit Fog/Concertina die
Zellformveränderungen während der
Mesoderminvagination in *Drosophila
melanogaster***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Verena Kölsch
aus Hamburg

Köln, 2006

Berichterstatter: Prof. Dr. Maria Leptin

PD. Dr. Frank Sprenger

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 24. April 2006

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Zusammenfassung	5
Abstract	6
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	8
1.1 Gastrulation	8
1.2 Zellularisierung und Gastrulation in <i>Drosophila melanogaster</i>	8
1.3 Mesoderminvagination in <i>Drosophila</i>	9
1.4 Invagination des hinteren Mitteldarms in <i>Drosophila</i>	11
1.5 Genetische Kontrolle der Mesoderminvagination: Zygotische Faktoren	12
1.5.1 Twist und Snail	12
1.5.2 Folded Gastrulation	13
1.6 Genetische Kontrolle der Mesoderminvagination: maternal-kontrollierte Gene	15
1.6.1 Concertina	15
1.6.2 RhoGEF2	17
1.6.3 Rho-Signalweg, Myosin und Aktinzytoskelett	18
1.7 Adhärenzverbindungen in der frühen Embryonalentwicklung von <i>Drosophila</i>	19
1.7.1 Proteine der Adhärenzverbindungen	20
1.8 Modell zur Steuerung der Mesodermeinwanderung	22
1.9 Ziel der vorliegenden Arbeit	23
2 Ergebnisse	24
2.1 Defizienz <i>Df(3R)Tl^P</i>	24
2.2 Compound-Kreuzungen	25
2.3 Kartierung von kleineren Defizienzen in der Region 97D	27
2.3.1 Phänotypische Analyse der Defizienzen	27
2.3.2 Single-Embryo-PCR	28
2.4 Defizienz <i>Df(3R)CC1.2</i>	31
2.4.1 Phänotypische Analyse	31
2.4.2 Phänotypische Charakterisierung auf zellulärer Ebene	33
2.4.3 Kartierung	34
2.4.4 Rettung der Defizienz <i>Df(3R)CC1.2</i> durch <i>T48</i> -Transgen	35
2.5 T48	37
2.5.1 Expression von <i>T48</i>	37
2.5.2 Struktur von <i>T48</i>	37
2.5.3 Homologe Proteine	38
2.5.4 Lokalisation in der Zelle	39
2.5.5 Interaktionspartner von <i>T48</i>	40
2.5.6 <i>In vitro</i> Untersuchung der möglichen Interaktionspartner von <i>T48</i>	42

2.5.7	<i>In vivo</i> Untersuchung von möglichen Interaktionspartnern	45
2.6	Expression von RhoGEF2 und Armadillo während der Gastrulation in Wildtypembryonen.....	49
2.7	Verteilung von RhoGEF2 und Armadillo in <i>T48</i>-mutanten Embryonen	52
2.8	Kooperation von T48 und Concertina in der Gastrulation.....	54
2.8.1	Phänotypische Analyse von Embryonen von heterozygot <i>concertina</i> -mutanten Müttern, defizient für <i>T48</i>	55
2.8.2	Phänotypische Analyse von <i>concertina/T48</i> -mutanten Embryonen.....	56
2.8.3	Verteilung von RhoGEF2 und Armadillo in <i>concertina/T48</i> -mutanten Embryonen	58
2.9	Verteilung von RhoGEF2 und Armadillo in <i>snail</i>-mutanten Embryonen	59
3	Diskussion	61
3.1	Die Deletion von T48 führt zu Störungen in der Mesoderminvagination	61
3.2	Charakterisierung von T48.....	62
3.3	Interaktionspartner von T48.....	62
3.4	Rolle von T48 in der Gastrulation.....	63
3.5	Kooperation von T48 und Fog/Concertina in der Mesoderminvagination.....	64
3.6	Modell zur Funktion von T48.....	65
3.7	T48 ist Signal X.....	70
3.8	Rolle von T48 und Fog/Concertina in der Verlagerung der Adhärenzverbindungen .	71
3.9	PDZ-Bindemotive als Mechanismus zur Lokalisation von Proteinen	73
4	Material.....	75
4.1	Chemikalien und Materialien	75
4.2	Antikörper, Farbstoffe und Seren.....	75
4.3	Fertige Reagenziensätze („Kits“)	76
4.4	Enzyme und DNA-/Protein-Marker	77
4.5	Einbettungsmedien.....	77
4.6	Fliegenstämme	77
4.7	Oligonukleotide	78
4.8	Verwendete Vektoren.....	82
4.9	Puffer und Lösungen	82
4.10	Computer-Software.....	86
5	Methoden	87
5.1	Fliegenhaltung.....	87
5.2	Ablagen von Embryonen.....	87
5.3	Dechorionisieren von Embryonen	87
5.4	Fixieren von Embryonen	88
5.4.1	Standardfixierung mit 4 % Formaldehyd in PBS	88
5.4.2	Hitzefixierung	88
5.4.3	Fixierung mit Paraformaldehyd.....	88
5.5	Herstellung transgener Fliegen	89
5.5.1	Injektionsmix	89

5.5.2	Injektion.....	89
5.6	Antikörperfärbungen	90
5.6.1	Antikörperfärbung nach der „Avidin-Biotinylated Enzyme Complex“-Methode (ABC-Methode).....	90
5.6.2	Färbung mit Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörpern	91
5.7	<i>In situ</i> Hybridisierung	91
5.7.1	Herstellung einer Sonde	91
5.7.2	Hybridisierung.....	92
5.7.3	Detektion.....	93
5.8	Einbetten von Embryonen und Mikroskopie.....	93
5.8.1	Fluoreszenzfärbung	93
5.8.2	DAB-Färbung/ <i>In situ</i> Hybridisierung	93
5.9	Schnitte von Embryonen.....	94
5.9.1	Fluoreszenzschnitte.....	94
5.9.2	Schnitte nach DAB-Färbung.....	94
5.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	95
5.10.1	Standard-PCR an Plasmid-DNA	95
5.10.2	PCR an einzelnen Embryonen („Single embryo PCR“)	95
5.11	Konstrukte	96
5.11.1	Konstrukte zur Herstellung transgener Fliegen.....	96
5.11.2	Konstrukte für <i>in vitro</i> translation.....	97
5.11.3	Konstrukte für GST-Fusionsproteine der PDZ Domänen.....	97
5.11.4	Konstrukte für Transfektion von Schneiderzellen.....	97
5.12	DNA-Arbeiten.....	98
5.12.1	<i>E. coli</i> -Stämme	98
5.12.2	Restriktionsanalysen	99
5.12.3	Agarose-Gel	99
5.12.4	DNA-Aufreinigung aus dem Gel	99
5.12.5	Ligation und Transformation.....	100
5.12.6	TOPO-TA-Klonierung	100
5.13	Isolierung von Plasmid-DNA.....	101
5.13.1	Mini-Präparation durch Alkalische Lyse	101
5.13.2	Plasmid-Midi-Präparation über Säulen-Chromatografie	101
5.14	Vorhersage möglicher Bindepartner von T48	101
5.15	SDS-PAGE und Coomassie-Färbung.....	102
5.16	<i>In vitro</i> Transkription	102
5.17	<i>In vitro</i> Translation.....	103
5.18	Autoradiografie	103
5.19	Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	104
5.20	Co-Immunopräzipitation.....	104
5.21	Arbeiten mit Schneiderzellen.....	105

5.21.1	Kultivierung von Schneiderzellen	105
5.21.2	Transiente Transfektion von Schneiderzellen	105
5.21.3	Antikörperfärbung an Schneiderzellen	106
6	Literaturverzeichnis	107
7	Anhang	116
7.1	Vektorkarten	116
	Danksagung	118
	Erklärung	119
	Lebenslauf	120

Zusammenfassung

Gastrulation in *Drosophila* wird durch die beiden Transkriptionsfaktoren Twist und Snail gesteuert. Bisher sind nur wenige Zielgene von Twist bekannt, die an der Regulation der Zellformveränderungen, die während der Mesoderminvagination stattfinden, beteiligt sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde *T48* als ein Zielgen von Twist, welches an der Regulation der Zellformveränderungen im Mesoderm beteiligt ist, identifiziert. In Embryonen, die homozygot defizient für *T48* sind, kommt es nur in wenigen Zellen zu apikalen Konstriktionen, was zu einer verspäteten und unkoordinierten Mesoderminvagination führt. *T48* ist ein Transmembranprotein mit einem PDZ-Bindemotiv am C-Terminus. Durch die Expression von *T48HA* wurde eine Lokalisation von *T48* an der apikalen Membran der Zellen nachgewiesen. In Interaktionsstudien wurde gezeigt, dass *T48* mit RhoGEF2 über das PDZ-Bindemotiv interagiert. Embryonen defizient für *T48* zeigten eine verzögerte Akkumulation von RhoGEF2 an der apikalen Membran der mesodermalen Zellen. Späte Stadien zeigten dennoch eine deutliche apikale Lokalisation von RhoGEF2. Ähnliches konnte auch in Embryonen von homozygot *concertina*-mutanten Müttern beobachtet werden. In *cta/T48*-mutanten Embryonen jedoch kam es zu keinem Zeitpunkt zu einer apikalen Akkumulation von RhoGEF2. In diesen Embryonen fand keine Mesoderminvagination statt. *T48* und der Fog/Concertina-Signalweg führen somit beide zu einer apikalen Akkumulation von RhoGEF2. Dies ist die Voraussetzung für eine apikale Anreicherung von Myosin und einer Konstriktion des Aktinzytoskeletts an der apikalen Seite der mesodermalen Zellen. Bei Ausfall von einem der beiden Signalwege ist die Akkumulation von RhoGEF2 und das Einsetzen der Mesoderminvagination verzögert. Bei Ausfall beider Signale kann kein RhoGEF2 apikal akkumuliert werden und die Mesoderminvagination wird vollständig inhibiert. Zusätzlich zeigten *cta/T48*-mutante Embryonen einen Defekt in der Ausbildung oder Aufrechterhaltung der Adhärenzverbindungen während der Mesoderminvagination. Ergebnisse aus dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Verlagerung der Adhärenzverbindungen während der Mesoderminvagination einen teilweisen Ab- und Wiederaufbau beinhaltet.

Abstract

Gastrulation in *Drosophila* is regulated by the two transcription factors Twist and Snail. But only a few targets of Twist are known to be involved in regulating cell shape changes during mesoderm invagination. This work reports the role of T48, a target of Twist, in regulating the cell shape changes occurring in the mesoderm. Embryos homozygous deficient for *T48* display reduced apical constrictions in the mesodermal cells. This leads to a delay in furrow formation and irregularities during invagination of the mesoderm. T48 is a transmembrane protein with a PDZ-binding motif at the C-terminus. T48HA expressed in the early embryo localises to the apical membrane of the cells. T48 interacts with RhoGEF2 via the PDZ-binding motif. Embryos homozygous deficient for *T48* show a delay in the accumulation of RhoGEF2 at the apical membrane of the invaginating cells. The accumulation is not completely blocked; at later stages an association of RhoGEF2 with the membrane is detectable. A similar phenotype can be observed in embryos from *concertina* mutant mothers. In *cta/T48* mutant embryos the accumulation of RhoGEF2 at the apical membrane is absent and mesoderm invagination is completely blocked. Thus, T48 and Fog/Concertina signalling act in parallel to concentrate RhoGEF2 at the apical side of the ventral cells, which is necessary for the enrichment of Myosin and the constriction of the actin cytoskeleton at the apical side of the cells. If one of the signals is absent, the enrichment of RhoGEF2 is slowed down and the invagination is delayed. If both the signals are absent, RhoGEF2 fails to accumulate apically and invagination is completely blocked.

In addition, *cta/T48* mutant embryos exhibit defects in the relocalisation of the adherens junctions during mesoderm invagination. The results suggest that there is a step of at least partial disassembly involved in relocalising the adherens junctions during mesoderm invagination.

Abkürzungsverzeichnis

bHLH	Basisches Helix-Loop-Helix-Motiv
BSA	Rinderserum
DAB	Diaminobenzidin
DH	Dbl-Homologie
EMT	Epithel-Mesenchym-Übergang
FBS	Fötale Rinderserum
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDI	Guanine-Nukleotid-Dissoziations-Inhibitor
GDP	Guanindiphosphat
GEF	Guanine-Nukleotid-Austauschfaktor
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanintriphosphat
HA	Hämagglutinin
NGS	Ziegenserum
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PH	Pleckstrin-Homologie

1 Einleitung

1.1 Gastrulation

Gastrulation bezeichnet einen Prozess, bei dem aus einem zuvor einschichtigen Epithel ein mehrschichtiger Organismus gebildet wird. Der Prozess der Gastrulation findet sich im gesamten Tierreich, von den Schwämmen bis zu den Wirbeltieren. Während dieses Prozesses werden die unterschiedlichen Keimblätter etabliert, indem die Zellen des zukünftigen Mesoderms und Entoderms in das Innere des Embryos verlagert werden.

Gastrulation beinhaltet eine Vielzahl von Prozessen, wie Ingression, Involution und Invagination (zusammengefasst in Stern 2004).

1.2 Zellularisierung und Gastrulation in *Drosophila melanogaster*

Die Entwicklung von *Drosophila melanogaster* beginnt mit einer Reihe von schnellen und synchronen Kernteilungen ohne Zellteilungen (Foe *et al.* 1993). Die Kerne wandern an die Peripherie und formen einen Monolayer von Zellkernen unter der Oberfläche. Dieses Stadium wird synzytiales Blastoderm genannt. Nach weiteren 4 Kernteilungen beginnen Plasmamembranen zwischen den Kernen nach innen einzuwandern und es entsteht ein einschichtiges Epithel, das so genannte zelluläre Blastoderm (Foe *et al.* 1993; Schejter *et al.* 1993; Hunter *et al.* 2000; Mazumdar *et al.* 2002). Nun beginnen die Gastrulationsbewegungen (Poulson 1950; Sonnenblick 1950; Mahowald 1963; Turner *et al.* 1977; Fullilove *et al.* 1978; Campos-Ortega *et al.* 1985; Leptin *et al.* 1990; Sweeton *et al.* 1991). An der Ventralseite des Embryos wandert das Mesoderm ein, am posterioren Ende invaginiert das posteriore Endoderm, begleitet von der Ausstreckung des Keimstreifs. Im anterioren Bereich entsteht die Kopffalte und Teile des anterioren Endoderms invaginieren (Leptin 2004, Abbildung 1.1).

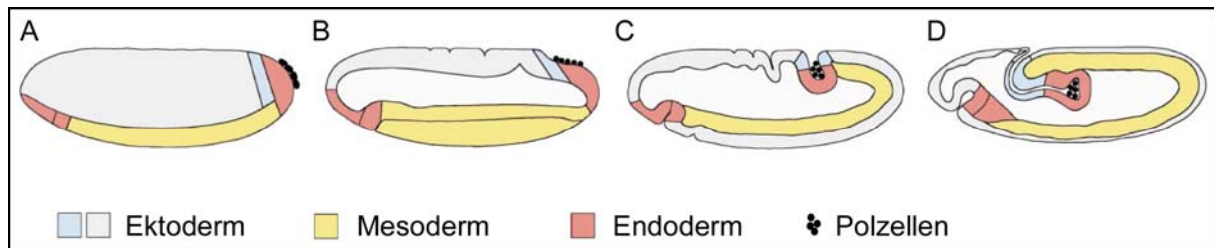


Abbildung 1.1: Anlageplan eines *Drosophila*-Embryos (modifiziert nach Leptin 1999)

Während der Invaginationen finden keine Zellteilungen statt, sie beruhen allein auf Zellformveränderungen (Turner *et al.* 1977; Foe 1989; Foe *et al.* 1993).

1.3 Mesoderminvagination in *Drosophila*

Während der Mesoderminvagination wandert das prospektive Mesoderm im ventralen Bereich des Embryos nach innen und bildet die so genannte Ventralfurche. Im weiteren Verlauf gelangt das gesamte spätere Mesoderm ins Innere des Embryos, der Zellverband löst sich auf und die einzelnen Zellen wandern unter dem Ektoderm nach dorsal und beginnen, sich in die verschiedenen Mesodermderivate zu differenzieren (Abbildung 1.2).

In *Drosophila* beginnt die Invagination des Mesoderms etwa 3 Stunden nach Eiablage. Zu diesem Zeitpunkt besteht der Embryo aus etwa 6000 Zellen, die ein einschichtiges Epithel bilden. Diese Zellen haben ihre basale Seite nach innen, apikal ist außen. Die späteren Keimzellen (= Polzellen) befinden sich als separate Zellansammlung am posterioren Pol. Das prospektive Mesoderm umfasst etwa 1000 Zellen und befindet sich an der ventralen Seite des Embryos in einem Streifen, der etwa 18 Zellen breit ist. Diese 18 Zellen lassen sich anhand ihres Verhaltens während der Gastrulation in 2 Populationen aufteilen: etwa 12 Zellen als zentrale Domäne und etwa 3 Zellen auf jeder Seite in der peripheren Region (Leptin *et al.* 1990; Sweeton *et al.* 1991).

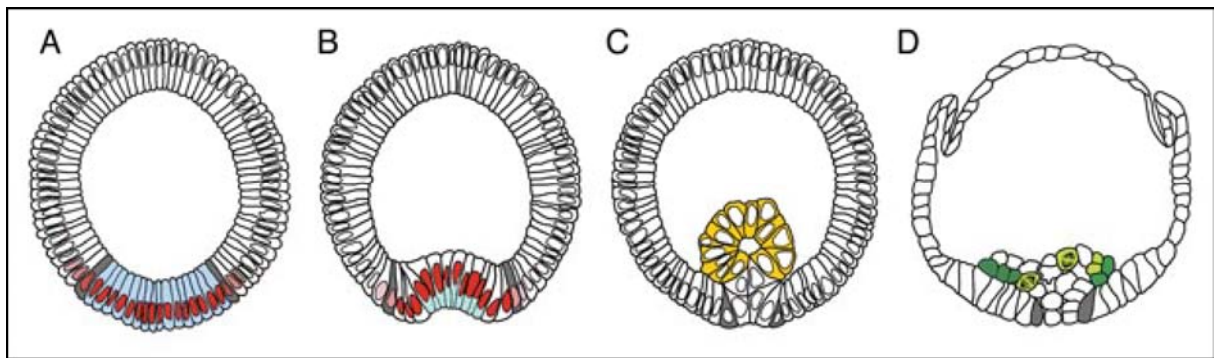


Abbildung 1.2: Schematische Querschnitte von *Drosophila*-Embryonen während der Mesoderminvagination (modifiziert nach Leptin 2004)

(A) Zelluläres Blastoderm; (B) die ventralen Zellen haben sich apikal zusammen gezogen und eine Furche geformt. (C) Das Mesoderm ist vollständig eingewandert. (D) Die mesodermalen Zellen verlieren ihren epithelialen Charakter, beginnen sich zu teilen und wandern unter dem Ektoderm nach dorsal. rot: Expression von Twist; blau: Expression von Snail; grau: mesektodermale Zellen; türkis: Expression von Fog; gelb: Expression von Heartless/Dof; hellgrün: Zellen in der Mitose; dunkelgrün: FGF-Rezeptor-Aktivität .

Die Invagination beginnt mit einer Reihe von Zellformveränderungen in den mesodermalen Zellen (Leptin *et al.* 1990; Sweeton *et al.* 1991, Abbildung 1.3) Das erste sichtbare Zeichen ist ein Abflachen der mesodermalen Zellen an ihrer apikalen Seite. Gleichzeitig oder nur kurz darauf verlieren die Kerne der mesodermalen Zellen ihre apikale Position.

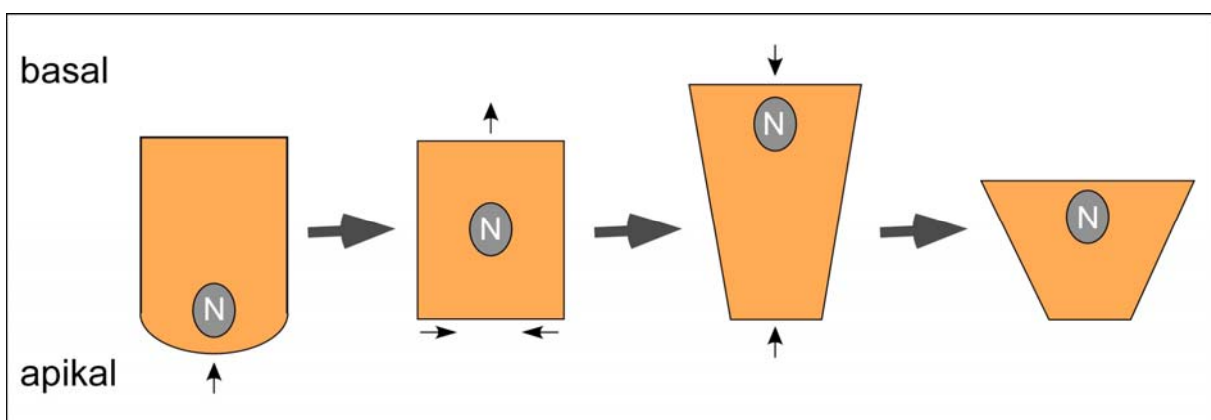


Abbildung 1.3: Zellformveränderungen im Mesoderm während der Gastrulation (Details siehe Text)

Nun beginnen sich die Zellen apikal stark zusammenzuziehen und entlang der apiko-basalen Achse zu strecken (Kam *et al.* 1991). Das Zusammenziehen an der apikalen Seite kann man jedoch nur bei den 12 Zellreihen der zentralen Region feststellen,

während die angrenzenden 3 Zellreihen mehr oder weniger stark an ihrer apikalen Seite gestreckt werden (Leptin *et al.* 1990; Sweeton *et al.* 1991). Durch das Zusammenziehen der Zellen an der apikalen Seite entsteht eine Einfaltung der mesodermalen Zellen (Abbildung 1.2, B). Diese Invagination verlagert sich weiter in das Innere des Embryos, die Zellen verkürzen sich entlang ihrer apiko-basalen Achse, verbreitern sich basal und bilden ein Rohr im Inneren des Embryos (Leptin *et al.* 1990; Sweeton *et al.* 1991; Costa *et al.* 1994, Abbildung 1.2, C). Kurz darauf beginnt sich der Zellverband dieser invaginierten Zellen aufzulösen. Die Zellen bekommen Kontakt mit den basalen Seiten der ektodermalen Zellen, wandern unter dem Ektoderm nach dorsal und differenzieren sich in die verschiedenen Mesodermderivate, wie z. B. viszerales Mesoderm, Herz, somatisches Mesoderm und Fettkörper (Azpiazu *et al.* 1996; Baylies *et al.* 1996, Abbildung 1.2, D). Die Invagination des Mesoderms erfolgt zellautonom. Die generierten Kräfte kommen aus dem Mesoderm selbst und sind die Summe aller Zellformveränderungen der mesodermalen Zellen (Leptin *et al.* 1990; Kam *et al.* 1991; Straub *et al.* 1996).

1.4 Invagination des hinteren Mitteldarms in *Drosophila*

Kurz nach Beginn der Invagination des Mesoderms beginnt im posterioren Bereich des Embryos die Einwanderung des hinteren Mitteldarms. Diese Einwanderung beginnt mit Zellformveränderungen, die sehr ähnlich zu denen im Mesoderm sind (Sweeton *et al.* 1991). Die Zellen flachen sich ab, ziehen sich apikal zusammen und auch die Kerne ändern ihre Position. Es bildet sich eine Einstülpung am posterioren dorsalen Ende des Embryos. In dieser Einstülpung kommen die Polzellen zu liegen. Durch die nun einsetzende Ausstreckung des Keimstreifes nach dorsal, wandert diese Einstülpung inklusive Polzellen ebenfalls nach dorsal und von dort in das Innere des Embryos und differenziert sich in den hinteren Teil des Mitteldarms (Abbildung 1.1), während die Polzellen die späteren Keimzellen bilden.

1.5 Genetische Kontrolle der Mesoderminvagination: Zygotische Faktoren

1.5.1 Twist und Snail

Zu Beginn der Embryonalentwicklung hat der Embryo von *Drosophila* eine definierte Anterior-Posterior- und Dorso-Ventral-Achse. Die Grundlagen dafür werden schon in der Oozyte angelegt (zusammengefasst in St Johnston *et al.* 1992).

Die Dorso-Ventral-Achse wird durch einen Gradienten des Transkriptionsfaktors Dorsal bestimmt. Durch einen komplexen Signalweg kommt es dazu, dass in den ventralen Zellen Dorsal aus dem Zytoplasma in den Zellkern gelangt, nicht aber in den weiter dorsal gelegenen Zellen (zusammengefasst in Morisato *et al.* 1995).

Es kommt zu einem Gradienten von Dorsal in den Zellkernen entlang der dorso-ventralen Achse (Roth *et al.* 1989; Rushlow *et al.* 1989; Steward 1989). Dorsal aktiviert in den ventralen Zellen, wo die Menge von Dorsal im Zellkern am höchsten ist, die Expression der beiden wichtigsten Gene im Mesoderm, *twist* und *snail* (Boulay *et al.* 1987; Thisse *et al.* 1988; Jiang *et al.* 1991; Pan *et al.* 1991; Ip *et al.* 1992).

Twist und Snail sind ebenfalls Transkriptionsfaktoren. *Twist* kodiert für ein Protein mit basischem Helix-Loop-Helix-Motiv (bHLH-Motiv), welches für das Binden an die DNA verantwortlich ist. Twist übernimmt sehr bald die Funktion von Dorsal und steuert die Expression von *snail* und erhält über einen Rückkopplungsmechanismus auch seine eigene Transkription aufrecht (Leptin 1991; Ip *et al.* 1992). Twist aktiviert außerdem die Expression mesodermspezifischer Faktoren, wie zum Beispiel *folded gastrulation* oder später *tinman* (Thisse *et al.* 1988; Leptin 1991; Costa *et al.* 1994; Yin *et al.* 1997). Twist ist weit über den Zeitraum der Mesoderminvagination im Mesoderm aktiv (Thisse *et al.* 1988).

Snail ist ein Zinkfinger-Protein und wirkt im Gegensatz zu Twist als Transkriptionsrepressor (Boulay *et al.* 1987; Nieto 2002). Snail reprimiert in den ventralen Zellen Gene, die nur im Ektoderm und Mesektoderm aktiv sind, zum Beispiel *rhomboid* und *single-minded* (Kosman *et al.* 1991; Leptin 1991; Ip *et al.* 1992; Kasai *et al.* 1992, Abbildung 1.4).

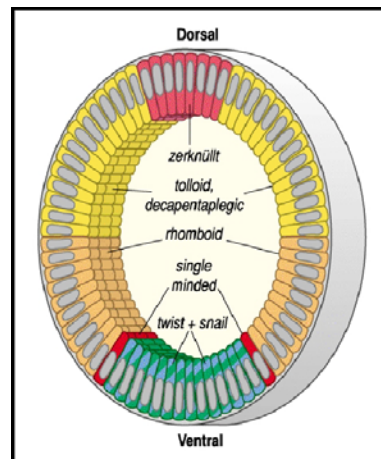


Abbildung 1.4: Schematischer Querschnitt eines Embryos mit den Expressionsdomänen ausgewählter Gene (modifiziert nach Wolpert *et al.* 2001)

Twist und Snail sind für die Invagination des Mesoderms essentiell (Leptin *et al.* 1990; Sweeton *et al.* 1991). In *twist*-mutanten Embryonen flachen sich die Zellen nicht ab und die Zellkerne ändern ihre Position nicht. Es kommt aber zu einer leichten Konstriktion der apikalen Membranen und somit zu einem Ansatz einer Ventralfurche. Diese ist aber nicht stabil, so dass sich nach Ausstreckung des Keimstreifs noch alle Zellen des Mesoderms an der Oberfläche des Embryos befinden. In *snail*-mutanten Embryonen findet man kein Abflachen der Zellen und auch keine apikalen Konstriktionen im Mesoderm. Die Zellen verkürzen sich jedoch entlang der apiko-basalen Achse, wodurch das ventrale Epithel schmäler wird. Auch hier findet keine Invagination der mesodermalen Zellen statt. In Embryonen von *twist* und *snail*-Doppelmutanten findet man keine Anzeichen von Zellformveränderungen im Mesoderm (Leptin *et al.* 1990; Leptin 1991). Dies zeigt, dass Twist und Snail alle Zellformveränderungen im Mesoderm kontrollieren. Ausserdem scheinen Twist und Snail unterschiedliche Aspekte zu kontrollieren, da sich die Phänotypen der Einzelmutanten deutlich unterscheiden.

1.5.2 Folded Gastrulation

Viele von Twist regulierte Gene sind in späteren Stadien der Mesodermentwicklung aktiv, so z. B. während der Migration der Zellen nach dorsal, z. B. *heartless* (Vincent *et al.* 1998) oder während der Differenzierung der verschiedenen Mesodermdervate, wie z. B. *tinman* (Yin *et al.* 1997). Es sind jedoch nur wenige Zielgene von Twist

bekannt, die in der frühen Mesoderminvagination eine Rolle spielen. Zwei identifizierte Zielgene, *tribbles* und *frühstart*, sind an der Regulation der Zellteilungen beteiligt und verhindern Mitosen während der Mesoderminvagination (Seher *et al.* 2000; Grosshans *et al.* 2003).

Das einzige bisher identifizierte Twist-Zielgen, von dem eine Beteiligung an der Regulation der Zellformveränderungen bekannt ist, ist *folded gastrulation* (Costa *et al.* 1994; Morize *et al.* 1998; Dawes-Hoang *et al.* 2005). *Folded gastrulation (fog)* kodiert für ein sekretiertes Peptid ohne signifikante Homologie zu bekannten Proteinen. Fog findet sich in der zentralen Region der mesodermalen Zellen, also in den Zellen, die sich apikal zusammenziehen. Zusätzlich findet man *Folded Gastrulation* im Primordium des posterioren Mitteldarms am hinteren Ende des Embryos (Costa *et al.* 1994). In *fog*-mutanten Embryonen findet man alle typischen Zellformveränderungen in den mesodermalen Zellen. Diese setzen jedoch verspätet ein. Somit ist die Einwanderung des Mesoderms verzögert und läuft zusätzlich unkoordinierter ab als im Wildtyp.

Die Einwanderung des posterioren Mitteldarms ist in *fog*-mutanten Embryonen blockiert. Dies führt zu einer fehlenden Ausstreckung des Keimstreifs. Die Störung in der Einwanderung des Mitteldarms wird durch fehlende Konstriktionen in Zellen des Mitteldarmprimordiums verursacht (Sweeton *et al.* 1991; Costa *et al.* 1994). Die Defekte im Mitteldarmprimordium sind drastischer als die während der Gastrulation und führen zur Letalität, während die Defekte im Mesoderm nur transient sind und alleine nicht zur Letalität führen würden. Dies zeigt die Analyse von Embryonen, die *fog* unter der Kontrolle des *huckebein*-Promotors im Mitteldarmprimordium exprimieren (Zusman *et al.* 1985, M. Leptin unveröffentlicht). In diesen Embryonen sind die Defekte in der Einwanderung des Mitteldarms vollständig supprimiert, die Mesoderminvagination ist weiterhin verzögert und unkoordiniert. Diese Embryonen sind lebensfähig.

Fog ist somit das einzige bisher bekannte Zielgen von Twist, welches die Zellformveränderungen im Mesoderm beeinflusst. Doch der Phänotyp von *fog*-mutanten Embryonen ist deutlich schwächer als der von *twist*-mutanten Embryonen. Somit muss es noch weitere, bisher nicht identifizierte Zielgene von Twist geben, die an den frühen Abläufen der Mesoderminvagination beteiligt sind.

1.6 Genetische Kontrolle der Mesoderminvagination: maternal-kontrollierte Gene

1.6.1 Concertina

Zusätzlich zu den zygotischen Faktoren gibt es maternal-kontrollierte Faktoren, die an der Kontrolle der Gastrulation beteiligt sind.

Concertina (*cta*) ist ein maternal-kontrolliertes Gen und die mRNA findet sich ubiquitär im gesamten Embryo (Parks *et al.* 1991). *Concertina* kodiert für ein G_{α} -Protein (Parks *et al.* 1991). G_{α} -Proteine sind Teile eines Heterotrimers, dem so genannten G-Protein. Diese sind an intrazellulären Signaltransduktionswegen beteiligt und koppeln membrangebundene Rezeptoren an intrazelluläre Effektormoleküle. G-Proteine sind Heterotrimere, die aus einer α -, β - und γ -Untereinheit bestehen. Die α -Untereinheit trägt zusätzlich eine Ras-ähnliche Untereinheit, die GDP bzw. GTP binden kann (Hamm 1998). G-Proteine agieren als molekularer Schalter (Abbildung 1.5): die Bindung von GDP bewirkt, dass die Bindestellen für Effektormoleküle durch die gebundene β - und γ -Untereinheit blockiert werden. Wird GDP durch GTP ausgetauscht, kommt es zu einer Konformationsänderung. Dadurch löst sich die α -Untereinheit von der β - und γ -Untereinheit und Effektormoleküle können binden. Der Übergang zwischen diesen beiden Formen wird durch die Aktivierung des Rezeptors reguliert.

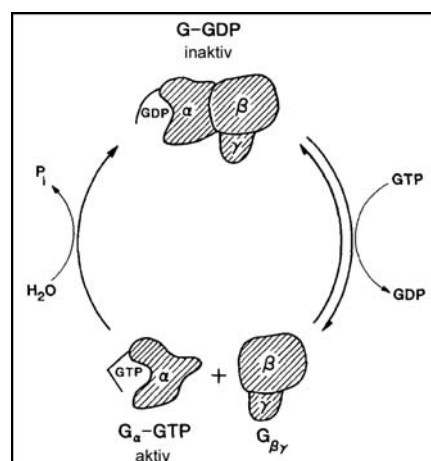


Abbildung 1.5: GDP/GTP-Zyklus von G-Proteinen (modifiziert nach Stryer *et al.* 1986)

Die Aktivierung des Rezeptors durch Bindung eines Liganden katalysiert den Austausch von GDP gegen GTP und führt zur aktiven Form des G-Proteins. Durch

die intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit wird das GTP hydrolysiert und das G-Protein kehrt wieder in den inaktiven Zustand zurück. Es ist nicht klar, wie es zu einer Interaktion zwischen Rezeptor und der GDP-gebundenen, inaktiven Form des G-Proteins kommt. Bisher wurde postuliert, dass die inaktive Form des G-Proteins an den Rezeptor gekoppelt vorliegt (Neubig *et al.* 1988; Neubig 1994). Aktuelle Publikationen stellen dieses Modell jedoch in Frage und gehen davon aus, dass die Interaktion erst nach Ligandenbindung an den Rezeptor durch „rapid collision coupling“ erfolgt (Azpiazu *et al.* 2004; Hein *et al.* 2005).

Concertina zeigt auf Proteinebene höchste Homologie zu den Mausproteinen $G_{\alpha 12}$ und $G_{\alpha 13}$ (Strathmann *et al.* 1989; Parks *et al.* 1991). $G_{\alpha 12}$ - und $G_{\alpha 13}$ -Proteine bilden eine eigene Gruppe von α -Untereinheiten und zeigen nur 35-44 % Identität mit anderen Klassen von α -Untereinheiten von G-Proteinen (Strathmann *et al.* 1991). Zahlreiche Studien liefern Hinweise darauf, dass Mitglieder der $G_{\alpha 12}/G_{\alpha 13}$ -Proteinfamilie zur Aktivierung von Rho-abhängigen Signalwegen führen und in vielen Fällen das Zellwachstum kontrollieren (Offermanns *et al.* 1994; Dhanasekaran *et al.* 1996; Gohla *et al.* 1998).

Während die Proteine der β - und γ -Untereinheit, die mit Concertina ein vollständiges G-Protein bilden, bekannt sind (Schaefer *et al.* 2001; Izumi *et al.* 2004), konnte der entsprechende Rezeptor, der zur Aktivierung des G-Proteins führt, bisher nicht identifiziert werden.

Embryonen von homozygot *concertina*-mutanten Müttern weisen die gleichen Defekte in der Embryonalentwicklung auf wie *fog*-mutante Embryonen (Costa *et al.* 1994). Die Invagination des Mesoderms ist verzögert und unkoordiniert, die Invagination des posterioren Mitteldarmprimordiums, und damit auch die Ausstreckung des Keimstreifs, ist blockiert. Dies legt die Vermutung nahe, dass Folded Gastrulation und Concertina im gleichen Signalweg agieren. Es wird postuliert, dass Fog als sekretiertes Protein einen bisher unidentifizierten G-Protein-gekoppelten Rezeptor in den mesodermalen Zellen und den Zellen des posterioren Mitteldarmprimordiums aktiviert. Dadurch wird Concertina als α -Untereinheit des G-Proteins aktiviert und kann das Signal an Effektormoleküle weiterleiten (Costa *et al.* 1994; Morize *et al.* 1998).

1.6.2 RhoGEF2

RhoGEF2 ist ebenfalls ein maternal-kontrolliertes Gen und kodiert für einen Rho-GTP-Austauschfaktor (Barrett *et al.* 1997; Häcker *et al.* 1998). RhoGEFs sind GTP-Austauschfaktoren für Proteine der Rho-Familie, Cdc42, Rac und Rho (Van Aelst *et al.* 1997). Rho-Proteine kontrollieren verschiedene Aspekte des Zytoskeletts durch einen Wechsel zwischen einem aktiven, GTP-gebundenen Zustand und einen inaktiven, GDP-gebundenen Zustand (Hall 1994). Der Wechsel zwischen dem GDP- oder GTP-gebundenen Zustand wird genau kontrolliert. GDIs (Guanine nucleotide dissociation inhibitors) binden GDP-Rho, stabilisieren diesen Komplex und verhindern so den Austausch von GDP gegen GTP; GAPs (GTPase activating proteins) sind Negativregulatoren und erhöhen die GTP-Hydrolyse, GEFs (guanine nucleotide exchange factors) dagegen führen zum Austausch von GDP gegen GTP und fungieren als Aktivatoren (Ueda *et al.* 1990; Takai *et al.* 1995; Narumiya 1996; Van Aelst *et al.* 1997). RhoGEFs haben einen Bereich von 250 Aminosäuren gemein, die so genannte DH-(Dbl-Homologie)-Domäne, flankiert von einer PH-(Pleckstrin-Homologie)-Domäne (Van Aelst *et al.* 1997; Whitehead *et al.* 1997). Die DH-Domäne ist notwendig für die Nukleotidaustausch-Aktivität gegenüber GTPasen der Rho-Familie (Hart *et al.* 1991; Hart *et al.* 1994). PH-Domänen spielen sowohl bei der Protein-Protein-Interaktion, als auch bei der Protein-Lipid-Interaktion (Lemmon *et al.* 1996).

RhoGEF2 hat zusätzlich noch weitere Domänen: eine PDZ-Domäne (Barrett *et al.* 1997; Häcker *et al.* 1998) und eine LH- oder RGS-ähnliche Domäne (Kozasa *et al.* 1998; Fukuhara *et al.* 1999, Abbildung 1.6).

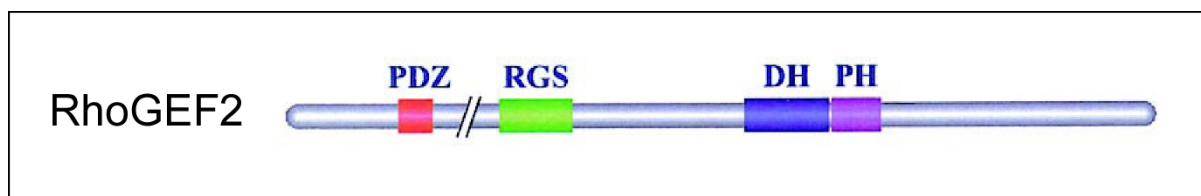


Abbildung 1.6: Proteinstruktur von RhoGEF2 (modifiziert nach Fukuhara *et al.* 2001, Details siehe Text)

PDZ-Domänen sind Proteininteraktionsdomänen und erkennen PDZ-Bindemotive am C-Terminus anderer Proteine. Die Bezeichnung PDZ kommt von den ersten Proteinen, in denen diese Domäne identifiziert wurde: PSD-95, DIg und ZO1 (Woods *et al.* 1991; Cho *et al.* 1992; Kim *et al.* 1995). RGS-(regulator of G-protein signaling)-

Domänen wurden in den so genannten RGS-Proteinen gefunden. RGS-Proteine fungieren als GAPs und inaktivieren die α -Untereinheiten von G-Proteinen durch Katalyse der Hydrolyse von GTP (De Vries *et al.* 1999). Es gibt 2 Klassen von RGS-Proteinen, zum einen sehr kleine Proteine, die nur aus der RGS-Domäne bestehen, zum anderen größere Proteine, die weitere Domänen besitzen, z. B. eine DH-Domäne.

RhoGEF2 besitzt somit eine Domäne, die die Interaktion mit G-Proteinen ermöglichen könnte (RGS-ähnliche Domäne) und eine DH-Domäne für die Regulation der Aktivität von Rho-Proteinen. Dies könnte eine direkte Verbindung zwischen G-Proteinen und der Aktivierung von Rho-Proteinen darstellen. Ein gut untersuchtes Beispiel, wo eine RGS-Domäne mit einem GEF kombiniert ist, ist p115RhoGEF2. P115RhoGEF2 besitzt eine RGS-Domäne, die als GAP für G α 13 fungiert und eine DH-Domäne, die als GEF für die GTPase RhoA wirkt (Hart *et al.* 1998; Kozasa *et al.* 1998; Fukuhara *et al.* 1999).

RhoGEF2 spielt, wie *Folded Gastrulation* und *Concertina* ebenfalls eine Rolle in der Invagination von Mesoderm und Mitteldarmprimordium. Im Gegensatz zu *Folded Gastrulation* und *Concertina* ist RhoGEF2 jedoch essentiell für die Einwanderung des Mesoderms (Barrett *et al.* 1997; Häcker *et al.* 1998). In Embryonen von Müttern, die eine für RhoGEF2 homozygot mutante Keimbahn haben (Chou *et al.* 1993), ist die Invagination des Mesoderms vollständig blockiert. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Zellen nicht die im Wildtyp zu beobachtenden Zellformveränderungen durchlaufen. Die Zellen des Mesoderms flachen sich nicht ab und nur wenige Zellkerne verlassen ihre apikale Position. Sehr wenige Zellen ziehen sich an ihrer apikalen Seite zusammen. Stattdessen verbreitern sich die Zellen apikal, verlieren ihren epithelialen Charakter und schieben sich übereinander. (Barrett *et al.* 1997; Häcker *et al.* 1998). Es bildet sich keine Ventralfurche und das Mesoderm gelangt nicht in das Innere des Embryos. Obwohl dieser Phänotyp sehr viel stärker ist als der von *Fog/Concertina*, wird angenommen, dass die Aktivierung von *Concertina* durch *Fog* zu einer Aktivierung von RhoGEF2 führt. Allerdings muss es ein weiteres Signal parallel zu *Fog/Concertina* geben, das ebenfalls RhoGEF2 beeinflusst.

1.6.3 Rho-Signalweg, Myosin und Aktinzytoskelett

RhoGEF2 führt vermutlich zu einer Aktivierung des Rho-Signalweges über RhoA und *Drosophila* Rho-Kinase (Drok) (Barrett *et al.* 1997; Häcker *et al.* 1998; Dawes-Hoang

et al. 2005). In anderen Organismen agieren RhoGEF2-Homologe durch Rho-Kinasen der Serin-Threonin-Familie, die Myosin-Phosphatasen inhibieren und auch Myosin direkt phosphorylieren (Amano *et al.* 1996). Dies führt zur Bindung von Myosin an Aktin und zu erhöhter aktomyosin-basierter Kontraktion.

In *Drosophila*-Embryonen ist Myosin am Ende der Zellularisierung an der basalen Seite aller Zellen lokalisiert. Während der Gastrulation kommt es in den mesodermalen Zellen zu einer Verlagerung an die apikale Seite der Zellen (Young *et al.* 1991; Royou *et al.* 2004). In Embryonen, die mutant sind für *fog* oder von homozygot *concertina*-mutanten Müttern stammen, ist die Menge an Myosin, das sich während der Gastrulation apikal akkumuliert, verringert (Nikolaidou *et al.* 2004). In Embryonen von Müttern mit Keimbahnklonen für *RhoGEF2* oder *Drok* ist keine Akkumulation von Myosin an der apikalen Membran zu beobachten (Nikolaidou *et al.* 2004; Dawes-Hoang *et al.* 2005).

1.7 Adhärenzverbindungen in der frühen Embryonalentwicklung von *Drosophila*

Adhärenzverbindungen zählen zu den Haftverbindungen von Zellen und ermöglichen eine mechanische Verbindung von Zellen untereinander. Sie ermöglichen Zellgruppen, z. B. Epithelzellen, die Funktion als widerstandsfähige strukturelle Einheit. In differenzierten Epithelzellen bilden die Adhärenzverbindungen meist einen durchgehenden Adhäsionsgürtel, auch Zonula adhaerens genannt. Diese Adhäsionsgürtel befinden sich an den lateralen Membranen in der Nähe der apikalen Zellspitzen. Adhärenzverbindungen sind Anheftungspunkte für Aktinfilamente und ermöglichen so mechanische Verbindungen zwischen dem Zytoskelett benachbarter Zellen (zusammengefasst in Alberts *et al.* 1995).

Während der Zellularisierung in *Drosophila* wandern Membranen zwischen den Kernen des synzytialen Blastoderms ein. An ihrer Spitze befindet sich der Furchungskanal. Im Verlauf der Zellularisierung bilden sich angrenzend an den Furchungskanal punkthaft die so genannten basalen Verbindungen. Sie bleiben mit dem Furchungskanal assoziiert, wandern mit der wachsenden Membran nach basal und beginnen sich nach Abschluss der Zellularisierung aufzulösen. Zusätzlich bilden

sich subapikal an der lateralen Membran ebenfalls punktartige Adhärenzverbindungen. Nach Abschluss der Zellularisierung befinden sich diese Adhärenzverbindungen subapikal an der lateralen Membran aller Zellen. Kurz darauf beginnt sich dies in den ventralen Zellen zu ändern. Die Adhärenzverbindungen verlagern sich an eine apikale Position an der lateralen Membran. In den nicht mesodermalen Zellen bleiben sie an der subapikalen Position bestehen. Es wird davon ausgegangen, dass die Adhärenzverbindungen in den mesodermalen Zellen durch Kräfte, die durch kontraktiles Myosin an der apikalen Seite der Zellen generiert werden, nach apikal gezogen werden (Dawes-Hoang *et al.* 2005). Während der nun einsetzenden Gastrulation bilden die punktartigen Adhärenzverbindungen einen Adhäsionsgürtel um die Zellen aus, die so genannte Zonula adhaerens (zusammengefasst in Tepass *et al.* 2001).

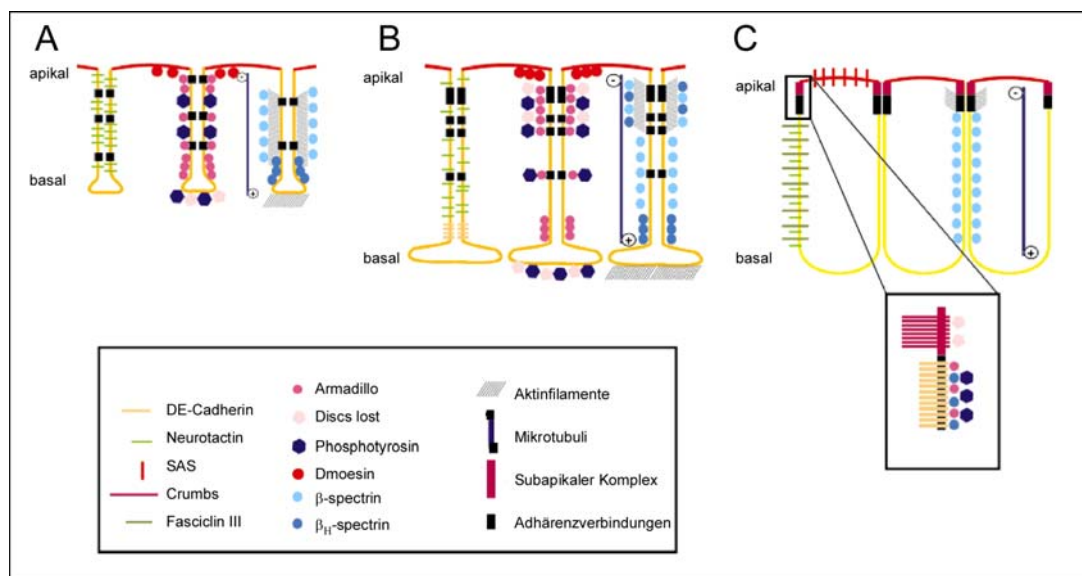


Abbildung 1.7: Anlage der apiko-basalen Polarität während der Embryonalentwicklung von *Drosophila* (modifiziert nach Müller 2000)

(A) Während der Zellularisierung. (B) Zum Ende der Zellularisierung. (C) Ektodermzellen nach Ausstreckung des Keimstreifs. Separat gezeigt ist jeweils die Verteilung von Membranproteinen, Membran-assoziierten und zytoplasmatischen Proteinen.

1.7.1 Proteine der Adhärenzverbindungen

Schon während des Stadiums des ausgestreckten Keimstreifs zeigen die Zellen der Epidermis die Organisation eines typischen Epithels. Die Plasmamembran gliedert sich in verschiedene Bereiche. Einen apikalen und einen basolateralen Bereich, verbunden durch einen Bereich, der die Adhärenzverbindungen enthält.

Der basolaterale Bereich ist durch Lokalisation von Neurotactin und FasciclinIII markiert (Hortsch *et al.* 1990; Woods *et al.* 1997), die apikale Membran durch Proteine wie Stranded at second (Schonbaum *et al.* 1992).

In Bereich der Zonula adhaerens findet man DE-Cadherin, D α -Catenin, β _H-Spectrin, Armadillo und Phosphotyrosyl-Proteine (Oda *et al.* 1993; Oda *et al.* 1994; Müller *et al.* 1996; Thomas *et al.* 1999). Der Bereich der lateralen Membran apikal der Zonula adhaerens wird Subapikaler Komplex genannt und ist durch die Expression von z. B. Crumbs, Bazooka und Stardust definiert (Tepass *et al.* 1996; Klebes *et al.* 2000; Müller 2000).

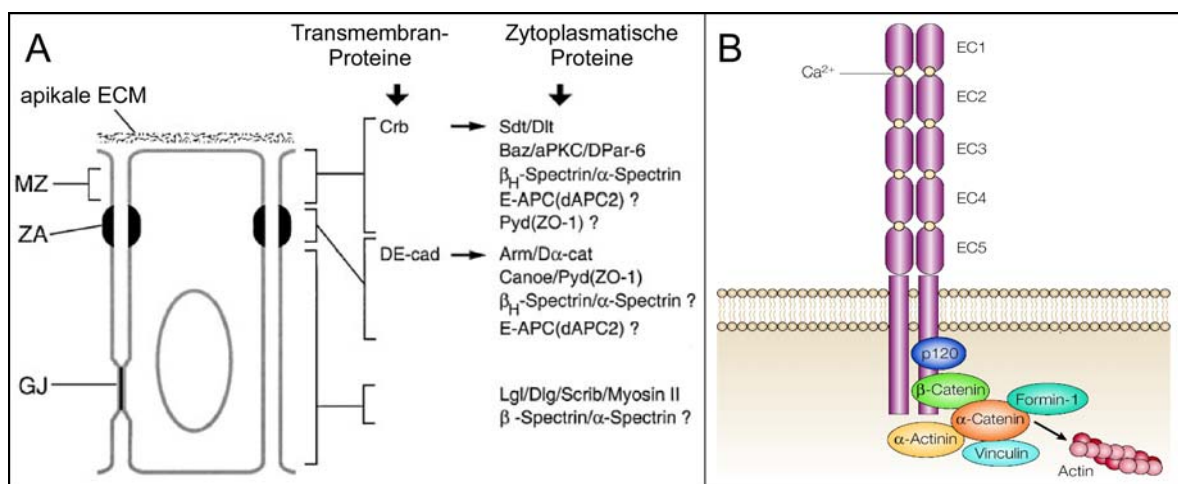


Abbildung 1.8: Proteine in Epithelzellen während der Embryonalentwicklung

(A) Schema einer Epithelzelle und die Verteilung ausgewählter Proteine (modifiziert nach Tepass *et al.* 2001) (B) Aufbau des Cadherin-Catenin-Komplexes der Zonula adhaerens (modifiziert nach Gumbiner 2005).

Diese klare Gliederung bildet sich aber erst während der Gastrulation heraus. Zwar sind die Zellen zu Beginn der Mesodermeinwanderung klar polarisiert, aber die verschiedenen Bereiche der lateralen Membran lassen sich noch nicht eindeutig voneinander trennen. Einige Proteine finden sich aber schon zu diesem Zeitpunkt an bestimmten Bereichen der Zellmembran. Eines der Proteine, das schon deutlich mit den punktförmigen Adhärenzverbindungen und den basalen Verbindungen assoziiert, ist Armadillo (Müller *et al.* 1996). Auch Bazooka beginnt sehr früh, sich im Bereich der apikalen lateralen Membran anzureichern (Tepass *et al.* 2001; Harris *et al.* 2004).

1.8 Modell zur Steuerung der Mesodermeinwanderung

Aufgrund der bisherigen Untersuchungen zur Invagination des Mesoderms geht man von folgendem Modell zur Einwanderung des Mesoderms aus. Twist aktiviert die Expression von Fog in mesodermalen Zellen. Fog wird sekretiert und aktiviert in den mesodermalen Zellen einen bisher unbekanntem Rezeptor. Dies aktiviert einen Signalweg über Concertina, RhoGEF2, RhoA und Drok, der zur apikalen Akkumulation von Myosin führt. Myosin interagiert mit Aktin und führt zur Kontraktion der mesodermalen Zellen an der apikalen Seite (Dawes-Hoang *et al.* 2005). Die Zellen des Mesoderms formen eine Ventralfurche und invaginieren. Verschiedene Ergebnisse weisen darauf hin, dass weitere Proteine an der Regulation der Ventralfurche beteiligt sein müssen: *twist*-mutante Embryonen und Embryonen von Müttern mit Keimbahnklonen für *RhoGEF2* zeigen eine deutlich stärkere Störung der Mesoderminvagination als *fog*-mutante Embryonen oder Embryonen von homozygot *concertina*-mutanten Müttern. In *fog*-mutanten Embryonen ist die Menge an Myosin, die an der apikalen Membran der Zellen lokalisiert, reduziert. In Embryonen von Müttern mit Keimbahnklonen für *RhoGEF2* dagegen findet keine apikale Lokalisation von Myosin statt.

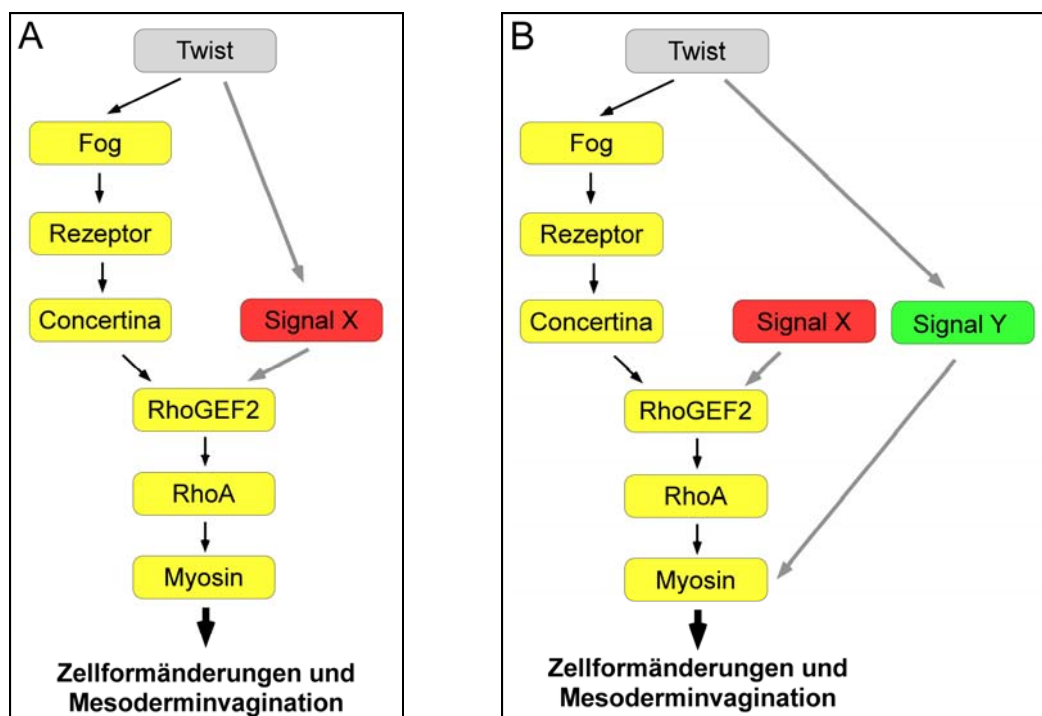


Abbildung 1.9: Modell zur Steuerung der Mesoderminvagination (Details siehe Text)

Es muss folglich ein zweites Signal zur apikalen Lokalisation von Myosin geben, das unabhängig von Fog/Concertina ist und auf der Höhe von RhoGEF2 mit dem Fog/Concertina-Signalweg zusammenläuft. Außerdem muss es weitere von Twist aktivierte Gene geben, die die Mesoderminvagination steuern. Ob es ein Signal X ist, das von Twist reguliert wird und die apikale Akkumulation von RhoGEF2 steuert (Abbildung 1.9, A) oder ob es sich um 2 voneinander trennbare Signale X und Y handelt (Abbildung 1.9, B), ist unklar.

1.9 Ziel der vorliegenden Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten weitere Gene identifiziert und charakterisiert werden, die an der Regulation der Zellformveränderungen während der Mesoderminvagination beteiligt sind. In einem vorangegangenen Defizienzen-Screen wurde unter anderem für die Defizienz *Df(3R)TP* gezeigt, dass diese Gene deletiert, die in der Mesodermentwicklung eine Rolle spielen. Daher sollten die Gene identifiziert und charakterisiert werden, die in dieser Defizienz deletiert sind und deren Verlust zu einer Störung der Invagination des Mesoderms führt.

2 Ergebnisse

2.1 Defizienz $Df(3R)Tl^P$

In einem Defizienzen-Screen wurden Regionen im Genom von *Drosophila melanogaster* identifiziert, in denen Gene liegen, die an der Mesodermentwicklung beteiligt sind (Seher *et al.* 2000; Seher 2004). Unter anderem konnte für die Defizienz $Df(3R)Tl^P$ gezeigt werden, dass diese Gene deletiert, die wichtig sind für die Invagination des Mesoderms. Embryonen, homozygot für diese Defizienz, zeigten eine Verzögerung in der Einwanderung des Mesoderms, wie anhand von Antikörperfärbungen gegen Twist gezeigt werden konnte. Zusätzlich verlief die Einwanderung unkoordinierter als im Wildtyp (Seher 2004, Abbildung 2.1).

Die Defizienz $Df(3R)Tl^P$ deletiert etwa 1 Mb genomischer DNA im Bereich 97-98 des 3. Chromosoms (Abbildung 2.4).

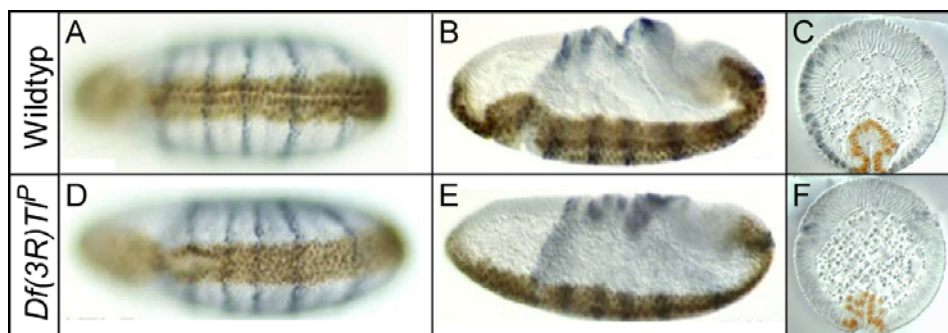


Abbildung 2.1: Phänotyp von Embryonen, die homozygot defizient sind für $Df(3R)Tl^P$ (modifiziert nach Seher 2004)

Antikörperfärbungen an Wildtypembryonen und Embryonen, die homozygot defizient für $Df(3R)Tl^P$ sind (braun: anti-Twist, blau: anti-Eve). (A-C) Wildtyp, spätes Stadium 6, jeweils ventrale Ansicht, lateraler optischer Schnitt und Querschnitt, (D-E) Embryo homozygot defizient für $Df(3R)Tl^P$, vergleichbares Stadium wie der Wildtyp, ebenfalls ventrale Ansicht, lateraler optischer Schnitt und Querschnitt. In Embryonen, die homozygot für $Df(3R)Tl^P$ sind, war die Einwanderung des Mesoderms verzögert und verlief unkoordinierter.

2.2 Compound-Kreuzungen

Im Bereich der Defizienz $Df(3R)Tl^P$ liegen Gene, von denen bekannt ist, dass sie an der Festlegung der dorso-ventralen Achse im Embryo beteiligt sind: *Toll*, *spätzle* und *pelle* (Morisato *et al.* 1995). Bei diesen drei Genen handelt es sich um maternal-kontrollierte Gene. Das heißt, dass die Gene vom mütterlichen Genom transkribiert werden, die mRNA im Embryo deponiert und translatiert wird. Somit ist die Expression dieser maternal-kontrollierten Gene unabhängig vom Genotyp des Embryos und wird allein durch die Allele determiniert, die in der Mutter vorhanden sind. Um zu testen, ob die beobachteten Defekte während der Gastrulation durch das Fehlen maternal-kontrollierter Gene verursacht werden, wurden Männchen mit der Defizienz mit so genannten Compound-Weibchen gekreuzt (Merrill *et al.* 1988). Bei diesen Fliegen sind die beiden linken und die beiden rechten Chromosomenarme verknüpft und nicht wie normalerweise rechter und linker Chromosomenarm. Dadurch kommt es in der Meiose zu einer anderen Chromosomenverteilung als im Wildtyp (Abbildung 2.2).

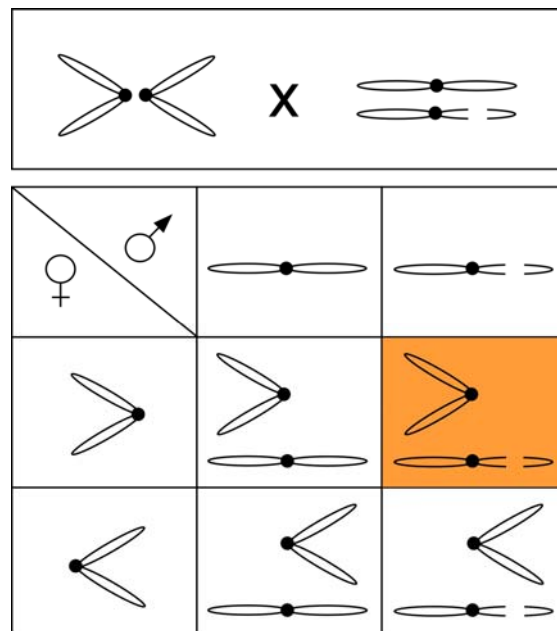


Abbildung 2.2: Kreuzungsschema: Compound-Weibchen gegen Männchen der Defizienz $Df(3R)Tl^P$

Compound-Weibchen haben eine abnormale Chromosomenverteilung in der Meiose. Kreuzt man diese Weibchen mit Männchen, die eine Deletion für einen bestimmten Bereich des Genoms tragen, kann man Nachkommen kreieren, die wildtypisch für maternal-kontrollierte Gene sind, aber zygotisch homozygot defizient für den Bereich der Defizienz (orange).

Kreuzt man diese Fliegen nun gegen einen Fliegenstamm mit einer Defizienz, kann eine genetische Situation kreierte werden, in der die Mutter einen vollständigen Chromosomensatz hat, ein Viertel der Embryonen aber homozygot defizient ist für den Bereich der Deletion (orange in Abbildung 2.2). Mit Hilfe dieser Fliegen kann untersucht werden, ob ein beobachteter Effekt auf maternal-kontrollierte Gene zurückzuführen ist oder nur durch zygotische Komponenten entsteht.

Um die Embryonen untersuchen zu können, wurden Antikörperfärbungen gegen Twist (Roth *et al.* 1989) und Evenskipped (Frasch *et al.* 1987) durchgeführt. Mit der Färbung gegen Twist sollte hier, wie auch im Folgenden, das Mesoderm sichtbar gemacht werden, die Färbung gegen Evenskipped diente als Marker für das Alter der Embryonen (Seher 2004).

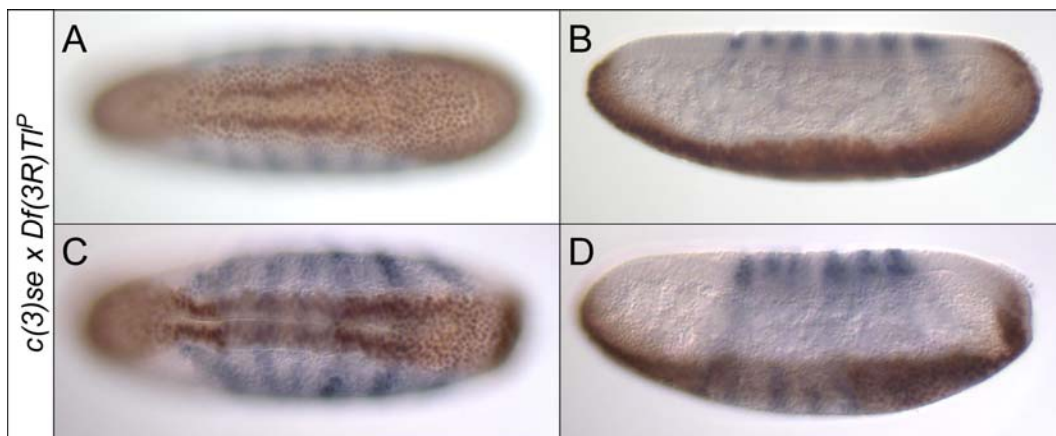


Abbildung 2.3: Phänotyp der Embryonen aus der Kreuzung der Compound-Weibchen mit $Df(3R)Tl^P$

Antikörperfärbungen an Embryonen aus der Kreuzung von $Df(3R)Tl^P$ mit Compound-Müttern (braun: anti-Twist, blau: anti-Eve). (A, B) Stadium 5 (C, D) Stadium 6. (A, C) ventrale Ansicht (B, D) lateraler optischer Schnitt. Etwa ein Viertel der Embryonen aus dieser Kreuzung zeigte deutliche Defekte während der Mesoderm-Invagination. Die beobachteten Defekte sind folglich auf ein zygotisch aktives Gen zurückzuführen und nicht auf einen maternalen Effekt.

Die Analyse der Embryonen aus dieser Kreuzung ergab, dass es sich um einen rein zygotischen Effekt handelt, da in den Embryonen eine ebenso starke Störung der Invagination zu beobachten war, wie in Embryonen homozygot für $Df(3R)Tl^P$ (Abbildung 2.3). Da die Mütter aus diesen Kreuzungen jedoch ein vollständiges Genom haben, muss es ein zygotisch aktives Gen sein oder eine Kombination zygotisch aktiver Gene, die bei Ausfall die beobachteten Störungen während der Mesoderm-Invagination verursachen.

2.3 Kartierung von kleineren Defizienzen in der Region 97D

Um den Bereich einzugrenzen, in dem das Gen oder die Gene liegen, die wichtig sind für die Invagination, wurden weitere, kleine Defizienzen in dem Bereich von *Df(3R)TI^P* auf Defekte in der Ventralfurchebildung hin analysiert und deren genaue Bruchpunkte anhand von Single-Embryo-PCR bestimmt (Abbildung 2.4).

2.3.1 Phänotypische Analyse der Defizienzen

Verschiedene überlappende Defizienzen wurden auf Störungen in der Einwanderung des Mesoderms untersucht. Dazu wurden Embryonen mit Antikörpern gegen Twist und Evenskipped gefärbt und die Mesodermeinwanderung untersucht.

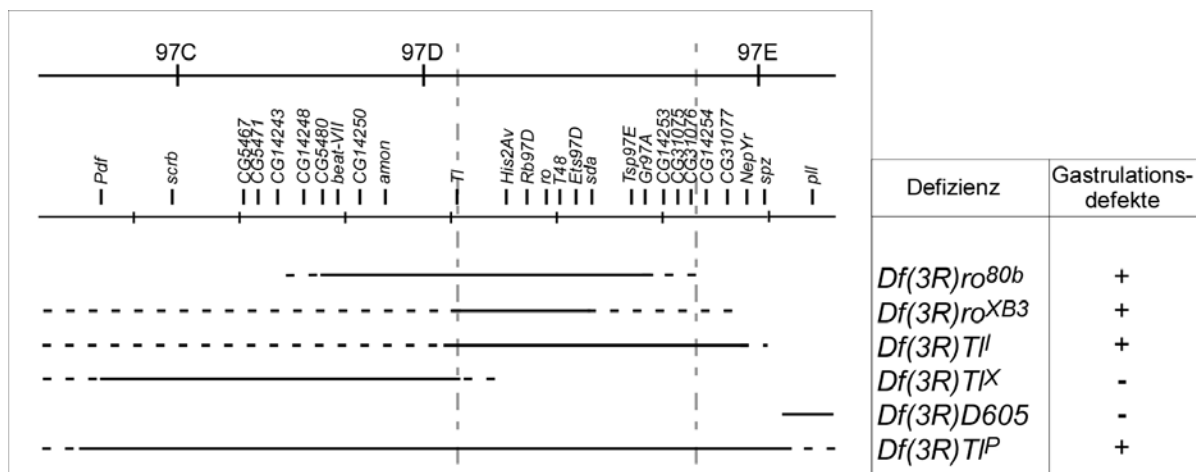


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Region, die in *Df(3R)TI^P* deletiert ist

Dargestellt sind der zytogenetische Bereich, der in der Defizienz *Df(3R)TI^P* deletiert ist, einige Gene in diesem Bereich und die kleineren Defizienzen, die für die Kartierung verwendet wurden. Durchgezogene Linien markieren den Bereich der Defizienzen, der deletiert ist, gestrichelte Linien markieren den Bereich, für den nicht eindeutig klar ist, ob er deletiert ist. Defizienzen, deren Embryonen Defekte während der Gastrulation aufwiesen, sind in der rechten Spalte mit „+“ markiert. Die senkrechten gestrichelten Linien grenzen den Bereich ab, der durch die Kartierung ermittelt wurde und das Gen oder die Gene enthält, die bei Ausfall zu Störungen in der Mesoderminvagination führen.

Dabei zeigte sich, dass Embryonen homozygot für einige der untersuchten Defizienzen, wie Defizienz *Df(3R)ro^{80b}*, *Df(3R)ro^{XB3}* und *Df(3R)TI^I*, ebenfalls Störungen in der Mesoderminvagination aufwiesen. Die Phänotypen waren vergleichbar mit dem beobachteten Phänotyp in *Df(3R)TI^P*-homozygoten Embryonen (Abbildung 2.5, A-D). In Embryonen von anderen Defizienzen jedoch verlief die

Einwanderung des Mesoderms wie im Wildtyp, wie in *Df(3R)TI^X* und *Df(3R)D605* (Abbildung 2.5, E-H).

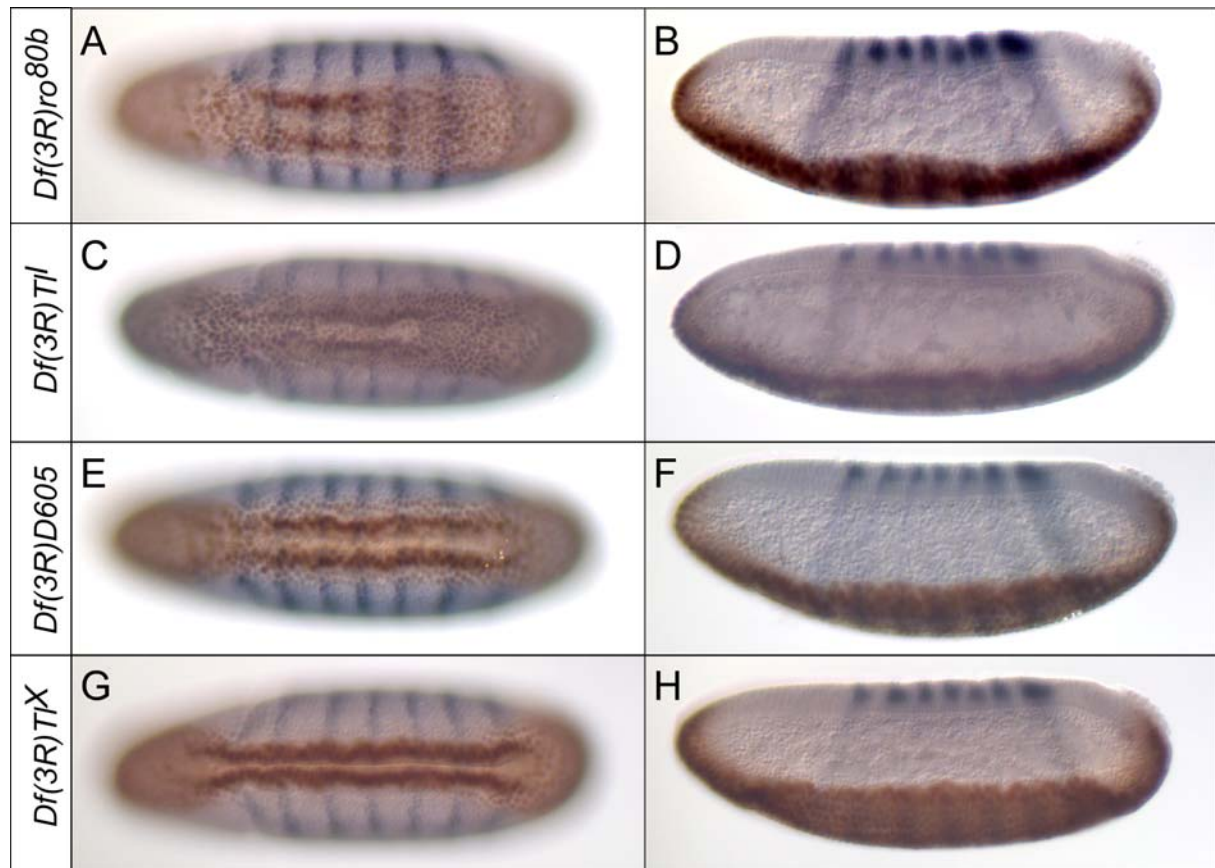


Abbildung 2.5: Phänotypen von Embryonen der kleinen Defizienzen

Antikörperfärbungen an Embryonen verschiedener kleiner Defizienzen etwa im gleichen Stadium (braun: anti-Twist, blau: anti-Eve). (A, B) Embryonen homozygot für *Df(3R)ro^{80b}*. (C, D) Embryonen homozygot für *Df(3R)TI^I*. (E, F) Embryonen homozygot für *Df(3R)D605*. (G, H) Embryonen homozygot für *Df(3R)TI^X*. (A, C, E, G) ventrale Ansicht. (B, D, F, H) lateraler optischer Schnitt. Embryonen der Defizienzen *Df(3R)ro^{80b}* und *Df(3R)TI^I* zeigten vergleichbare Defekte während der Gastrulation wie *Df(3R)TI^P*. Die Invagination des Mesoderms war verzögert und verlief unkoordiniert im Vergleich zu Wildtypembryonen. Embryonen der Defizienzen *Df(3R)D605* und *Df(3R)TI^X* zeigten keine Störungen der Mesoderminvagination. Hier verlief die Invagination des Mesoderms wie im Wildtyp.

2.3.2 Single-Embryo-PCR

Da bei keiner der verwendeten Defizienzen die Bruchpunkte eindeutig bekannt waren, war eine exakte Bestimmung der Bruchpunkte notwendig, um den Bereich von Interesse möglichst genau eingrenzen zu können. Dazu wurden Embryonen der Defizienzen mit anti-Twist gefärbt und Embryonen mit Gastrulationsdefekten selektioniert. Von diesen einzelnen Embryonen wurde DNA isoliert und mittels PCR

auf das Vorhandensein der Gene im Bereich der bekannten Bruchpunkte getestet. So konnten für einige Defizienzen genauere Bereiche für die Bruchpunkte bestimmt werden (Zusammenfassung siehe Tabelle 1)

Für Defizienz *Df(3R)ro^{80b}* konnten die Bruchpunkte am genauesten bestimmt werden (Abbildung 2.6). Der proximale Bruchpunkt liegt zwischen *CG14243* und *CG5480*, der distale Bruchpunkt liegt zwischen *Tsp97E* und *CG14254*. Diese Defizienz deletiert also etwa einen Bereich von 350 kb. Embryonen homozygot für diese Defizienz zeigten Störungen in der Invagination des Mesoderms (Abbildung 2.5, A und B).

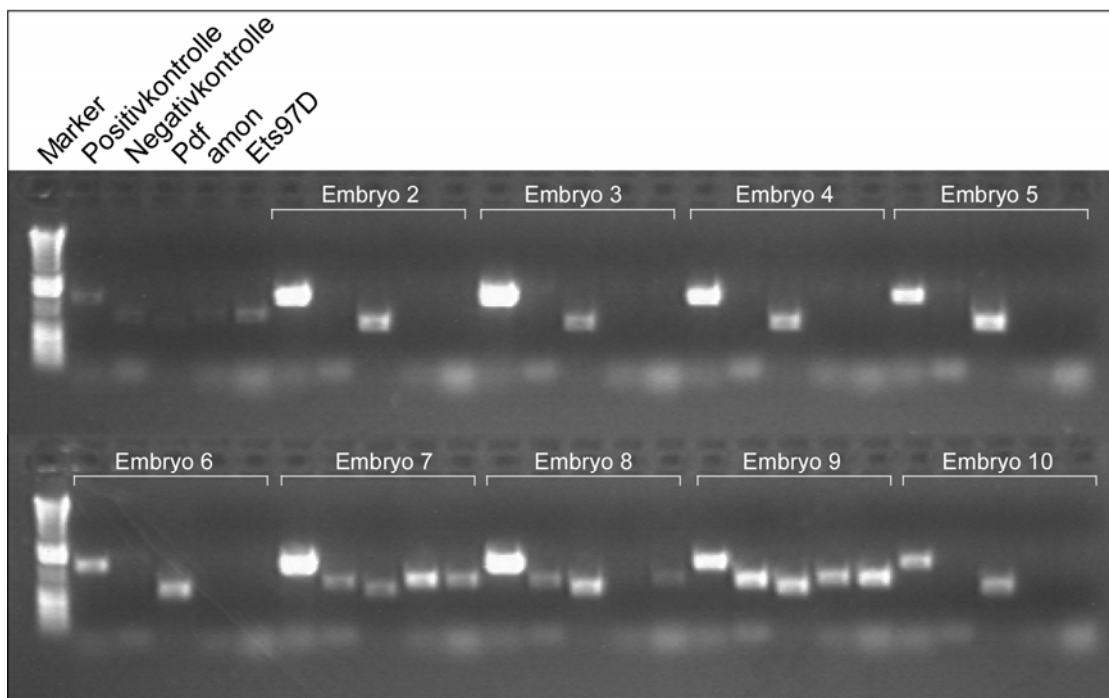


Abbildung 2.6: Single-Embryo-PCR an *Df(3R)ro^{80b}*

Für die Single-Embryo-PCR an Embryonen von *Df(3R)ro^{80b}* wurden als Positivkontrolle Primer für *CG11929*, und als Negativkontrolle Primer für *Tl* verwendet. Hier wurden folgende Gene auf Vorhandensein geprüft: *Pdf*, *amon* und *Ets97D*. Das Gelbild zeigt, dass Embryonen 2-6 und 10 homozygot defizient sind, da hier die Primer für die Negativkontrolle kein Produkt lieferten. In diesen Embryonen ist *Pdf* nicht deletiert, aber die Gene *amon* und *Ets97D* sind deletiert, da sich hier in der PCR-Reaktion ebenfalls keine Produkte ergaben. Die Embryonen 1 und 7-9 dagegen sind nicht homozygot defizient, hier lieferten alle Primerkombinationen in der PCR-Reaktion ein Produkt, auch die Negativkontrolle.

Für *Df(3R)TI^X* war schon vorher gezeigt worden, dass der distale Bruchpunkt in *Toll* liegt (Hashimoto *et al.* 1988). Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Da Embryonen homozygot für diese Defizienz jedoch keine Defekte in der

Gastrulation aufwies (Abbildung 2.5, G und H), ließ sich durch Kombination mit den Daten von *Df(3R)ro^{80b}* der Bereich, in dem das Gen, welches verantwortlich für die Störungen in *Df(3R)TI^P* ist, auf etwa 180 kb zwischen den Genen *Toll* und *CG14254* (Abbildung 2.4) eingrenzen.

Defizienzen	Bruchpunkte (Flybase)	Gastrula- tions- defekte	deletiert Flybase (schwarz) diese Arbeit (rot)	nicht deletiert Flybase (schwarz) diese Arbeit (rot)
<i>Df(3R)TI^P</i>	97A; 98A1-2	+	<i>Pdf</i> <i>TI</i> <i>scrib</i> <i>spz</i>	<i>Rb97D</i> <i>pII</i>
<i>Df(3R)TI^X</i>	97B; 97D1-2	-	<i>Pdf</i> <i>TI</i> <i>scrib</i> <i>spz</i> (?)	<i>His2Av</i> <i>Rb97D</i> <i>Pll</i> <i>ro</i> (Komplementation mit <i>Df(3R)CC1.2</i>) <i>T48</i> (in situ)
<i>Df(3R)TI^I</i>	97B; 97E2-11	+	<i>TI</i> <i>Rb97D</i> <i>spz</i>	
<i>Df(3R)ro^{80b}</i>	97D1; 97D13	+	<i>scrib</i> (?) <i>amon</i> (PCR) <i>TI</i> <i>His2Av</i> <i>ro</i> <i>Ets97D</i> <i>Ets97D</i> (PCR) <i>Tsp97E</i> (PCR) <i>CG5480</i> (PCR)	<i>Pdf</i> (PCR) <i>scrib</i> (PCR) <i>spz</i> (Komplementation) <i>CG14254</i> (PCR) <i>CG5471</i> (PCR) <i>CG31077</i> (PCR) <i>CG14243</i> (PCR)
<i>Df(3R)ro^{XB3}</i>	97D2; 97D9	+	<i>His2Av</i> <i>TI</i> <i>ro</i> <i>T48</i> <i>Rb97D</i>	<i>TI</i> (PCR) Bruchpunkt in <i>TI</i> ?
<i>Df(3R)D605</i>	97E3; 98A5	-	<i>pII</i>	<i>spz</i>

Tabelle 1: Zusammenfassung der Kartierung der kleineren Defizienzen im Bereich 97D

Informationen von Flybase sind in schwarz dargestellt, Ergebnisse dieser Arbeit sind rot markiert.

2.4 Defizienz *Df(3R)CC1.2*

Einen kleinen Bereich dieser 180 kb deletiert die Defizienz *Df(3R)CC1.2* (Strutt *et al.* 1994, Abbildung 2.4). Diese Defizienz war durch die Exzision eines P-Elementes im 3. Exon des *rough*-Gens in der Fliegenlinie *ro⁷¹³* generiert worden (Tomlinson *et al.* 1988; Strutt *et al.* 1994). Fliegen der Defizienz sind homozygot lebensfähig und fertil. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass in dieser Defizienz das Gen *rough* deletiert ist, was zu rauen Augen in den Fliegen führt. Desweiteren ist der 5'-Bereich von *T48* deletiert (Strutt *et al.* 1994).

2.4.1 Phänotypische Analyse

Um zu bestimmen, ob diese Defizienz Gene deletiert, die an der Mesoderminvagination beteiligt sind, wurden auch hier Embryonen phänotypisch anhand von Antikörperfärbungen gegen Twist und Evenskipped analysiert.

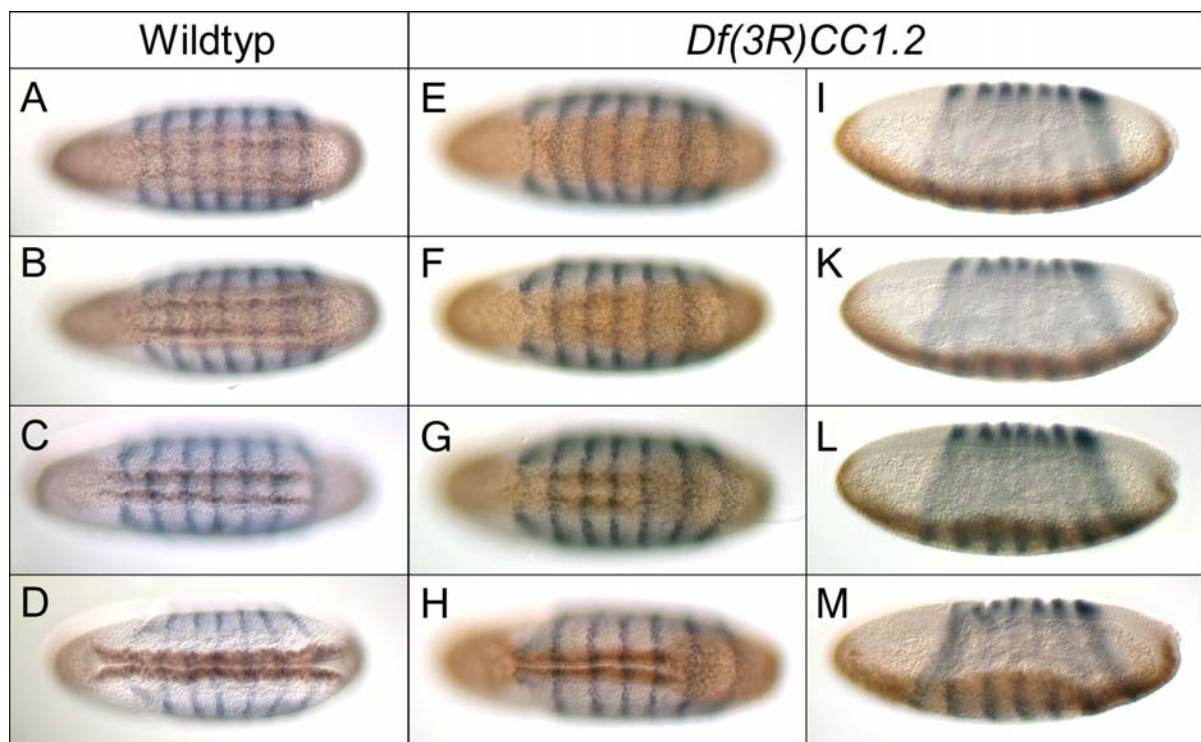


Abbildung 2.7: Phänotyp von Embryonen der Defizienz *Df(3R)CC1.2*

Antikörperfärbungen an Embryonen von Wildtyp und der Defizienz *Df(3R)CC1.2* (braun: anti-Twist, blau: anti-Eve). (A-D) Wildtypembryonen, ventrale Ansicht, Stadium 5-6. (E-M) Embryonen homozygot defizient für *Df(3R)CC1.2*, jeweils vergleichbare Stadien zum Wildtyp, (E-H) ventrale Ansicht, (I-M) lateraler optischer Schnitt. Embryonen der Defizienz *Df(3R)CC1.2* zeigten deutliche Störungen

während der Gastrulation, vergleichbar mit Embryonen von *Df(3R)Tl^P*. Die Invagination setzte auch hier später ein und verlief nicht gleichmäßig über die gesamte ventrale Seite des Embryos.

Die Untersuchung der Embryonen zeigte, dass die Embryonen eine den *Df(3R)Tl^P*-Embryonen vergleichbare Störung in der Mesoderminwanderung aufwiesen (Abbildung 2.7). Der Beginn der Mesoderminvagination war deutlich verzögert. Während bei Wildtyp-Embryonen die Einwanderung von Kopffalte und Mesoderm etwa gleichzeitig beginnt, zeigten Embryonen der Defizienz zwar eine deutliche Einwanderung der Kopffalte, jedoch noch keine Invagination mesodermaler Zellen (Abbildung 2.7, E und F). Zusätzlich zu der Verzögerung verlief die Invagination unkoordinierter als im Wildtyp. Das Mesoderm wanderte selten gleichmäßig über die gesamte ventrale Seite ein, oft waren besonders in den posterioren Bereichen Unregelmäßigkeiten zu sehen (Abbildung 2.7, G und H; Abbildung 2.8). Am Ende der Gastrulation jedoch gelangten alle Zellen des Mesoderms ins Innere des Embryos. Embryonen homozygot für die Defizienz *Df(3R)CC1.2* zeigten keine Störungen in der Invagination des Mitteldarmprimordiums. Die weitere Entwicklung verlief ohne sichtbare Defekte, abgesehen von den rauen Augen, verursacht durch die Deletion der Gens *rough* (Tomlinson *et al.* 1988). Fliegen homozygot für diese Defizienz sind lebensfähig.

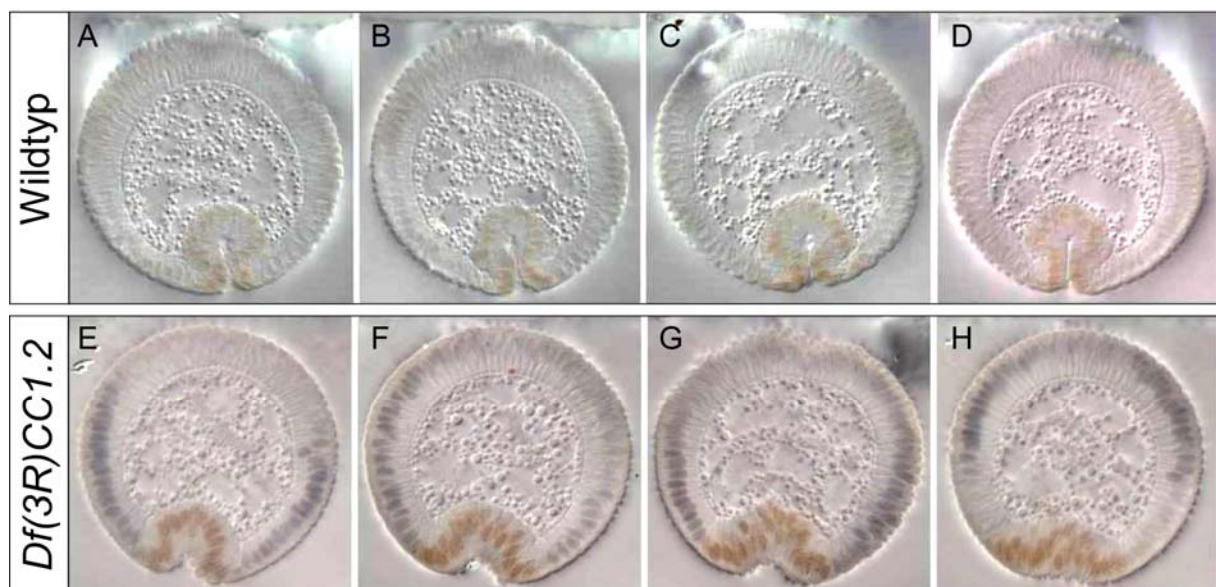


Abbildung 2.8: Querschnitte an Embryonen von Defizienz *Df(3R)CC1.2*

Antikörperfärbungen und Querschnitte von Embryonen von Wildtyp und der Defizienz *Df(3R)CC1.2* in vergleichbaren Stadien, Schnitte in verschiedenen Bereichen von anterior nach posterior (braun: anti-Twist, blau: anti-Eve). (A-D) Wildtypembryonen. (E-H) Embryonen der Defizienz *Df(3R)CC1.2*. Während man im Wildtyp deutlich die Ausbildung eines geordneten Ventralrohrs aus den invaginierten

mesodermalen Zellen entlang des gesamten Embryos sehen kann, fand man dies in Embryonen von *Df(3R)CC1.2* oft nur im anterioren Bereich, während im posterioren Bereich keine koordinierte Invagination stattfand. Im posterioren Bereich schoben sich die Zellen in unkoordinierter Weise in den Embryo, es kam jedoch nicht zur Ausbildung eines Ventralrohrs.

2.4.2 Phänotypische Charakterisierung auf zellulärer Ebene

Während der Gastrulation kommt es zu einer Reihe von Zellformveränderungen im Mesoderm (Leptin *et al.* 1990). Um zu untersuchen, ob Störungen in einem dieser Prozesse vorlagen, wurden Embryonen der Defizienz *Df(3R)CC1.2* mit Antikörpern gegen Neurotactin gefärbt (Abbildung 2.9). Neurotactin ist ein Transmembran-Glykoprotein, das im Bereichen von Zell-Zell-Kontakten lokalisiert (Hortsch *et al.* 1990).

Die Antikörperfärbungen gegen Neurotactin zeigten, dass sich die mesodermalen Zellen von Embryonen homozygot für Defizienz *Df(3R)CC1.2* apikal abflachen (Abbildung 2.9, D; siehe auch Abbildung 2.27, I), so wie es auch im Wildtyp geschieht (Abbildung 2.9, A).

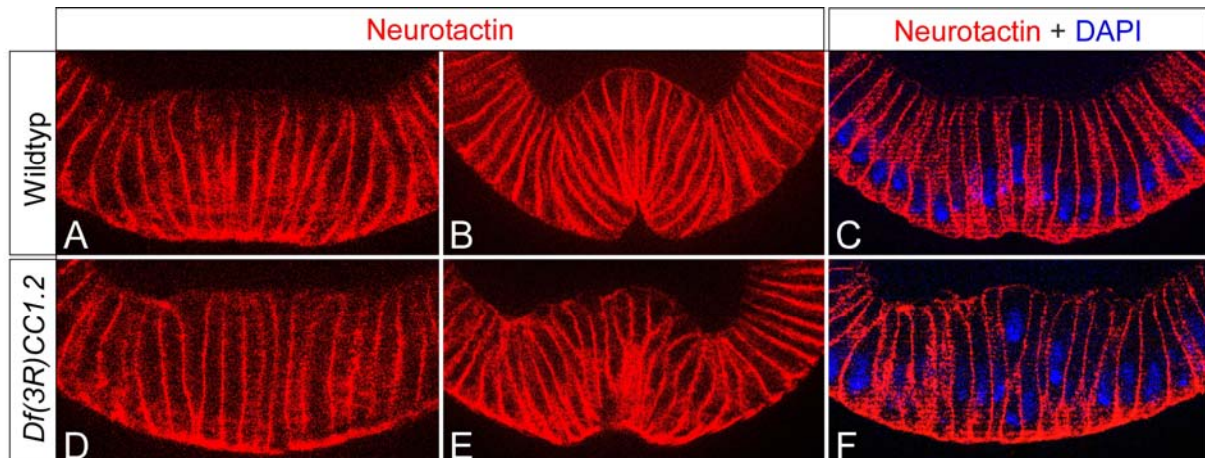


Abbildung 2.9: Querschnitte von Embryonen von Wildtyp und *Df(3R)CC1.2* nach Neurotactin-Antikörperfärbung

(A, B, C) Ventraler Bereich von Querschnitten von Wildtypembryonen, (A) Stadium 5, (B) Stadium 6 (C) spätes Stadium 5. (D-E) Ventraler Bereich von Querschnitten von Embryonen vergleichbarer Stadien von *Df(3R)CC1.2*. Die ventralen Zellen in Embryonen von *Df(3R)CC1.2* flachten sich zwar zwar an der apikalen Seite ab, zogen sich aber apikal nicht oder nur schwach zusammen. Dies war auch in späteren Stadien weniger ausgeprägt als im Wildtyp. Gleichzeitige DAPI-Färbung verdeutlichte dies, da auch die Kerne nicht ihre normale Position in den Zellen einnahmen.

Während es im Wildtyp im Folgenden zu einer deutlichen Konstriktion der apikalen Seite der mesodermalen Zellen kam (Abbildung 2.9, A), konnte man in Embryonen homozygot für Defizienz *Df(3R)CC1.2* nur kaum, und wenn, dann stark verzögert apikale Konstriktionen beobachten (Abbildung 2.9, D und F). Die Zellen streckten sich entlang ihrer apiko-basalen Achse, es kam aber aufgrund verminderter oder ganz fehlender apikaler Konstriktionen nicht zur Ausbildung einer geordneten Ventralfurche (Abbildung 2.9, D). Eine gleichzeitige DAPI-Färbung um die Kerne sichtbar zu machen, zeigte, dass auch die Verlagerung der Kerne diese Unregelmäßigkeiten in der Invagination widerspiegelte (Abbildung 2.9, D und F).

In späteren Stadien konnten jedoch in einigen Zellen Konstriktionen beobachtet werden und es kam zur Ausbildung einer Ventralfurche, die jedoch weniger stereotyp und weniger geordnet war, als im Wildtyp (Abbildung 2.9, E). Die Ursache für die Defekte während der Gastrulation in Embryonen der Defizienz *Df(3R)CC1.2* scheint folglich zu sein, dass es nicht zu rechtzeitiger, starker Konstriktion der apikalen Seite der Zellen des prospektiven Mesoderms kommt.

2.4.3 Kartierung

Defizienz *Df(3R)CC1.2* deletiert den Bereich, in dem Gene liegen, die eine Funktion in der Regulation der Mesodermeinwanderung haben (Abbildung 2.10).

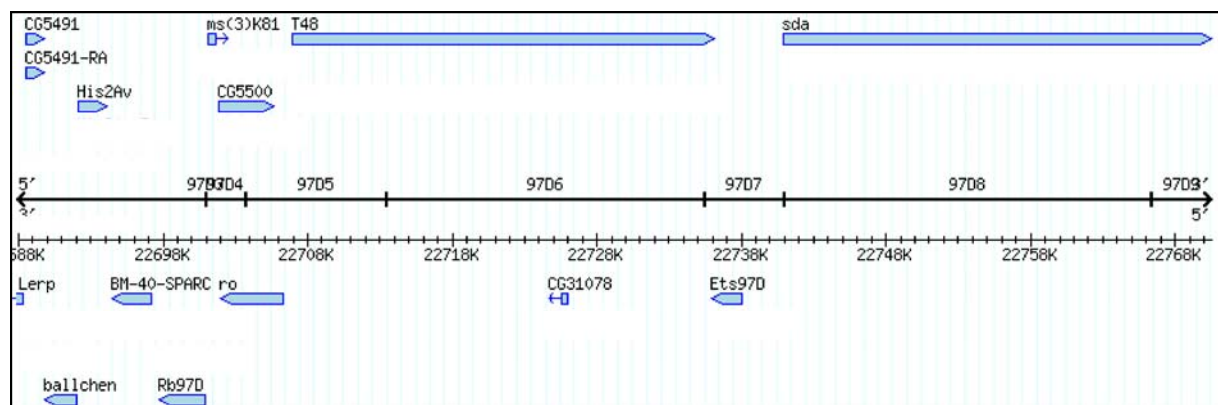


Abbildung 2.10: Zytogenetische Karte der Gene in Bereich von *Df(3R)CC1.2* (modifiziert nach Flybase)

Auch von dieser Defizienz wurden daraufhin die genauen Bruchpunkte bestimmt. Anhand von Single-Embryo-PCR konnte der proximale Bruchpunkt zwischen *CG5500* und *rough*, wahrscheinlich in *rough*, und der distale Bruchpunkt zwischen *T48* und *CG31078*, wahrscheinlich in *T48*, bestimmt werden (Abbildung 2.11).

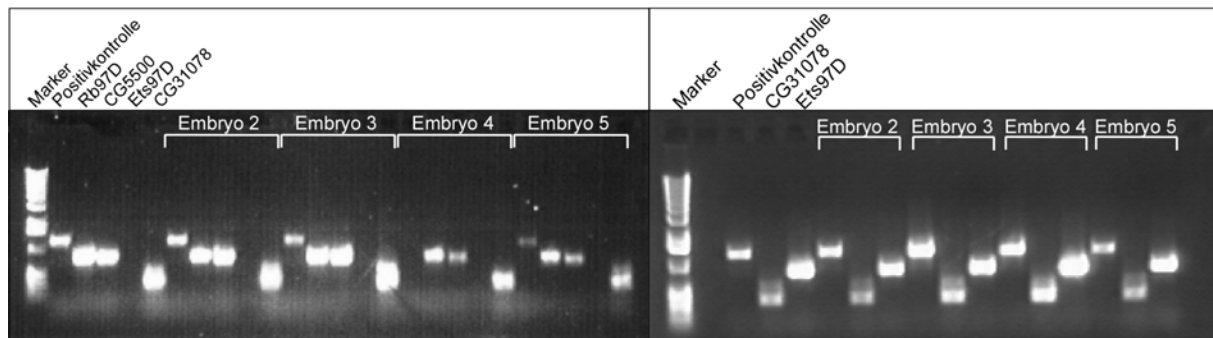


Abbildung 2.11: Single-Embryo-PCR an Embryonen von *Df(3R)CC1.2*

Für die Single-Embryo-PCR an Embryonen von *Df(3R)CC1.2* wurden als Positivkontrolle Primer für *CG11929* verwendet. Eine Negativkontrolle war hier nicht notwendig, da diese Defizienz homozygot war und somit alle Embryonen den gewünschten Genotyp hatten. Folgende Gene wurden auf Vorhandensein geprüft: *CG31078*, *Ets97D*, *Rb97D* und *CG5500*. Die Gene *CG31078*, *CG5500* und *Rb97D* sind nicht deletiert. Anhand der Daten des ersten Tests schien es, dass *Ets97D* deletiert ist, eine weitere PCR-Reaktion ergab jedoch, dass auch *Ets97D* in *Df(3R)CC1.2* nicht deletiert ist. Dies deckte sich mit bekannte Daten über *Df(3R)CC1.2*.

Dies bestätigte frühere Bestimmungen der Bruchpunkte (Strutt *et al.* 1994). Die einzigen deletierten Gene sind somit *rough* und *T48* (Gould *et al.* 1990; Strutt *et al.* 1994). Da *rough* im Mesoderm nicht exprimiert wird, war es wahrscheinlich, dass die Deletion von *T48* zu den beobachteten Störungen führt.

2.4.4 Rettung der Defizienz *Df(3R)CC1.2* durch *T48*-Transgen

Um zu bestätigen, dass die Deletion von *T48* in *Df(3R)CC1.2* zu den beobachteten Effekten führt, wurde ein Transgen für *T48* unter der Kontrolle von konstitutiv aktiven Teilen des *twist*-Promotors (*2xPEe*) in homozygot defiziente Embryonen eingebracht. Dies erlaubte eine spezifische Expression des Transgens von *T48* im Mesoderm (Jiang *et al.* 1991; Jiang *et al.* 1993).

Die Analyse der Embryonen mit dem Genotyp *2xPEeT48/Df(3R)CC1.2* zeigte, dass die Defizienz durch das Einbringen des *T48*-Transgens gerettet werden konnte. Die Gastrulation verlief in Embryonen mit Transgen nahezu wildtypisch (Abbildung 2.12). In sehr wenigen Embryonen waren geringe Umregelmäßigkeiten in der Ventralfurche zu beobachten (Abbildung 2.12, F).

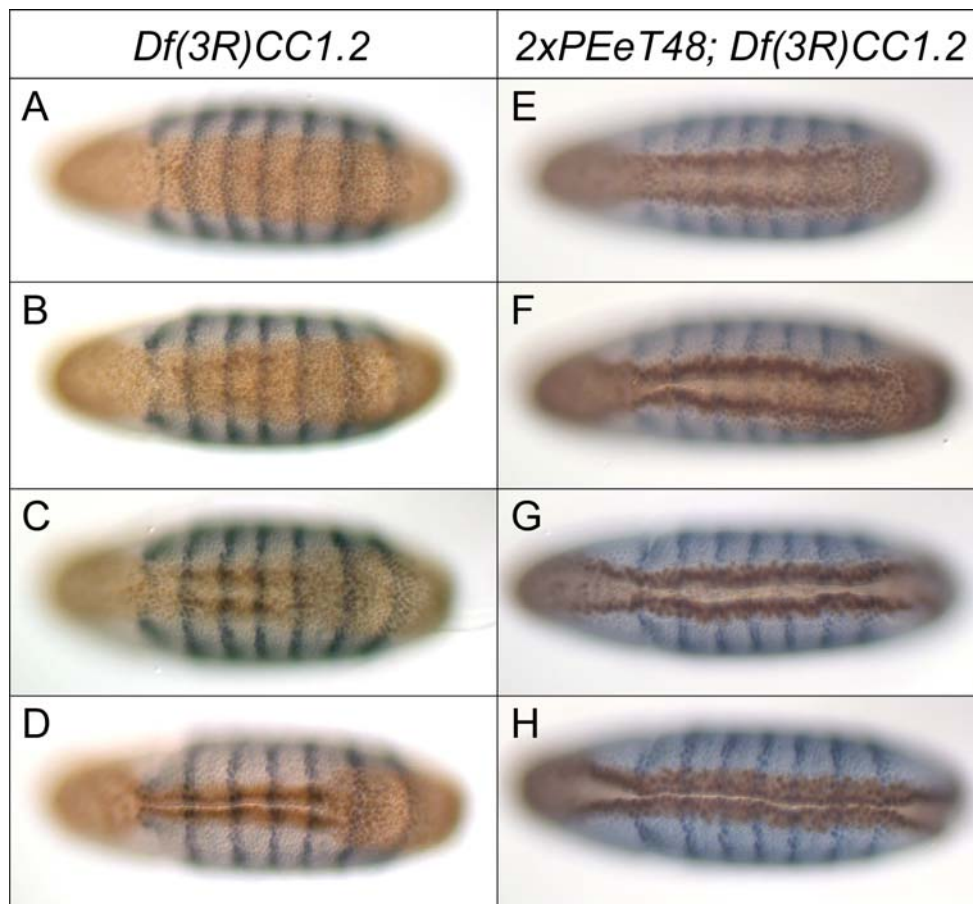


Abbildung 2.12: Rettung von Embryonen der *Df(3R)CC1.2* durch Expression von *T48*

Antikörperfärbungen an Embryonen der Defizienz *Df(3R)CC1.2* und Embryonen homozygot für *Df(3R)CC1.2*, die gleichzeitig ein Transgen von *T48* unter der Kontrolle von Teilen des *twist*-Promotors trugen (braun: anti-Twist, blau: anti-Eve). (A-D) Embryonen von *Df(3R)CC1.2*, Stadium 5-6. (E-H) Embryonen von *Df(3R)CC1.2* mit Transgen für *T48*, Stadien vergleichbar zu A-D. Embryonen, die *T48* im Mesoderm exprimierten, zeigten eine nahezu wildtypische Einwanderung des Mesoderms.

Geringe Verzögerungen und Unregelmässigkeiten in der Invagination (Abbildung 2.12, F und G) könnten darauf zurückzuführen sein, dass die Expression von *T48* in diesen Embryonen nicht unter dem nativen Promotor von *T48*, sondern unter einem konstitutiv aktiven Teil des *twist*-Promotors, spezifisch für das Mesoderm, erfolgte und somit vielleicht vom zeitliche Rahmen oder auch der Expressionsstärke nicht ganz dem Wildtyp entspricht und zu kleineren Störungen während der Gastrulation führen könnte. Diese fielen jedoch deutlich geringer aus, als in Embryonen ohne Transgen, so dass man sagen kann, dass das Fehlen von *T48* in Embryonen der Defizienz *Df(3R)Tf^P* zu den beobachteten Störungen im Mesoderm geführt hat.

2.5 T48

T48 ist als Zielgen von *Ubx* identifiziert worden (Gould *et al.* 1990; Strutt *et al.* 1994). *T48* konnte außerdem als Zielgen des Transkriptionsfaktors *Twist* im prospektiven Mesoderm identifiziert werden (Leptin 1991).

2.5.1 Expression von *T48*

Die mRNA ist ab dem frühen Stadium 5 der Embryonalentwicklung nach der Zellularisierung im Mesoderm detektierbar. Man findet die mRNA im prospektiven Mesoderm, sie ist jedoch klar von den Polen ausgeschlossen (Abbildung 2.13, B). Kurz darauf wird auch eine Expression im Ektoderm sichtbar. In der weiteren Embryonalentwicklung findet sich die mRNA in Teilen des Mesoderms, der Epidermis und in Vorder- und Hinterdarm (Strutt *et al.* 1994).

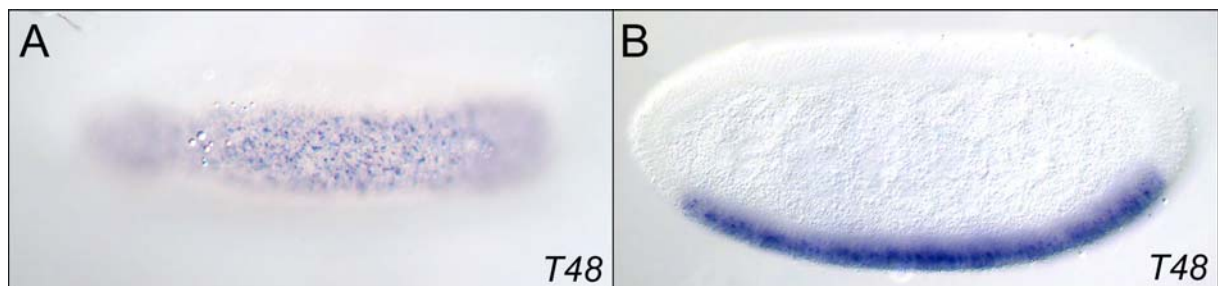


Abbildung 2.13: Expression von *T48* im prospektiven Mesoderm

In situ Hybridisierung gegen *T48* an Wildtypembryonen (A) ventrale Ansicht, (B) lateraler optischer Schnitt. *T48* wird im prospektiven Mesoderm exprimiert.

2.5.2 Struktur von *T48*

T48 kodiert für ein Protein mit 419 Aminosäuren. Funktionen für *T48* waren bisher nicht bekannt. Strukturmodelle auf Proteinebene sollten Hinweise auf mögliche Funktionen geben. Das Protein hat ein Signalpeptid am N-Terminus, eine putative Transmembrandomäne, die das Protein in einen kleineren extrazellulären und einen größeren intrazellulären Bereich gliedert, und ein PDZ-Bindemotiv am C-Terminus (Abbildung 2.14).

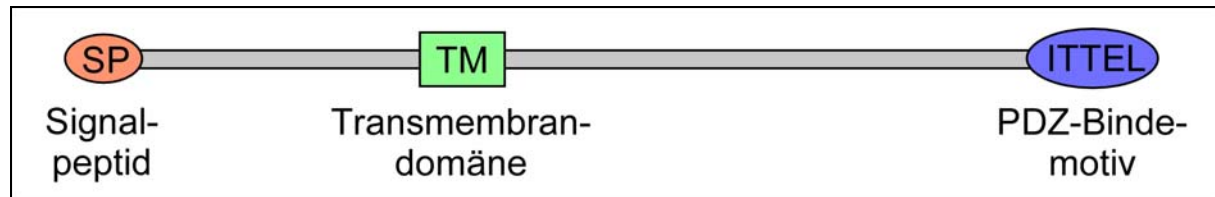


Abbildung 2.14: Struktur von T48

T48 besitzt ein Signalpeptid am N-Terminus, eine Transmembrandomäne und ein PDZ-Bindemotiv am C-terminalen Ende.

2.5.3 Homologe Proteine

Bei *T48* scheint es sich nicht um ein konserviertes Gen zu handeln. Homologe Proteine lassen sich nur bei den Diptera finden, z.B. in *D. pseudoobscura* und *Anopheles gambiae*.

			1	Signalpeptid	60
T48 Dm	(1)	MRSVEVAQSGPSAIFWL	VQVLIVGAAQAATPFAKEYR	NAGLYNGNTLVLDLGGSTFLDM	GQ
T48 Dp	(1)	-----IVWL	VLMVAGAAQAATPFAKEYR	SAGL	FKGNTLVLDLGGSTFLDMAM
T48 Ag	(1)	-----	-----	-----	-----
			61		120
T48 Dm	(61)	EKPTSSSSGLS	GGFKSESSV	VLPGLQNSGCF	LTSSSHCLRCNKAGCIKCPMYLVTDTRQ
T48 Dp	(47)	EKPTSSSGLQT	GGFKAESSV	ILPGIHLSSGCP	ASTSSSHCLRCNKAGCIKCPMYLVTDTRQ
T48 Ag	(1)	-----	-----	-----	-----CVRCTDTGCVKCTEVLRI
			121	Transmembrandomäne	180
T48 Dm	(121)	CVDQCFAGYLDQWSA	HTFMRVCFPTGYS	GPLMAALAGLLGGFLVCL	SLLAVALVMLVKR
T48 Dp	(107)	CVDQCFAGYLDQWSA	HTFMRVCFPN	GYSGPLMAALAGLLGGFLVCL	SLLAVALVMLVRR
T48 Ag	(23)	C	LSECFSGYGAQWSTSS	EYMG	RVCHVGMSSFLAAVVGIVAGAILQVVLIFGALAILRR
			181		240
T48 Dm	(181)	KRRRKS	I	KQKLINENTMDRAD	FMRQLNEMRPNAEYFLAMLNDTRRQIRKLYLSGEVAAAAN
T48 Dp	(167)	KRRRKS	V	KQKLINENTMDRAD	FMRQLNEMRPNAEYFLAMLNDTRRQIRKLYLSGEVAAAAN
T48 Ag	(83)	RQ	RKKYRESFIDEN	-IDRLEFLRQLDEL	LRPQAEYFLQMLNDTRRQIRKHLIAGDSAGAA
			241		300
T48 Dm	(241)	SYRPIVRDLAKLLI	LLNRP	IELIPAP	PDWSRLYAWSEQALERYKPQVGQLIDFFQASHG
T48 Dp	(227)	SYRPIVRDLAKLLI	LLNRP	IELIPT	PPHDWSRLHAWSEQALERYKPQVGQLIDFFQASHG
T48 Ag	(142)	T	YHFVVRDLAKI	LILLN	KPIELINAPPHDQRLYVWAEVRLDRYKPELAQLIEFLQPSA
			301		360
T48 Dm	(301)	----	HSAGHHEVLYAAP	NKNKQL	QQSSIFRQQVTP
T48 Dp	(287)	GG--	LRGHQ	EVLYAAFT	KHS--CASIFRHQQVTP
T48 Ag	(202)	SDPR	L	ASDHSTFKSA	SYHQHGGAPGTDLS
			361		420
T48 Dm	(355)	KLHLFGSLISLH	EFEEPR	-----	ASDPFGSSFNTLKS
T48 Dp	(343)	KLHLFGSLISLH	EFEEPR	-----	ASDPFGSSFNTLKS
T48 Ag	(262)	TH	HFLGSLISLH	EFDE	RSSTTDTSSNHSTTG
			421	PDZ-Bindemotiv	
T48 Dm	(387)	GNLISDLNASSLW	LEDEFYKLGFRPQDEITTEL		
T48 Dp	(375)	GNLISDLNASSLW	LEDEFYKLGFRPQDEITTEL		
T48 Ag	(322)	YLST	S	GMNDSSLWLQDEF	FKLGFRPQDEITTEL

Abbildung 2.15: Alignment (AlignX) von T48 aus *Drosophila melanogaster*, *Drosophila pseudoobscura* und *Anopheles gambiae* auf Proteinebene

Alignment der Proteinsequenzen. In gelb markiert sind die konservierten Aminosäuren, außerdem sind die in *Drosophila*-T48 identifizierten Domänen markiert. Die Sequenz von T48 aus *A. gambiae* ist wahrscheinlich im N-terminalen Bereich nicht vollständig. Dm: *Drosophila melanogaster*, Dp: *Drosophila pseudoobscura*, Ag: *Anopheles gambiae*.

Die Sequenzen von *D. melanogaster* und *D. pseudoobscura* sind jedoch fast identisch, abgesehen von einem Bereich im intrazellulären Teil, der eine etwas geringere Homologie zeigt. Auch zu *Anopheles T48* sind große Teile konserviert. Hohe Homologie findet man im intrazellulären Teil, vollständige Homologie zeigt der C-Terminus mit PDZ-Bindemotiv (Abbildung 2.15). Dies könnte auf eine Bedeutung des PDZ-Bindemotives in der Funktion von T48 hinweisen.

2.5.4 Lokalisation in der Zelle

Um zu untersuchen, ob es sich bei T48 um ein Transmembranprotein handelt, wurde ein Konstrukt generiert, in dem T48 durch ein internes HA-Epitop markiert war und darüber detektiert werden konnte. T48HA wurde mit Hilfe des Gal4-UAS-Systems exprimiert (Brand *et al.* 1993; Duffy 2002). Dazu wurde ein Gal4-Treiber unter der Kontrolle des α -Tubulin-Promotors verwendet, der eine maternale Expression des Konstruktes erlaubte und somit zu einer Expression von T48HA im gesamten Blastoderm führte.

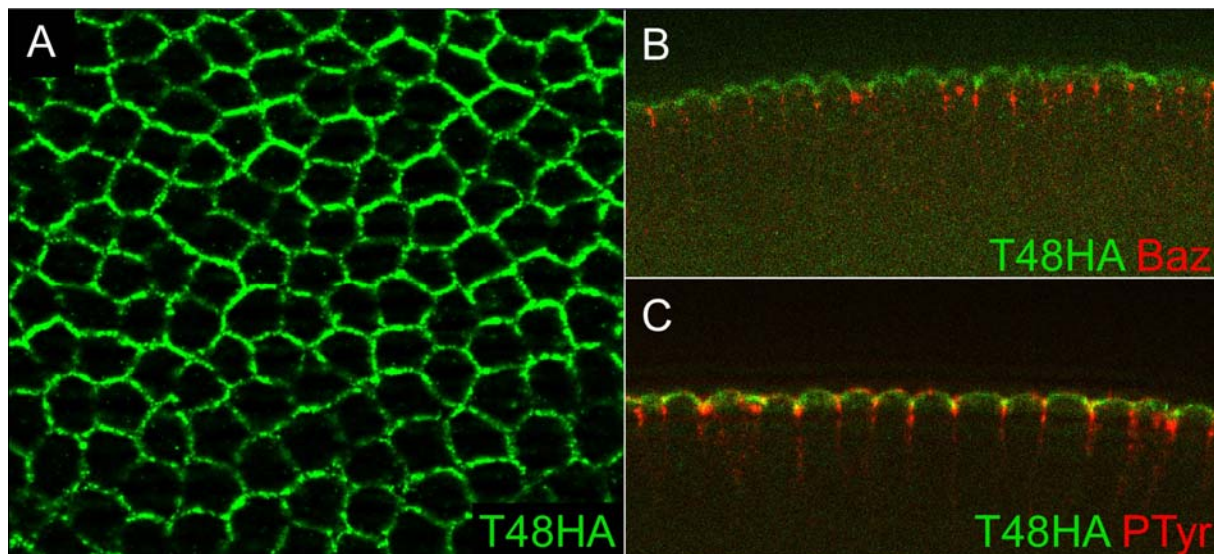


Abbildung 2.16: T48HA-Lokalisation in Blastoderm-Embryonen

(A) Aufsicht auf einen Embryo etwa im Stadium 5, Antikörperfärbung gegen HA. T48HA befand sich an den Membranen der Blastodermzellen. (B) optischer Schnitt durch Zellen des Blastoderms, Antikörperfärbung gegen HA (grün) und Bazooka (rot); T48 befand sich apikal zu Bereichen, die durch Bazooka markiert wurden. (C) optischer Schnitt durch Zellen des Blastoderms, Antikörperfärbung gegen HA (grün) und Phosphotyrosin (rot); T48 befand sich apikal zu Bereichen, die durch Phosphotyrosin markiert wurden, teilweise überlappten die Bereiche apikal. Baz: Bazooka, PTyr: Phosphotyrosin.

Anhand von Antikörperfärbungen gegen HA konnte das Konstrukt detektiert werden (Abbildung 2.16). Eine Analyse der Embryonen zeigte, dass T48HA im Blastoderm eine klare Membranlokalisation zeigt, entweder eine Assoziation mit der Membran oder eine Integration in die Membran, was jedoch in diesem Versuch nicht eindeutig zu klären war (Abbildung 2.16, A). T48HA lokalisierte klar apikal von den Bereichen, die von Bazooka markiert wurden (Abbildung 2.16, B). Bazooka ist ein Bestandteil des Subapikalen Komplexes der Adhärenzverbindungen in späteren Stadien (Müller 2000). Eine teilweise Überlappung von T48HA fand sich mit Bereichen, die durch Phosphotyrosin markiert werden, doch auch hier befand sich T48HA weitgehend apikal dieser Bereiche (Abbildung 2.16, C). Phosphotyrosin markiert vor allem Proteine im Bereich der Adhärenzverbindungen (Takata *et al.* 1988; Tsukita *et al.* 1991; Woods *et al.* 1993; Müller *et al.* 1996; Müller 2000).

2.5.5 Interaktionspartner von T48

T48 besitzt das PDZ-Bindemotiv -ITTEL. PDZ-Bindemotive befinden sich am C-terminalen Ende eines Proteins, bestehen aus den letzten 3-5 Aminosäuren eines Proteins, werden von Proteinen mit PDZ-Domänen gebunden und dienen somit der Proteininteraktion (Kornau *et al.* 1995; Niethammer *et al.* 1996; Harris *et al.* 2001). Die Bezeichnung PDZ kommt von den ersten Proteinen, in denen diese Domänen identifiziert wurden (PSD-95, Dlg und ZO1). Es gibt 2 Gruppen von PDZ-Bindemotiven (Gruppe 1 und 2), abhängig von der Aminosäuresequenz des C-Terminus (Songyang *et al.* 1997). Das Bindemotiv in T48 gehört zur Gruppe 1 der Bindemotive. Auch bei den PDZ-Domänen gibt es verschiedene Gruppen (1a, 1b, 2a, 2b), abhängig von der Art und Position der Aminosäuren innerhalb der Domäne (Songyang *et al.* 1997).

2.5.5.1 L(2)02045

In einem „Hefe-Zwei-Hybrid“-Screen (Giot *et al.* 2003) wurde L(2)02045 als Interaktionspartner von T48 identifiziert. L(2)02045 ist ein Protein mit putativer PDZ-Domäne und aufgrund seiner Sequenz möglicherweise an der Regulation von G-Protein-Signalwegen beteiligt (<http://flybase.bio.indiana.edu>). Um zu untersuchen, ob *l(2)02045* im Mesoderm exprimiert wird, wurden *in situ* Hybridisierungen gegen die mRNA von *l(2)02045* an Wildtypembryonen mit DIG-markierten Sonden durchgeführt

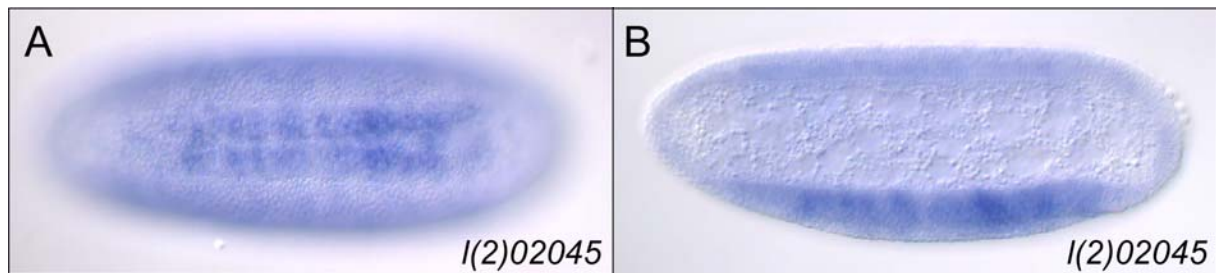


Abbildung 2.17: Expression von *I(2)02045* im prospektiven Mesoderm

In situ Hybridisierung gegen *I(2)02045* an Wildtypembryonen. (A) ventrale Ansicht, (B) lateraler optischer Schnitt. *I(2)02045* wird im prospektiven Mesoderm exprimiert. Die RNA ist detektierbar in einem Streifenmuster im Mesoderm

Es zeigte sich, dass *I(2)02045* im frühen Mesoderm exprimiert ist (Abbildung 2.17). Embryonen, die eine P-Insertion in *I(2)02045* tragen, zeigten keine Störungen in der Mesoderminvagination (nicht gezeigt).

2.5.5.2 RhoGEF2 und Scribbled

Um mögliche weitere Interaktionspartner von T48 zu identifizieren, wurde der Protein-Algorithmus PERLA (Protein Engineering Rotamer Library Algorithm) angewandt (Reina *et al.* 2002, in Zusammenarbeit mit G. J. F. Ballester und L. Serrano). Mit Hilfe dieses Algorithmus können PDZ-Domänen bestimmt werden, die eine hohe Affinität zu einem gegebenen PDZ-Bindemotiv aufweisen. Ausgangspunkt für die Analyse war die dritte PDZ-Domäne von PSD-95 (postsynaptic density protein-95) zusammen mit seinem natürlichen Liganden, dem C-terminalen Peptid von CRIPT (-KQTSV). Die PDZ-Domäne von PSD-95 weist die Struktur einer klassischen PDZ-Domäne auf und wird deshalb als Standard-PDZ-Domäne verwendet. Diese Standard-PDZ-Domäne wurde an Positionen, die wichtig für die Bindung mit dem Liganden sind, mutiert, so dass sich eine stabile Struktur für eine Bindung mit hoher Affinität zwischen PDZ-Domäne und dem Liganden –ITTEL ergab. Mit dieser theoretischen, mit hoher Affinität bindenden PDZ-Domäne wurde dann in *Drosophila* Proteindatenbanken nach entsprechenden Proteinen gesucht und die freien Bindungsenergien für die Interaktion mit T48 ($\Delta\Delta G_i$) anhand von FoldX bestimmt (siehe Material und Methoden). Drei Proteine konnten identifiziert werden, die theoretisch optimal an den C-Terminus von T48 binden: RhoGEF2 (Barrett *et al.* 1997; Häcker *et al.* 1998) (Abbildung 2.18), Scribbled (Bilder *et al.* 2000) und

CG4905. Für RhoGEF2 waren die folgenden Aminosäuren der Standard-PDZ-Domäne mutiert worden: F325M, N326K, I328S, I338V, F340S, I341V, L342K, L379I. Für eine optimale Bindung durch Scribbled und CG4905 wurden folgende Mutationen eingeführt: F325L, N326S, I328K, F340SR, I341I, L342I.

Sowohl Scribbled als auch RhoGEF2 sind maternal-kontrollierte Gene (Barrett *et al.* 1997; Bilder *et al.* 2000). Scribbled spielt eine Rolle bei der korrekten Lokalisierung apikaler Proteine und beim Aufbau der Adhärenzverbindungen in Epithelzellen im Embryo (Bilder *et al.* 2000). RhoGEF2 war besonders interessant, da bereits bekannt war, dass RhoGEF2 eine essentielle Rolle in der Gastrulation spielt: in Embryonen von Müttern mit RhoGEF2-Keimbahnklonen findet keine Gastrulation mehr statt (Barrett *et al.* 1997; Häcker *et al.* 1998).

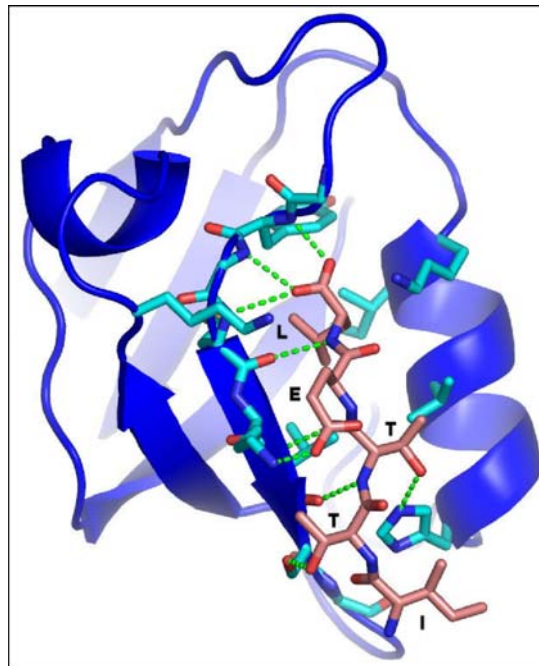


Abbildung 2.18: Computerdiagramm für die Interaktion des C-terminalen PDZ-Bindemotivs von T48 mit der PDZ-Domäne von RhoGEF2

Die PDZ-Domäne von RhoGEF2 ist in blau, der C-Terminus von T48 in rot dargestellt. Wasserstoffbrücken sind in grün markiert (in Zusammenarbeit mit G.J.F. Ballester, L. Serrano)

2.5.6 *In vitro* Untersuchung der möglichen Interaktionspartner von T48

Eine mögliche Interaktion der PDZ-Domänen von RhoGEF2, Scribbled und L(2)02045 mit T48 wurde *in vitro* untersucht. Dazu wurden die PDZ-Domänen der möglichen Interaktionspartner mit einem GST-Epitop fusioniert, in Bakterien exprimiert und mittels GST-Epitop aufgereinigt. Der intrazelluläre Teil von T48 wurde

in vitro transkribiert und unter Zugabe von radioaktiv markiertem Methionin *in vitro* translatiert. Das so markierte T48 wurde mit den GST-Fusionsproteinen der verschiedenen PDZ-Domänen inkubiert, ko-immunopräzipitiert und die Präzipitate mittels SDS-PAGE und Autoradiografie analysiert. Als Positivkontrolle für den Versuchsablauf diente der intrazelluläre Teil von Crumbs, ebenfalls ein Protein mit PDZ-Bindemotiv (Klebes *et al.* 2000), da hier der Interaktionspartner Stardust bekannt war (Bachmann *et al.* 2001).

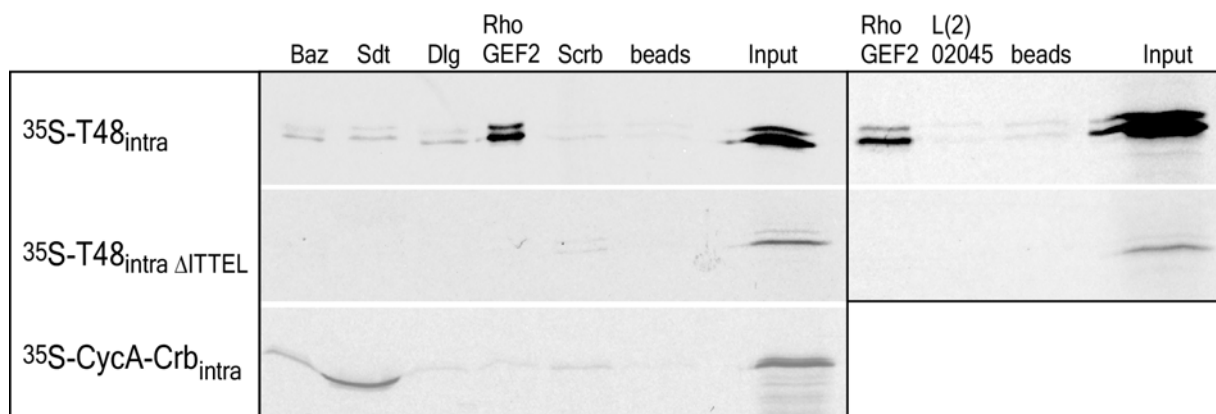


Abbildung 2.19: Autoradiogramm von Ko-Immunopräzipitationen von ^{35}S -T48_{intra} mit verschiedenen PDZ-Proteinen

Autoradiographie der Ko-Immunopräzipitationen von T48_{intra}, T48_{intra}ΔPDZ und CycA-Crb_{intra} mit GST-Fusionsproteinen verschiedener PDZ-Domänen. T48_{intra} ko-immunopräzipitiert nur mit RhoGEF2-PDZ, nicht mit den anderen PDZ-Proteinen. Diese Interaktion ist abhängig vom PDZ-Bindemotiv in T48_{intra}, da eine verkürzte Version von T48_{intra} nicht mehr mit RhoGEF2-PDZ präzipitiert werden kann. Baz: Bazooka-PDZ, Sdt: Stardust-PDZ, RhoGEF2: RhoGEF2-PDZ, Scrb: Scribbled-PDZ.

Die Ko-Immunopräzipitationen zeigten, dass T48_{intra} mit RhoGEF2-PDZ ko-immunopräzipitiert werden konnte (Abbildung 2.19). Die Autoradiographie zeigte bei der Probe, die mit RhoGEF2 inkubiert wurde, zwei deutliche Banden, die T48 repräsentieren.

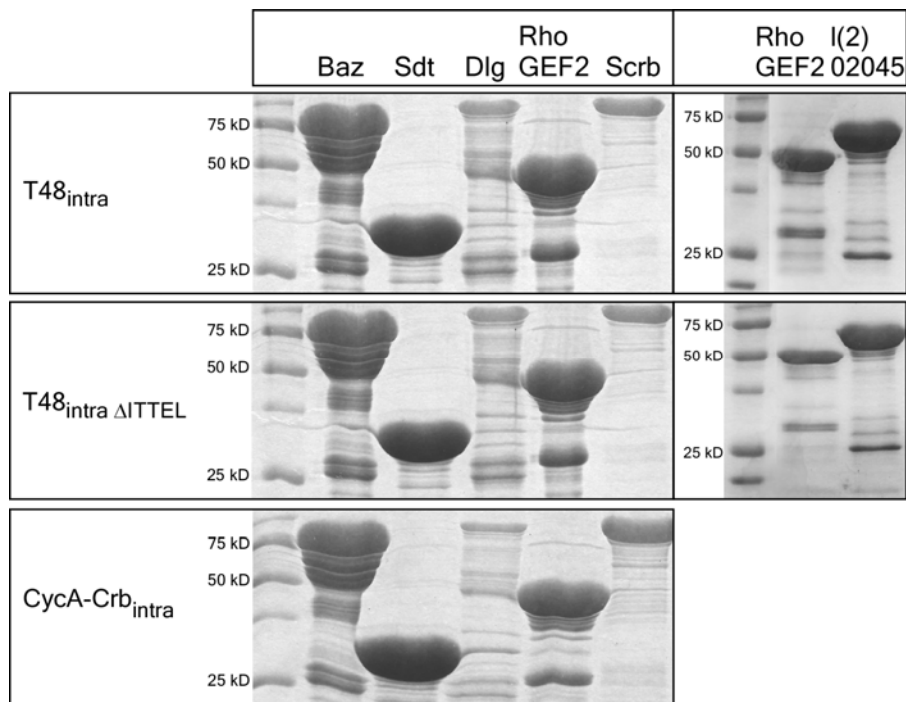


Abbildung 2.20: Coomassie-gefärbtes Gel der Ko-Immunopräzipitationen in Abbildung 2.19

Coomassie-gefärbtes Gel der Ko-Immunopräzipitationen von $T48_{intra}$, $T48_{intra\Delta PDZ}$ und $CycA-Crb_{intra}$ mit GST-Fusionsproteinen verschiedener PDZ-Domänen zur Ermittlung der Proteinmengen nach der Immunopräzipitation. Baz: Bazooka-PDZ, Sdt: Stardust-PDZ, RhoGEF2: RhoGEF2-PDZ, Scr: Scribbled-PDZ.

Bei den anderen PDZ-Proteinen ließ sich im Autoradiogramm nur eine sehr geringe Menge T48 nachweisen. Diese Bande trat auch auf, wenn als Negativkontrolle Matrix, an die kein PDZ-Protein gekoppelt war, mit T48 inkubiert wurden. Dies war somit unspezifisches Binden von T48 an die Matrix. Eine klare Interaktion zeigte sich hier folglich für T48 mit RhoGEF2-PDZ, aber nicht mit Scribbled-PDZ und L(2)02045. Wurde ein verkürztes Konstrukt von T48, dem das Motiv –ITTEL fehlte ($T48_{intra\Delta ITTEL}$), mit den GST-Fusionsproteinen der verschiedenen PDZ-Domänen inkubiert, konnte für keines der PDZ-Proteine T48 in der Autoradiografie detektiert werden (Abbildung 2.19). Auch für RhoGEF2-PDZ konnte in diesem Versuch kein T48 in der Autoradiografie detektiert werden. Die Interaktion von $T48_{intra}$ mit RhoGEF2-PDZ war folglich abhängig vom PDZ-Bindemotiv in T48.

2.5.7 *In vivo* Untersuchung von möglichen Interaktionspartnern

Parallel zu den Ko-Immunopräzipitationen wurden mögliche Interaktionen von PDZ-Proteinen mit T48 in *Drosophila* Schneider S2 Gewebekulturzellen untersucht. Dazu wurden die PDZ-Domänen oder die vollständigen Proteine mit GFP- oder FLAG-Epitop fusioniert und entweder alleine oder in Kombination mit T48HA transient in Schneiderzellen exprimiert und nach Antikörperfärbungen analysiert (Abbildung 2.21, Abbildung 2.22, Abbildung 2.23).

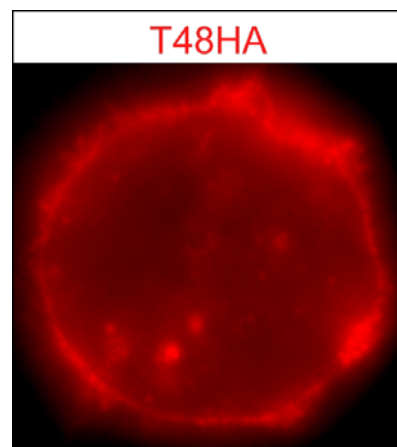


Abbildung 2.21: Expression von T48HA in Schneiderzellen

T48 mit internem HA-Epitop wurde transient in Schneiderzellen exprimiert und mittels Antikörperfärbung gegen HA detektiert. T48HA war in Schneiderzellen größtenteils mit der Membran assoziiert; geringe Mengen des Proteins fanden sich auch in Aggregaten in der Zelle.

T48HA zeigte auch bei der Expression in Schneiderzellen eine deutliche Assoziation mit der Plasmamembran. Allerdings wurde nicht die gesamte Menge an Protein an der Plasmamembran lokalisiert, geringe Mengen befanden sich in Aggregaten in der Zelle (Abbildung 2.21). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die gewählte Transfektionsmethode zu einer starken Überexpression des Proteins führt. Wurde GFP-markiertes RhoGEF2-PDZ, Scribbled-PDZ oder L(2)02045 in Schneiderzellen exprimiert, so fanden sich diese Proteine ebenfalls in Aggregaten in der Zelle (Abbildung 2.22).

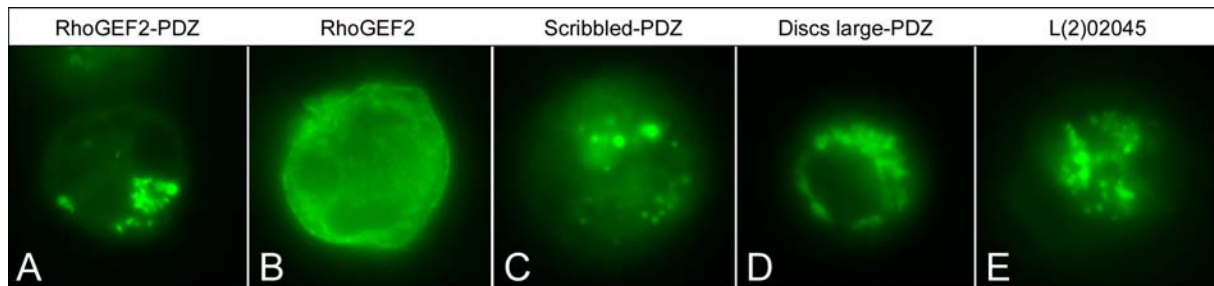


Abbildung 2.22: Expression von PDZ-Proteinen in Schneiderzellen

Gesamte Proteine oder nur die PDZ-Domänen verschiedener Proteine wurden mit GFP oder FLAG-Epitop (nur für RhoGEF2) markiert und transient in Schneiderzellen exprimiert. (A) RhoGEF2-PDZ-GFP, (B) RhoGEF2-FLAG, (C) Scribbled-PDZ-GFP, (D) Discs large-PDZ-GFP, (E) L(2)02045-GFP. RhoGEF2-FLAG befand sich ubiquitär in der Zelle, alle anderen Proteine bildeten Aggregate in der Zelle.

Wurde nun RhoGEF2-PDZ zusammen mit T48HA in Schneiderzellen exprimiert, wurde RhoGEF2-PDZ an die Plasmamembran rekrutiert (Abbildung 2.23, A-C).

Für Scribbled, Discs large und L(2)02045 konnte eine solche Rekrutierung an die Plasmamembran bei Ko-Expression mit T48HA nicht beobachtet werden (Abbildung 2.23, G-M). Die Rekrutierung von RhoGEF2-PDZ zur Plasmamembran durch T48HA war abhängig vom PDZ-Bindemotiv in T48. Bei Ko-Expression von RhoGEF2-PDZ mit einem verkürzten T48HA-Protein, dem das Motiv -ITTEL fehlte (T48HA Δ ITTEL), welches aber ebenfalls an der Plasmamembran lokalisiert wurde, ließ sich keine Membranrekrutierung von RhoGEF2-PDZ feststellen (Abbildung 2.24, A-C).

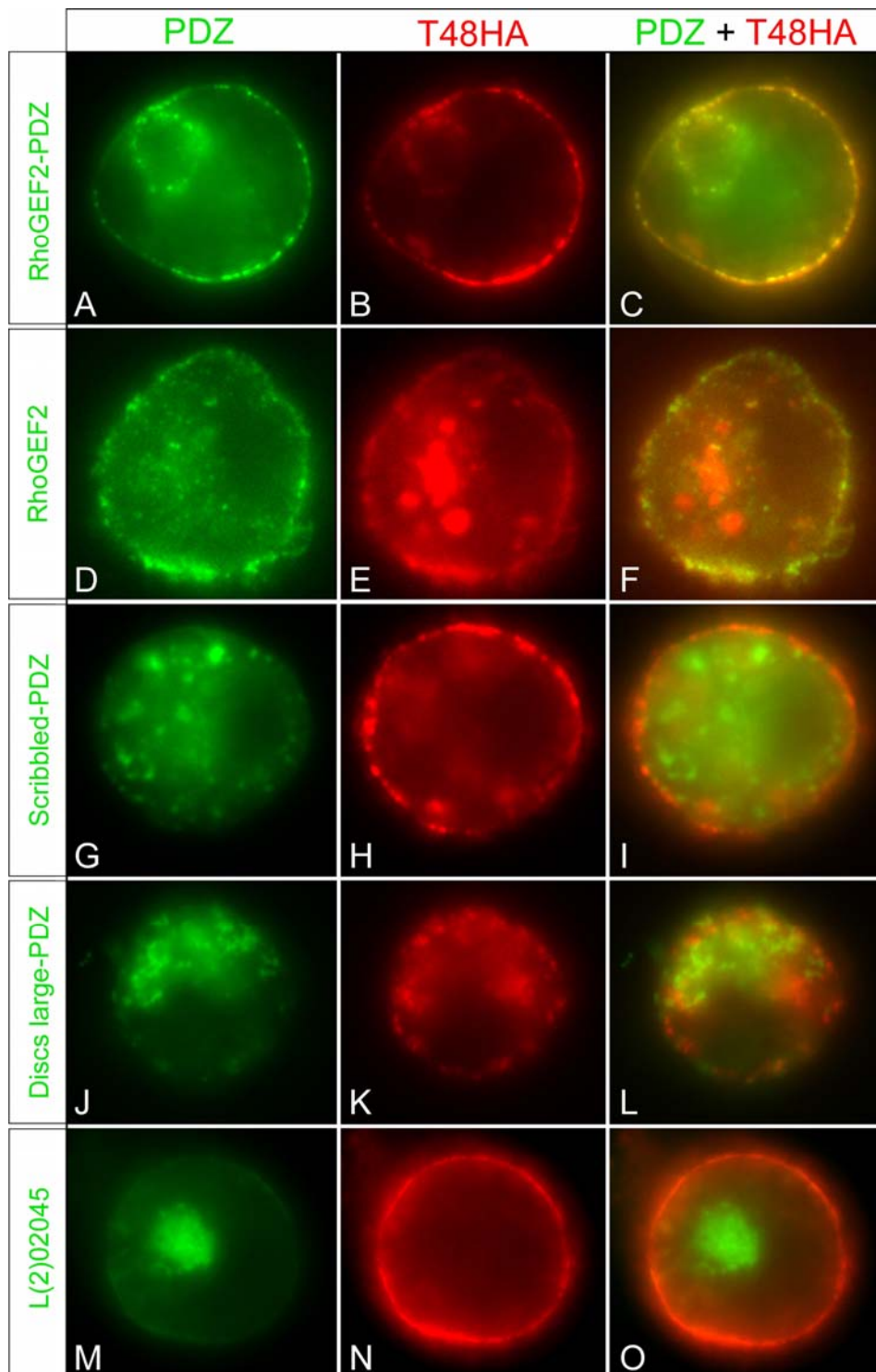


Abbildung 2.23: Ko-Expression von verschiedenen PDZ-Proteinen mit T48HA in S2-Zellen

Transiente Transfektionen von S2-Zellen mit verschiedenen PDZ-Proteinen oder nur den PDZ-Domänen zusammen mit T48HA; gezeigt sind jeweils die Einzelbilder für die PDZ-Proteine (grün) und T48HA (rot) und die Überlagerung beider Bilder.

(A-C) Ko-Expression von T48HA mit RhoGEF2-PDZ-GFP, (D-F) Ko-Expression von T48HA mit RhoGEF2-FLAG, (G-I) Ko-Expression von T48HA mit Scribbled-PDZ-GFP, (J-L) Ko-Expression von T48HA mit Discs large-PDZ-GFP, (M-O) Ko-Expression von T48HA mit L(2)02045-GFP. T48HA

rekrutiert RhoGEF2-PDZ und RhoGEF2-FLAG an die Plasmamembran, jedoch keines der anderen PDZ-Proteine.

Um zu untersuchen, ob diese Interaktion ebenfalls mit einem vollständigen RhoGEF2 zu beobachten ist, wurde eine 5'FLAG-markierte Version von RhoGEF2 in Schneiderzellen exprimiert. Im Gegensatz zu dem verkürzten RhoGEF2-PDZ war RhoGEF2-FLAG uniform in der Zelle verteilt (Abbildung 2.22, B). Wurde RhoGEF2-FLAG mit T48 zusammen exprimiert, konnte auch für RhoGEF2-FLAG eine T48HA-abhängige Membranlokalisation beobachtet werden (Abbildung 2.23, D-F). Auch hier war die Interaktion abhängig vom PDZ-Bindemotiv, da die verkürzte Version von T48HA, T48HA Δ ITTEL, nicht in der Lage war, RhoGEF2-FLAG an die Membran zu rekrutieren (Abbildung 2.24, D-E).

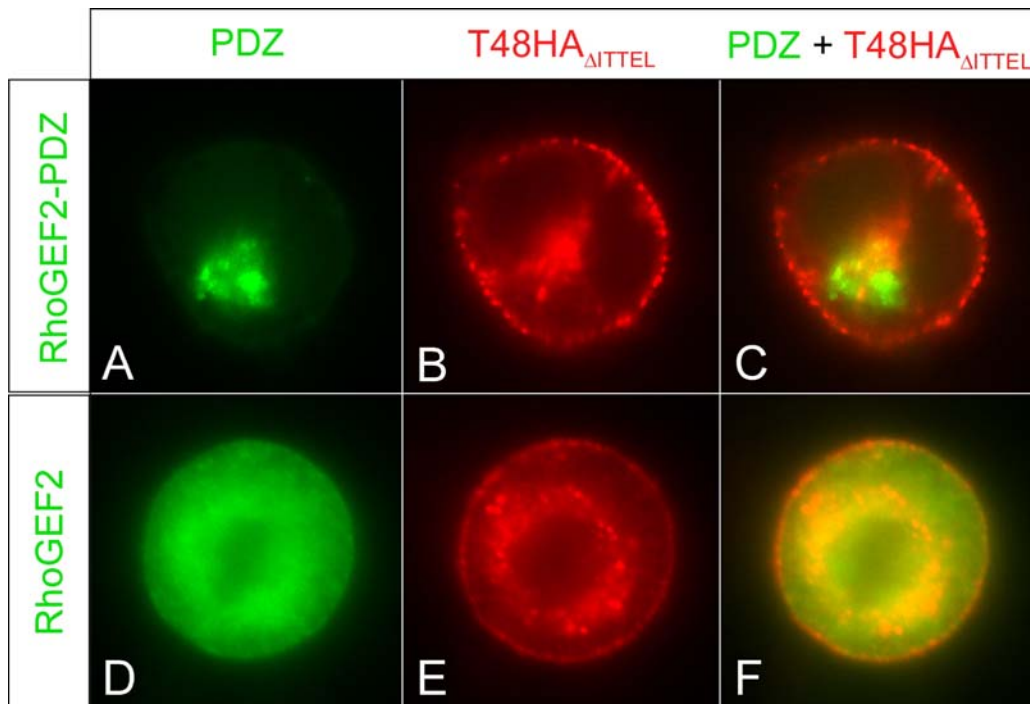


Abbildung 2.24: Ko-Expression von RhoGEF2 und T48HA Δ ITTEL in S2-Zellen

Transiente Transfektionen von S2-Zellen mit RhoGEF2-PDZ-GFP oder RhoGEF2-FLAG zusammen mit T48HA Δ ITTEL; gezeigt sind jeweils die Einzelbilder für RhoGEF2 (grün) und T48HA Δ ITTEL (rot) und die Überlagerung beider Bilder. (A-C) Ko-Expression von T48HA Δ ITTEL mit RhoGEF2-PDZ-GFP, (D-F) Ko-Expression von T48HA Δ ITTEL mit RhoGEF2-FLAG. Weder RhoGEF2-PDZ-GFP, noch RhoGEF2-FLAG wurden durch T48HA Δ ITTEL an die Plasmamembran rekrutiert. Die Interaktion zwischen T48HA und RhoGEF2 ist folglich abhängig vom PDZ-Bindemotiv in T48.

Dies legt eine direkte Interaktion von T48HA und RhoGEF2 über das PDZ-Bindemotiv nahe.

2.6 Expression von RhoGEF2 und Armadillo während der Gastrulation in Wildtypembryonen

Um die mögliche Interaktion von RhoGEF2 mit T48 im Embryo zu untersuchen, wurde die Verteilung von RhoGEF2 in Wildtypembryonen im Vergleich zu *T48*-mutanten Embryonen untersucht. Dazu wurde zunächst die Expression von RhoGEF2 während der Mesoderminvagination in Wildtypembryonen anhand von Antikörperfärbungen gegen RhoGEF2 und Armadillo analysiert. Das Glykoprotein Armadillo ist homolog zu β -Catenin und Teil der Adhärenzverbindungen im Embryo (Peifer 1993; Cox *et al.* 1996; Müller *et al.* 1996).

RhoGEF2 ist, ebenso wie Armadillo, ein maternal-kontrolliertes Gen, das Genprodukt fand sich folglich im Embryo schon bevor die Transkription im Embryo aktiviert wird (Barrett *et al.* 1997; Häcker *et al.* 1998). Das Protein wurde während der Zellularisierung an der Spitze der einwandernden Membranen detektiert (Grosshans *et al.* 2005; Padash Barmchi *et al.* 2005). Am Ende der Zellularisierung lokalisierte RhoGEF2 in allen Zellen am äußersten basalen Ende der lateralen Membran (Abbildung 2.25, A und G). Lateral anschließend fand man basale Bereiche, die durch Armadillo markiert wurden. Zusätzlich wurde ein weiterer Bereich an der subapikalen Position der Membran ebenfalls durch Armadillo markiert. Dieser stellt die Adhärenzverbindungen dar (Peifer 1993, Abbildung 2.25, A und G).

Unmittelbar nach Abschluss der Zellularisierung begannen sich diese Lokalisierungen in den Zellen des prospektiven Mesoderms zu verändern. RhoGEF2 verschwand am basalen Ende der Zellen und auch die basale Färbung von Armadillo nahm ab (Abbildung 2.25, B und H). Das zuvor klare subapikale Signal von Armadillo wurde schwächer und diffuser (Abbildung 2.25, H; Abbildung 2.26, A und I).

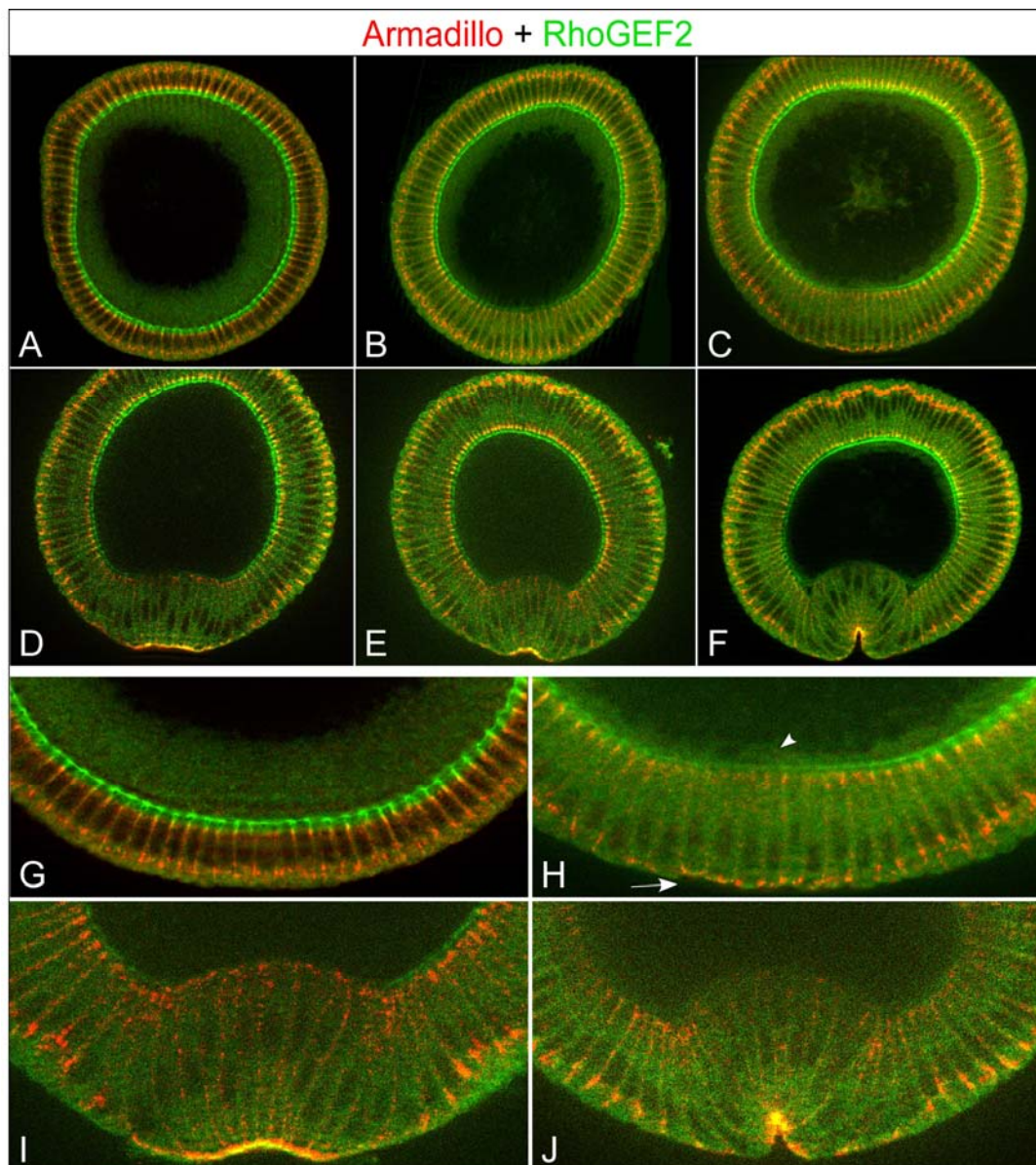


Abbildung 2.25: Übersicht der Verteilung von RhoGEF2 und Armadillo in Wildtypembryonen während der Mesoderminvagination

Querschnitte von Wildtypembryonen nach Antikörperfärbungen gegen RhoGEF2 (grün) und Armadillo (rot). (A-F) Übersicht über die Verteilung von RhoGEF2 und Armadillo in aufeinander folgenden Abschnitten der Mesoderminvagination. (G-J) Ausschnitte verschiedener Stadien. RhoGEF2 und Armadillo befanden sich zum Ende der Zellularisierung am basalen Ende der Membranen aller Zellen (A, G); Armadillo markierte zusätzlich noch einen subapikalen Bereich, der die Adhärenzverbindungen darstellt. Kurz vor Beginn der Mesoderminvagination verschwand RhoGEF2 basal in den mesodermalen Zellen (B, C, Pfeilkopf in H), um sich kurz nach Beginn der Mesoderminvagination bis zum Ende apikal an der Membran zu akkumulieren (D-F, I, J). Auch in den nicht mesodermalen Zellen begann RhoGEF2 in der weiteren Entwicklung basal zu verschwinden, akkumulierte sich hier aber nicht im apikalen Bereich (F). Armadillo verlagerte sich im Mesoderm unmittelbar vor Einsetzen der Invagination der Zellen von der subapikalen Position ebenfalls nach apikal (C, H). Detaillierte Beschreibung siehe Text.

Zu diesem Zeitpunkt verloren die Zellkerne im Mesoderm ihre Position am extremen basalen Ende der Zellen (Abbildung 2.25, H). Kurz darauf ließ sich eine Anreicherung von Armadillo an der apikalen Membran beobachten (Müller *et al.* 1996; Dawes-Hoang *et al.* 2005, Abbildung 2.25, H, 2.26, C und J).

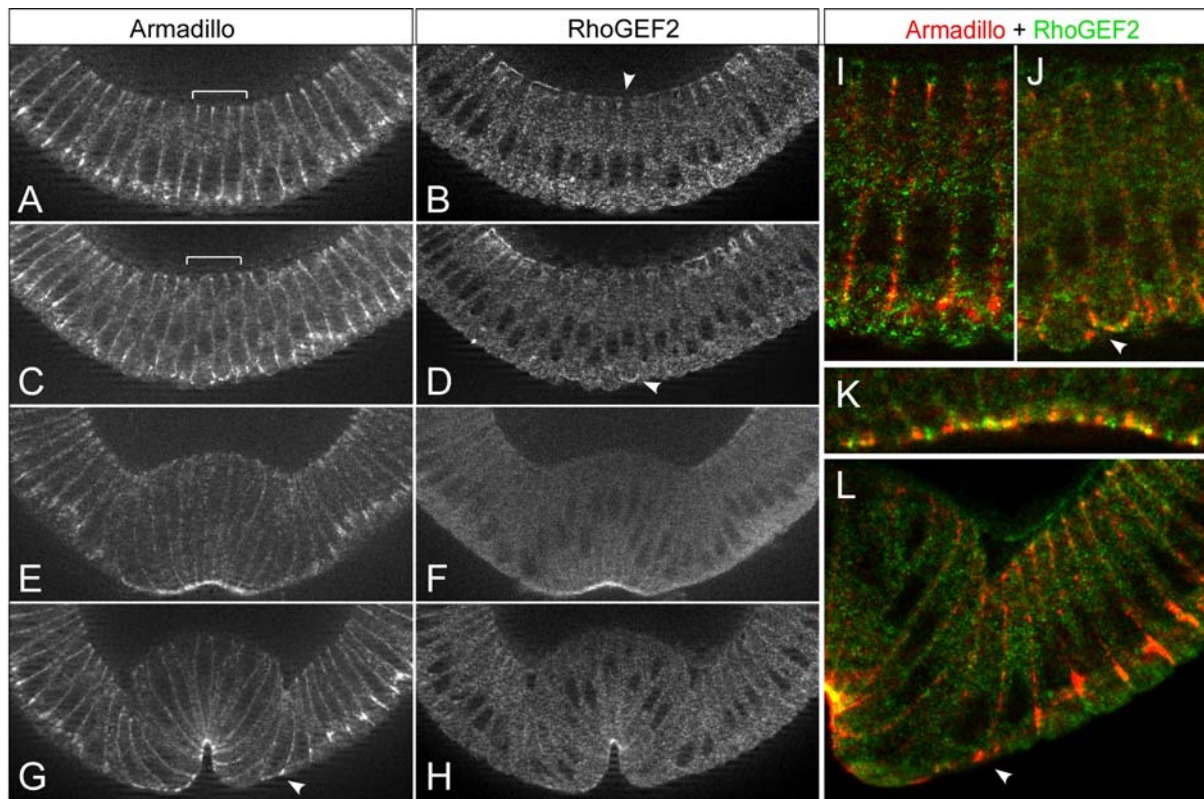


Abbildung 2.26: Details der Verteilung von RhoGEF2 und Armadillo in Wildtypembryonen während der Mesodermvagination

Querschnitte von Wildtypembryonen nach Antikörperfärbungen gegen RhoGEF2 (B, D, F, H) und Armadillo (A, C, E, G). Nach Abschluss der Zellularisierung verschand sowohl RhoGEF2 als auch Armadillo basal in den mesodermalen Zellen (A, B). Kurz darauf begann sich die subapikale Lokalisierung von Armadillo aufzulösen und an der apikalen Seite der Zellen wieder zu akkumulieren (C, Pfeilkopf in J). Teilweise konnte man zu diesem Zeitpunkt schon eine schwache Assoziation von RhoGEF2 mit der apikalen Membran erkennen (Pfeilkopf in D). Zu diesem Zeitpunkt hatten noch keine Zellformveränderungen in den mesodermalen Zellen stattgefunden, in (J) sind gut die noch runden Oberflächen der mesodermalen Zellen zu erkennen. Die Kerne begannen, ihre apikale Position zu verlieren (D). Kurz darauf hatten sich die Zellen des Mesoderms apikal abgeflacht, sich apikal zusammengezogen und entlang der apiko-basalen Achse gestreckt. Nun lokalisierten RhoGEF2 und Armadillo in hohem Maße an der apikalen Membran der Zellen (E, F). Armadillo ist folglich von einer subapikalen Position nach apikal verlagert worden; dies geschah nicht nur in den Zellen, die sich apikal zusammenziehen sondern auch in den lateralen Zellen, die sich zwar apikal abflachen, sich aber nicht zusammenziehen, sondern entlang ihrer apiko-basalen Achse gestreckt werden (Pfeilkopf in L). Obwohl sich beide Proteine während der Gastrulation an der apikalen Seite der Zelle fanden, zeigten sie doch Unterschiede in der Verteilung: während sich Armadillo an den

Verbindungen der Zellen befand, fand man RhoGEF2 mehr dazwischen (K). Die apikale Akkumulation von Armadillo und RhoGEF2 blieb während der gesamten Mesoderminvagination bestehen (G, H).

Teilweise konnte schon eine schwache Assoziation von RhoGEF2 mit der apikalen Membran beobachtet werden (Abbildung 2.26, D und J). Die Zellen hatten sich zu diesem Zeitpunkt apikal noch nicht abgeflacht. Kurz darauf konnten morphologische Veränderungen der mesodermalen Zellen festgestellt werden. Die Zellen begannen, sich apikal abzuflachen und anschließend zusammenzuziehen (Abbildung 2.25, D und I; Abbildung 2.26, E und F). Sie verlängerten sich außerdem entlang ihrer apiko-basalen Achse. Dadurch kam es zur Ausbildung der Ventralfurche. Während dieses Prozesses fand man eine starke Akkumulation von Armadillo und RhoGEF2 an der apikalen Membran der mesodermalen Zellen (Abbildung 2.26, I; Abbildung 2.26, E und F). Während sich Armadillo an der Grenze von apikaler und lateraler Membran befand, sammelte sich RhoGEF2 jedoch mehr in den Bereichen dazwischen an der apikalen Membran (Abbildung 2.26, K).

Interessanterweise fand die Umlagerung von Armadillo von einem subapikalen Bereich an die apikale Seite der Membran nicht nur in den Zellen statt, die sich apikal zusammenziehen, sondern auch in den äußeren mesodermalen Zellen, die zwar abflachen, aber dann an ihrer apikalen Seite langgezogen werden (Abbildung 2.26, L). Die Akkumulation von RhoGEF2 und Armadillo an der apikalen Membran blieb während der gesamten Gastrulation bestehen (Abbildung 2.26, G und H)

Auch in den nicht-mesodermalen Zellen verschwand im Laufe der Gastrulation die Lokalisierung von RhoGEF2 am basalen Ende, in diesen Zellen erfolgte aber keine Anreicherung von RhoGEF2 an der apikalen Membran (Abbildung 2.25, E und F).

2.7 Verteilung von RhoGEF2 und Armadillo in *T48*-mutanten Embryonen

Um eine mögliche Funktion von *T48* in der Lokalisation von RhoGEF2 zu untersuchen, wurden RhoGEF2 und Armadillo in *T48*-defizienten Embryonen mittels Antikörperfärbung detektiert und in Schnitten der Embryonen die Lokalisation beider Proteine während der Mesoderminvagination analysiert (Abbildung 2.27).

In *T48*-defizienten Embryonen konnte RhoGEF2 an den Spitzen der einwandernden Membranen bis zum Ende der Zellularisierung beobachtet werden. Auch die Lokalisierung von Armadillo in einem basalen und einem subapikalen Bereich war wie im Wildtyp. Während sich Armadillo in den *T48*-defizienten Embryonen auch während der weiteren Invagination des Mesoderms wildtypisch verhielt (Abbildung 2.27, A, C, E und G), zeigten sich Unterschiede für RhoGEF2. Während es wie im Wildtyp von seiner basalen Lokalisation nach und nach verschwand (Abbildung 2.27, B, Pfeilkopf), erfolgte die Anreicherung im apikalen Bereich der Zellen nicht wie im Wildtyp.

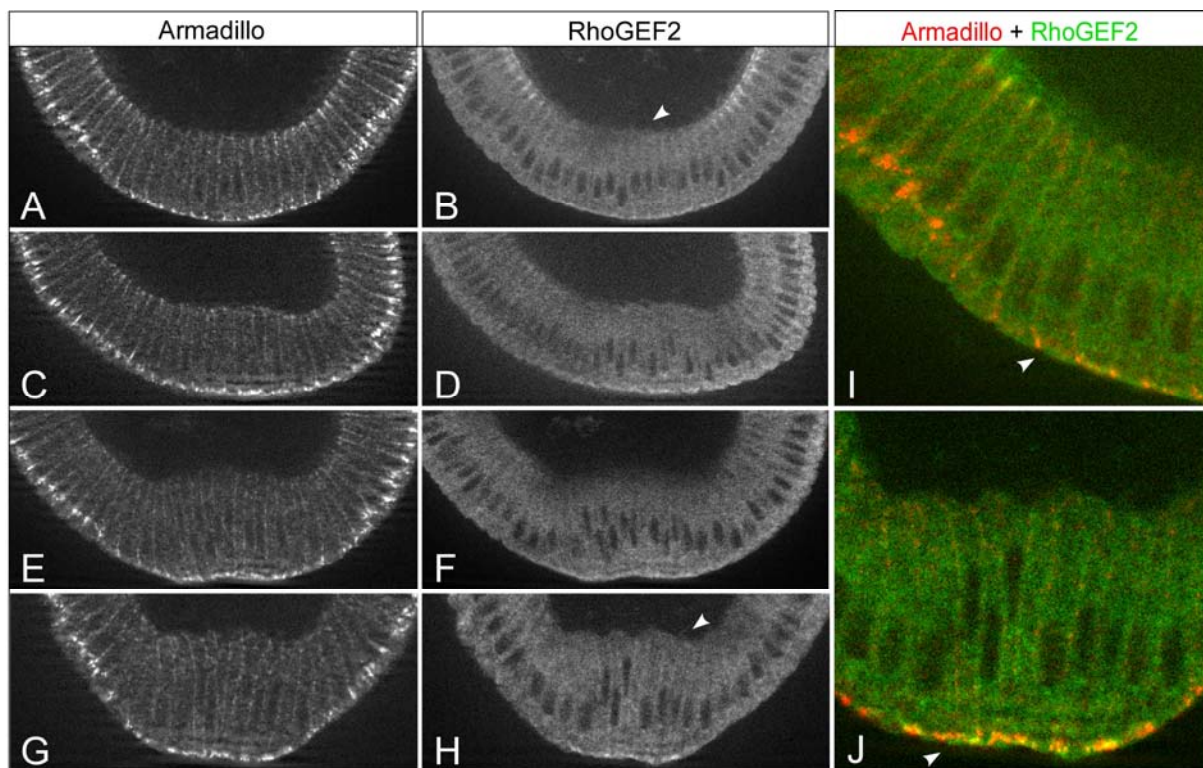


Abbildung 2.27: Verteilung von RhoGEF2 und Armadillo in *T48*-defizienten Embryonen während der Gastrulation

Querschnitte von *T48*-defizienten Embryonen nach Antikörperfärbungen gegen RhoGEF2 (B, D, F, H; grün) und Armadillo (A, C, E, G; rot). Armadillo und RhoGEF2 verschwanden wie im Wildtyp von ihrer basalen Lokalisation (A, Pfeilkopf in B). Armadillo lagerte sich ebenfalls wie im Wildtyp von einer subapikalen Position an die apikale Membran der Zellen um (A, I). Die Zellen des Mesoderms flachten sich apikal ab wie im Wildtyp (Pfeilkopf in I), es kam jedoch nicht zu einer apikalen Akkumulation von RhoGEF2 in Stadien, wo man im Wildtyp schon eine deutlich Assoziation von RhoGEF2 mit der Membran erkennen konnte (D, F, im Vergleich zu Abbildung 2.26 F). Die Akkumulation war allerdings nicht vollständig blockiert, sondern nur verzögert und vielleicht in ihrer Menge reduziert. In späteren Stadien erkannte man eine deutliche Akkumulation von RhoGEF2 an der apikalen Membran der mesodermalen Zellen (H, Pfeilkopf in J). Da es in den mesodermalen Zellen nicht oder nur wenig zu

einer Konstriktion der apikalen Membranen kam, sich die Zellen aber entlang ihrer apiko-basalen Achse streckten (siehe auch Abbildung 2.9 D, F), kam es eher zur Ausbildung einer Plakode anstelle einer Invagination (Pfeilkopf in H, J).

Die apikale Anreicherung von RhoGEF2 war verzögert (Abbildung 2.27, D und F). Die Akkumulation war allerdings nicht vollständig blockiert, denn in späten Stadien zum Ende der Gastrulation hin konnte eine klare Anreicherung von RhoGEF2 im apikalen Bereich der mesodermalen Zellen beobachtet werden (Abbildung 2.27, H und J). Außerdem schien die Menge an RhoGEF2, die sich apikal akkumulierte, leicht reduziert zu sein. Diese verzögerte Anreicherung von RhoGEF2 lässt sich gut in Einklang bringen mit dem bei *T48*-defizienten Embryonen beobachteten Phänotyp. Hier zeigte sich eine verzögerte und schwächere apikale Konstriktion der Zellen. Dies könnte auf die verzögerte Akkumulation von RhoGEF2 an der apikalen Seite der mesodermalen Zellen zurückzuführen sein.

Die verspätete Lokalisation von RhoGEF2 könnte zu einer verspäteten Weitergabe des Signals an das Aktinzytoskelett und somit zu verspäteter Konstriktion und Invagination führen. Allerdings zeigt die Tatsache, dass es in späteren Stadien auch in Abwesenheit von *T48* zu einer apikalen Akkumulation von RhoGEF2 kommt, dass *T48* nicht der einzige Faktor sein kann, der für diese Akkumulation verantwortlich ist und es weitere Proteine geben muss, die daran beteiligt sind.

2.8 Kooperation von *T48* und *Concertina* in der Gastrulation

Embryonen, in denen der *Fog/Cta*-Signalweg blockiert ist, zeigen Störungen während der Gastrulation (Parks *et al.* 1991; Costa *et al.* 1994; Morize *et al.* 1998; Schaefer *et al.* 2001; Izumi *et al.* 2004; Dawes-Hoang *et al.* 2005). Um eine mögliche genetische Interaktion zwischen dem *Fog/Concertina*-Signalweg und *T48* zu testen, wurden Embryonen von homozygot *concertina*-mutanten Müttern und Embryonen, die zusätzlich homozygot defizient für *T48* waren und die im Folgenden als *cta/T48*-mutante Embryonen bezeichnet werden, untersucht.

In Embryonen von homozygot *concertina*-mutanten Müttern zeigten nur einige der Zellen des prospektiven Mesoderms apikale Konstriktionen. Die Ventralfurchenbildung war verzögert und unkoordinierter als im Wildtyp (Parks *et al.*

1991). Doch auch in diesen Embryonen gelangte das Mesoderm zum Ende der Gastrulation in das Innere des Embryos.

2.8.1 Phänotypische Analyse von Embryonen von heterozygot *concertina*-mutanten Müttern, defizient für *T48*

Eine Untersuchung von Embryonen von heterozygot *concertina*-mutanten Müttern, die gleichzeitig homozygot defizient für *T48* waren, zeigte, dass die Einwanderung des Mesoderms deutlich stärker gestört war, als in den Einzelmutanten (Abbildung 2.28). Ähnliches konnte auch schon zuvor für Embryonen gezeigt werden, die heterozygot für *fog* und homozygot defizient für *T48* waren (Seher 2004).

Die Invagination war sehr stark verzögert. Zu einem Zeitpunkt, wo im Wildtyp bereits nahezu das gesamte Mesoderm eingewandert war, zeigten diese Embryonen noch fast keine Invagination (Abbildung 2.28, A und B). Doch auch in diesen Embryonen war der Defekt im Mesoderm nur transient, zum Ende der Gastrulation hin befanden sich nahezu alle mesodermalen Zellen im Inneren des Embryos (Abbildung 2.28, C und D).

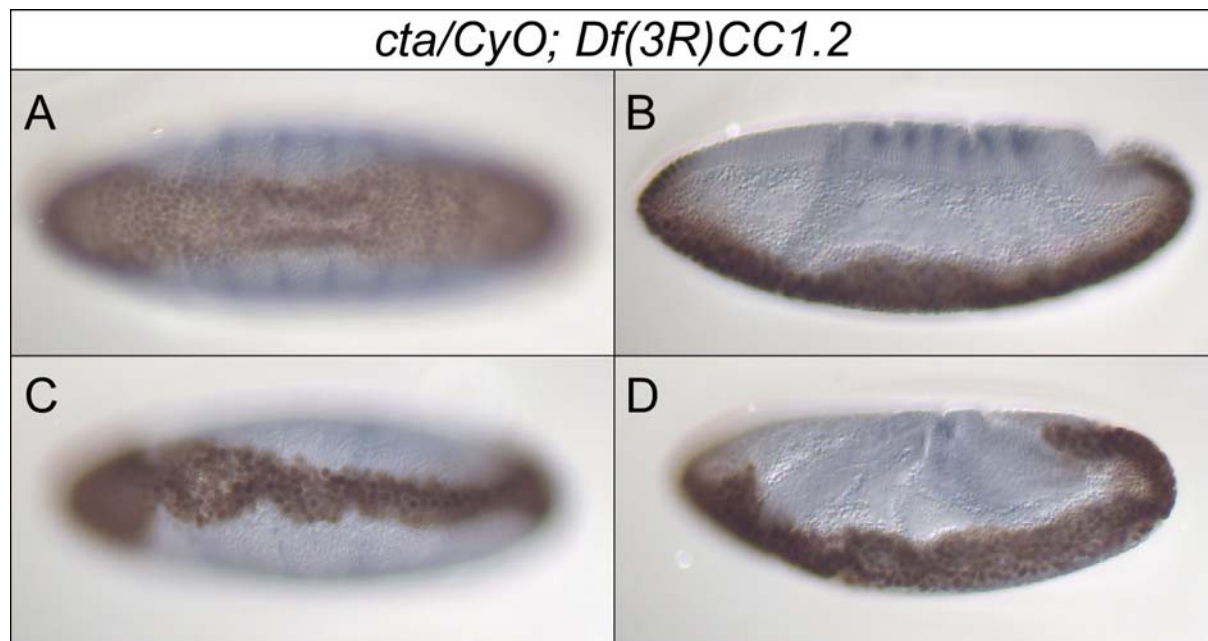


Abbildung 2.28: Phänotyp von Embryonen von heterozygot *concertina*-mutanten Müttern, gleichzeitig homozygot defizient für *T48*

Antikörperfärbungen an Embryonen von heterozygot *concertina*-mutanten Müttern, gleichzeitig homozygot defizient für *T48* (braun: anti-Twist, blau: anti-Eve). (A, B) Stadium 6, ventrale Ansicht (A) und lateraler optischer Schnitt (B). (C, D) Spätes Stadium 7, ventrale Ansicht (C) und lateraler optischer Schnitt (D). *T48*-defiziente Embryonen von heterozygot *concertina*-mutanten Müttern zeigten

eine deutlich stärkere Verzögerung und Unregelmäßigkeit in der Invagination des Mesoderms, als die Einzelmutanten. Doch auch hier waren die Störungen nur vorübergehend, am Ende der Gastrulation waren nahezu alle Zellen des Mesoderms eingewandert.

2.8.2 Phänotypische Analyse von *concertina/T48*-mutanten Embryonen

Bei der Analyse von *concertina/T48*-mutanten Embryonen zeigte sich, dass in diesen Embryonen die Invagination des Mesoderms vollständig blockiert war. Keine der mesodermalen Zellen gelangte durch Gastrulationsbewegungen ins Innere des Embryos (Abbildung 2.29).

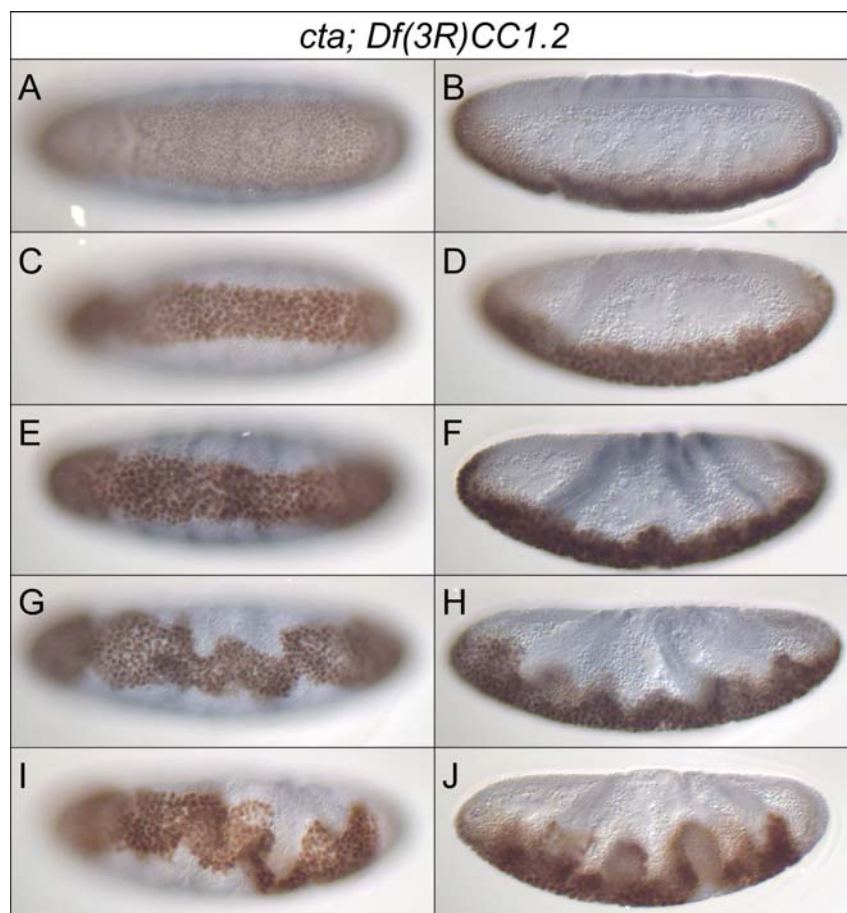


Abbildung 2.29: Phänotyp von Embryonen von *concertina/T48*-mutanten Embryonen

Antikörperfärbungen an Embryonen von homozygot *concertina*-mutanten Müttern, gleichzeitig homozygot defizient für *T48* (*concertina/T48* mutante Embryonen) von aufeinander folgenden Abschnitten der Gastrulation (braun: anti-Twist, blau: anti-Eve). (A, C, E, G, I) ventrale Ansichten (B, D, F, H, J) lateraler optischer Schnitt. *Concertina/T48*-mutante Embryonen zeigten eine nahezu vollständige Blockierung der Invagination des Mesoderms. Nahezu keine Zellen des prospektiven Mesoderms gelangten in das Innere des Embryos (A-F). Zusätzlich kam es durch die fehlende Keimstreifenausstreckung aufgrund des Fehlens von *Concertina* zu einer starken Faltung des Mesoderms (G-J).

Durch die Blockierung der Invagination des Mitteldarmprimordiums und der daher fehlenden Ausstreckung des Keimstreifs aufgrund der *concertina*-Mutation kam es zu starken Faltungen, besonders im Bereich des Mesoderms (Parks *et al.* 1991, Abbildung 2.29, G-J), wodurch einige der Zellen in das Innere des Embryos gelangen konnten. Diese Zellen begannen, sich wie im Wildtyp unter dem darüberliegenden Ektoderm nach dorsal hin auszubreiten. Diese Verlagerung der Zellen ins Innere des Embryos hatte aber nichts mit den normalen Abläufen der Gastrulation zu tun.

Eine detaillierte Analyse der Veränderungen auf zellulärer Ebene anhand von Neurotactin-Antikörperfärbungen zeigte, dass sich die Zellen weder apikal abflachen, noch sich entlang ihrer apiko-basalen Achse strecken, noch apikale Konstriktionen zeigen (Abbildung 2.30).

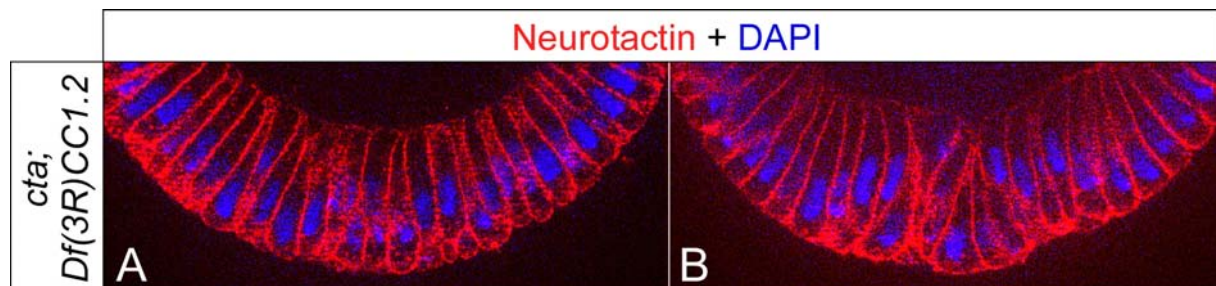


Abbildung 2.30: Neurotactin-Antikörperfärbung an Querschnitten von *concertina/t48*-Embryonen

(A, B) Ventraler Bereich von Querschnitten von *concertina/T48*-mutanten Embryonen nach Neurotactin-Antikörperfärbung. (A) spätes Stadium 5. (B) Spätes Stadium 6. In den *concertina/T48*-mutanten Embryonen kam es zu keinen Zellformveränderungen in den mesodermalen Zellen. Die Zellen flachten sich nicht apikal ab, streckten sich nicht entlang der apiko-basalen Achse und zeigten keine apikale Konstriktionen (A). Dadurch kam es zu keiner Einwanderung der Zellen ins Innere des Embryos (A). Durch die fehlende Streckung des Keimstreifs kam es jedoch zu Faltungen im Mesoderm, wodurch einige der Zellen in das Innere des Embryos gedrückt wurden (B).

Eine zusätzliche DAPI-Färbung an diesen Embryonen zeigte, dass zwar wenige Kerne ihre apikale Position verloren, aber der Grossteil an Kernen in einer apikalen Position verblieb. Die Verschiebung der Kerne könnte in diesem Fall auf mechanische Kräfte durch die Faltungen des Mesoderms aufgrund fehlender Keimstreifausstreckung zurückzuführen sein.

2.8.3 Verteilung von RhoGEF2 und Armadillo in *concertina/T48*-mutanten Embryonen

Die Verteilung von Armadillo und RhoGEF2 in Embryonen von homozygot *concertina*-mutanten Müttern zeigte, dass das basale Verschwinden von RhoGEF2 normal erfolgte. Die apikale Akkumulation von RhoGEF2 erfolgte später als im Wildtyp, schien allerdings mengenmäßig nicht reduziert (Abbildung 2.31, B, Pfeilkopf). Die Armadillo-Verlagerung nach apikal erfolgte auch in diesen Embryonen, jedoch war die Menge an Armadillo an der apikalen Membran im Vergleich zum Wildtyp reduziert und das Signal diffuser (Abbildung 2.31, A, Pfeilkopf).

In *cta/T48*-mutanten Embryonen zeigte sich, dass RhoGEF2 ebenfalls wie im Wildtyp basal verschwand, sich jedoch zu keinem Zeitpunkt der weiteren Gastrulation apikal akkumulierte (Abbildung 2.31, D, Pfeilkopf).

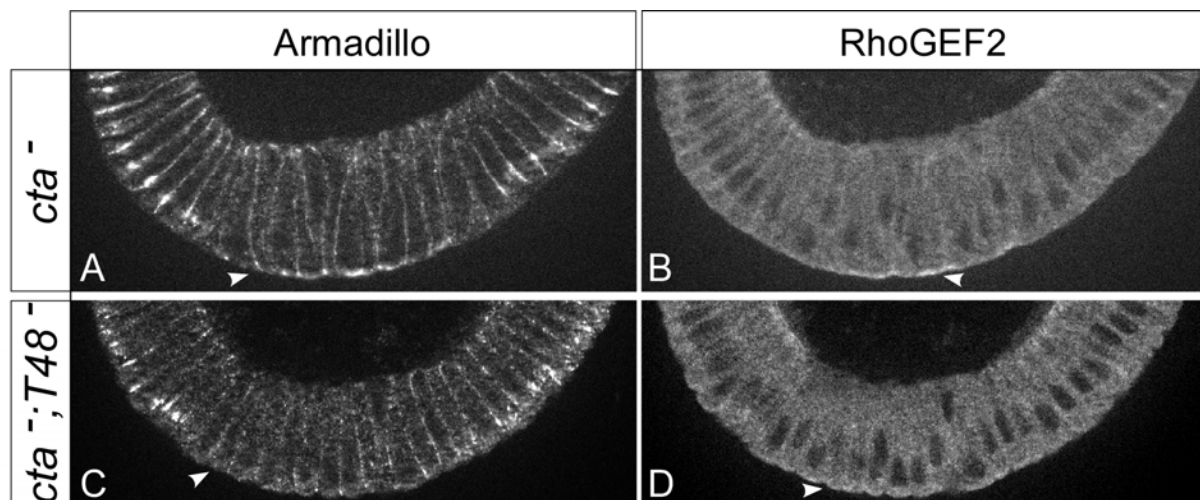


Abbildung 2.31: Verteilung von RhoGEF2 und Armadillo in Embryonen von homozygot *concertina*-mutanten Müttern und in *concertina/T48*-mutanten Embryonen

Querschnitte von Embryonen von homozygot *concertina*-mutanten Müttern und von *concertina/T48*-mutanten Embryonen nach Antikörperfärbungen gegen RhoGEF2 (B, D) und Armadillo (A, C); Stadium 6. In Embryonen von homozygot *concertina*-mutanten Müttern assoziierte RhoGEF2 verspätet mit der apikalen Membran der mesodermalen Zellen (Pfeilkopf in B). Die Akkumulation von Armadillo an der apikalen Membran war schwächer und diffuser als im Wildtyp (Pfeilkopf in A). In *concertina/T48*-mutanten Embryonen hingegen akkumulierten weder RhoGEF2 noch Armadillo an der apikalen Membran (Pfeilköpfe in C und D).

Concertina und T48 scheinen folglich die beiden Faktoren zu sein, die für eine starke und schnelle Akkumulation von RhoGEF2 an der apikalen Membran der

mesodermalen Zellen verantwortlich sind. Fehlt einer der beiden Faktoren, kommt es zu einer verzögerten Akkumulation von RhoGEF2 an der apikalen Membran und somit auch zu einer Verzögerung in der Invagination. Die Defekte sind jedoch transient. Fehlen jedoch beide Faktoren, so findet man zu keinem Zeitpunkt der Gastrulation eine Akkumulation von RhoGEF2 an der apikalen Membran und die Invagination ist vollständig blockiert.

Unerwarteterweise zeigten sich in den *cta/T48*-mutanten Embryonen starke Unterschiede in der Lokalisation von Armadillo im Vergleich zum Wildtyp. Während Armadillo von seiner subapikalen Position verschwand, erfolgte nahezu keine Akkumulation an der apikalen Membran (Abbildung 2.31, C, Pfeilkopf). Diese Ergebnisse widersprechen dem bisherigen Verständnis der Umlagerung der Adhärenzverbindungen. Bisher wurde davon ausgegangen, dass die Verlagerung der Adhärenzverbindungen von einer subapikalen Position an die apikale Membran eine Folge der mechanischen Kraft durch die Kontraktion des Aktinzytoskelett ist. Die Adhärenzverbindungen sind Ansatzstelle für das Aktinzytoskelett. Durch apikale Konstriktion werden die Adhärenzverbindungen in die apikale Position gezogen (Dawes-Hoang *et al.* 2005).

Die Tatsache, dass in den Doppelmutanten keine Ansammlung der Adhärenzverbindungen an der apikalen Membran erfolgte, zeigt, dass es zumindest einen teilweisen Abbau der Adhärenzverbindungen an der subapikalen Membran und einen Wiederaufbau an der apikalen Membran geben muss und nicht ein Verschieben allein die Ursache der veränderten Lokalisierung sein kann. Auch zeigen die Ergebnisse, dass die Umlokalisierung der Adhärenzverbindungen nach apikal beginnt, bevor es zu apikalen Konstriktionen in den mesodermalen Zellen kommt.

2.9 Verteilung von RhoGEF2 und Armadillo in *snail*-mutanten Embryonen

Obwohl es in Embryonen der *concertina/T48*-Doppelmutante nicht zu einer Akkumulation von Armadillo an der apikalen Membran kommt, sind die Zellen des Mesoderms weiterhin von den übrigen Zellen unterscheidbar. Denn während in den

ektodermalen Zellen Armadillo in seiner subapikalen Lokalisation erhalten bleibt, verschwindet es in den mesodermalen Zellen wie erwartet. Dies zeigt, dass es einen Faktor geben muss, der diese Zellen unterscheidet. Ein möglicher Kandidat hierfür ist Snail. Aus Vertebraten ist bekannt, dass Snail für die Induktion der „epithelial to mesenchymal transition (EMT)“ verantwortlich ist. Während dieses Prozesses lösen die Epithelzellen ihren epithelialen Verband und werden zu migratorischen mesenchymalen Zellen (Nieto *et al.* 1994; Cano *et al.* 2000; Nieto 2002; Barraló-Gimeno *et al.* 2005; De Craene *et al.* 2005). Für diesen Schritt ist es wichtig, dass die Expression von DE-Cadherin, welches eine wichtige Rolle in der Zell-Zell-Adhäsion spielt, reprimiert wird. Dies wird durch Snail erreicht (Cano, Perez-Moreno *et al.* 2000).

Um eine mögliche Beteiligung von Snail an der Auflösung der Adhärenzverbindungen an der subapikalen Membran zu untersuchen, wurden Embryonen, die homozygot für eine Defizienz im Bereich von *snail* waren, auf die Lokalisierung von Armadillo während der Gastrulation anhand von Schnitten hin untersucht. Armadillo verschwand in den mesodermalen Zellen von Embryonen, die homozygot defizient waren für den *snail*-Lokus, zu keiner Zeit von seiner subapikalen Position (Abbildung 2.32, A).

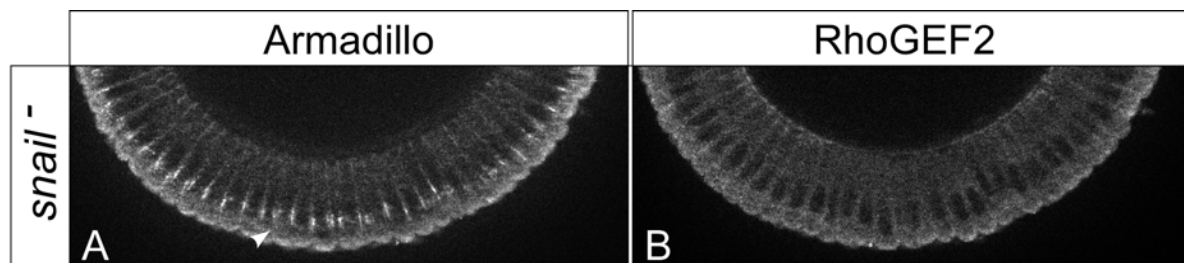


Abbildung 2.32: Verteilung von RhoGEF2 und Armadillo in *snail*-mutanten Embryonen

Querschnitte von *snail*-mutanten Embryonen nach Antikörperfärbungen gegen RhoGEF2 (B) und Armadillo (A), Stadium 5. In *snail*-mutanten Embryonen löste sich Armadillo zu keinem Zeitpunkt von seiner subapikalen Position und akkumulierte nicht an der apikalen Membran (Pfeilkopf in A). RhoGEF2 schien sich wie im Wildtyp zu verhalten (B).

Snail scheint somit direkt oder indirekt am Auflösen der Adhärenzverbindungen an der subapikalen Membran beteiligt zu sein.

3 Diskussion

Embryonen, die homozygot für die Defizienz $Df(3R)Tl^P$ sind, zeigen Störungen in der Invagination des Mesoderms. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Deletion von *T48* für die beobachteten Defekte während der Mesoderminvagination verantwortlich ist. *T48* interagiert mit RhoGEF2 und ist für eine rasche und starke apikale Akkumulation von RhoGEF2 in den Zellen des Mesoderms mitverantwortlich. *T48* reguliert parallel zum Fog/Concertina-Signalweg die Zellformveränderungen während der Mesoderminvagination.

Desweiteren hat das Fehlen von Fog/Concertina und *T48* einen Einfluss auf die korrekte Ausbildung oder die Aufrechterhaltung der Adhärenzverbindungen in den mesodermalen Zellen.

3.1 Die Deletion von *T48* führt zu Störungen in der Mesoderminvagination

Anhand einer phänotypischen und genetischen Analyse von kleineren Defizienzen im Bereich der Defizienz $Df(3R)Tl^P$ wurde die Defizienz $Df(3R)CC1.2$ identifiziert, deren Embryonen ebenfalls eine Störung der Mesoderminvagination, vergleichbar mit der von Embryonen homozygot für die Defizienz $Df(3R)Tl^P$, zeigten. Die Defekte sind darauf zurückzuführen, dass die apikalen Konstriktionen der Zellen verzögert sind und nur in sehr wenigen Zellen einsetzen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Defizienz $Df(3R)CC1.2$ neben *T48* nur Teile des Gens *rough* deletiert, welches erst später in der Entwicklung exprimiert wird. Dies spricht dafür, dass der Verlust von *T48* in $Df(3R)CC1.2$ zu den beobachteten Defekten führt. Es ist nicht auszuschliessen, dass durch die Deletion in $Df(3R)CC1.2$ zusätzlich regulatorische Bereiche weiterer Gene betroffen sind. Dies wäre in der Single-Embryo-PCR nicht erfasst worden. Das Einbringen von *T48* in $Df(3R)CC1.2$ jedoch führt zu einer fast wildtypischen Mesoderminvagination. Daher ist nahezu auszuschliessen, dass das Fehlen noch weiterer Gene Ursache der Störungen im Mesoderm ist. Einen

eindeutigen Beweis würde die Analyse einer Mutante für *T48* liefern oder die Expression von *T48* unter der Kontrolle des endogenen Promotors in Defizienz *Df(3R)CC1.2*.

3.2 Charakterisierung von T48

In früheren Untersuchungen war *T48* als Zielgen von Twist im prospektiven Mesoderm identifiziert worden (Leptin 1991). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass T48 mit internem HA-Epitop in Embryonen des zellulären Blastoderms ausschliesslich an der apikalen Seite der Plasmamembran lokalisiert. Dieses Ergebnis wird durch die Analyse der Proteinstruktur gestützt, da T48 eine putative Membrandomäne besitzt.

Es wäre wünschenswert, zusätzlich zu diesen Überexpressionsstudien auch das endogene Protein nachweisen zu können. Doch bisherige Versuche zur Generation eines Antikörpers waren nicht erfolgreich.

3.3 Interaktionspartner von T48

In dieser Arbeit wurde anhand des Proteinalgorithmus PERLA unter anderem RhoGEF2 und Scribbled als mögliche Interaktionspartner von T48 bestimmt. Mit einem biochemischen Ansatz und in Experimenten mit *Drosophila* S2 Zellen wurde die Interaktion von T48 mit RhoGEF2 *in vitro* und *in vivo* bestätigt. T48 und RhoGEF2 interagieren über das PDZ-Bindemotiv in T48 miteinander. Die Interaktion von T48 mit Scribbled konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die verwendeten Konstrukte eine Ausbildung der natürlichen Konformation der PDZ-Domäne und damit die Interaktion verhindert haben. Da aber Scribbled in Epithelzellen mit Lgl und Dlg einen Proteinkomplex basal zu den Adhärenzverbindungen bildet (Tepass *et al.* 2001) und T48HA an der apikalen Membran lokalisiert, ist es nicht wahrscheinlich, dass beide Proteine *in vivo* miteinander agieren.

Für den in einem „Hefe-Zwei-Hybrid“-Screen identifizierten Interaktionspartner L(2)02045 (Giot *et al.* 2003) konnte in dieser Arbeit keine Interaktion bestätigt werden. Es ist nicht auszuschliessen, dass das Ergebnis des „Hefe-Zwei-Hybrid“-Screens nicht zutreffend ist und es keine Interaktion zwischen L(2)02045 und T48 gibt. Dafür spricht, dass Embryonen mit einer P-Insertion in *l(2)02045* keine Störungen in der Gastrulation aufweisen. Andererseits ist L(2)02045 von der Struktur her ein möglicher Regulator von Signalwegen über G-Proteine. T48 könnte zusätzlich zu RhoGEF2 mit L(2)02045 interagieren. L(2)02045 könnte dann regulativ auf Concertina wirken. Eine Interaktion von T48 mit L(2)02045 könnte jedoch auch mit einer zweiten Funktion von T48 in anderen Geweben, wie z. B. der Epidermis, zusammenhängen. Möglicherweise ist T48 dort Bestandteil von G-Proteingekoppelten Signalwegen, indem es für die korrekte Lokalisation von L(2)02045 verantwortlich ist, welches dort als Regulator der Aktivität eines G-Proteins wirken könnte. Dies würde erklären, warum Embryonen mit P-Insertion in *l(2)02045* keine Störungen in der Mesoderminvagination zeigen. Hier wäre die Analyse einer möglichen Ko-Expression von *T48* und *l(2)02045* in anderen Geweben notwendig. Zusätzlich müssten Einzelmutanten für *T48* und *l(2)02045* oder Doppelmutanten auf mögliche weitere Defekte in der Entwicklung untersucht werden.

3.4 Rolle von T48 in der Gastrulation

Die Interaktion von T48 mit RhoGEF2 zeigt eine Funktion in der apikalen Lokalisation von RhoGEF2 während der Mesoderminvagination auf. Im Vergleich zu Wildtypembryonen ist in *T48*-defizienten Embryonen die apikale Lokalisierung von RhoGEF2 verzögert. Ob die Menge an RhoGEF2, die apikal akkumuliert wird, signifikant verringert ist, müsste z. B. über eine Quantifizierung der Fluoreszenz nach Antikörperfärbung gegen RhoGEF2 in den mesodermalen Zellen von Embryonen der verschiedenen Mutanten analysiert werden.

In *T48*-defizienten Embryonen setzte die apikale Akkumulation von RhoGEF2 deutlich später als beim Wildtyp ein, war jedoch nicht vollständig blockiert. Späte Stadien zeigten eine Akkumulation von RhoGEF2 in den mesodermalen Zellen. Dies zeigt, dass T48 nicht alleine an der apikalen Akkumulation von RhoGEF2 beteiligt ist.

Sonst müsste ein Ausfall von T48 zu einem vollständigen Ausfall der apikalen Akkumulation von RhoGEF2 führen. Da dies aber nicht der Fall ist, müssen weitere Faktoren an diesem Prozess beteiligt sein. Eine Möglichkeit ist, dass T48 für die frühe apikale Lokalisation von RhoGEF2 verantwortlich ist und es einen zweiten Faktor gibt, der diese Funktion nach Einsetzen der Gastrulation übernimmt. Eine andere Möglichkeit ist, dass es zwei parallele Signalwege gibt, die beide RhoGEF2 apikal lokalisieren. Fällt der eine Weg aus, ist der Prozess nicht vollständig blockiert, sondern nur verlangsamt. Es dauert länger, bis gleiche Mengen an RhoGEF2 apikal angereichert werden können.

3.5 Kooperation von T48 und Fog/Concertina in der Mesoderminvagination

Der Fog/Concertina-Signalweg führt zu einer Aktivierung von RhoGEF2 (Dawes-Hoang *et al.* 2005). Allerdings führt auch der Verlust des Fog/Concertina-Signalweges nicht zu einer vollständigen Blockade der nachfolgenden Prozesse, sondern führt ebenfalls nur zu einer Verzögerung der Mesoderminvagination (Costa *et al.* 1994). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in Embryonen, in denen weder der Fog/Concertina-Signalweg noch T48 aktiv war, die Mesoderminvagination vollständig blockiert war und es zu keiner apikalen Akkumulation von RhoGEF2 kam. T48 scheint folglich mit dem Fog/Concertina-Signalweg die apikale Akkumulation von RhoGEF2 zu steuern und somit rasche und kontrollierte apikale Konstriktionen im Mesoderm zu ermöglichen.

Die Analyse von Embryonen von homozygot *concertina*-mutanten Müttern legt die Vermutung nahe, dass die beiden Signalwege nicht nacheinander aktiv werden, sondern parallel agieren. Wäre T48 für die frühe und Fog/Concertina für die spätere Akkumulation von RhoGEF2 verantwortlich, so wäre zu erwarten, dass in Embryonen von homozygot *concertina*-mutanten Müttern die apikale Akkumulation von RhoGEF2 zum richtigen Zeitpunkt einsetzt, aber in späteren Stadien nicht aufrechterhalten werden kann. In diesen Embryonen kam es aber ebenfalls zu einer verspäteten apikalen Akkumulation von RhoGEF2, die aber bis zum Ende der

Mesoderminvagination bestehen blieb. Beide Signale führen somit parallel zur apikalen Akkumulation von RhoGEF2 und können einander bedingt kompensieren.

3.6 Modell zur Funktion von T48

In Experimenten an Schneiderzellen wurde gezeigt, dass RhoGEF2 mit EB1 interagiert (Rogers *et al.* 2002). EB1 ist ein Protein, welches an die Plus-Enden von Mikrotubuli bindet und unter anderem eine Rolle in der Dynamik von Mikrotubuli spielt. In S2-Zellen wird RhoGEF2 durch Interaktion mit EB1 an den Zellkortex transportiert. Aktiviertes Concertina führt zu einer Dissoziation von RhoGEF2 und EB1, wobei EB1 weiter an die Mikrotubuli gebunden bleibt und RhoGEF2 ins Zytoplasma gelangt (Rogers *et al.* 2004). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde postuliert, dass RhoGEF2 durch EB1 entlang der Mikrotubuli nach apikal transportiert wird. Durch die apikale Aktivierung von Concertina durch lokal sekretiertes Fog wird RhoGEF2 apikal von den Mikrotubuli gelöst, reichert sich dort an und kann dann RhoA aktivieren und über weitere Faktoren zur Kontraktion des Aktinzytoskeletts führen.

Zusammen mit den Daten dieser Arbeit ergibt sich folgendes Modell für die Funktion von T48 in der Kontrolle der Mesoderminvagination (Abbildung 3.1): Twist aktiviert in den Zellen des Mesoderms die Expression von *fog*. Fog wird von den Zellen des Mesoderms sekretiert und aktiviert an der apikalen Membran der ventralen Zellen einen bisher unbekanntes Rezeptor. Durch die Aktivierung des Rezeptors wird das G-Protein mit der α -Untereinheit Concertina aktiviert. Das aktivierte Concertina interagiert mit dem EB1-RhoGEF2-Komplex und löst RhoGEF2 apikal von den Mikrotubuli. RhoGEF2 ist nun frei diffundierbar im Zytoplasma des apikalen Bereichs der Zelle. T48 befindet sich zu diesem Zeitpunkt in die apikale Membran integriert. Durch die Interaktion mit dem PDZ-Bindemotiv von T48 wird RhoGEF2 an der apikalen Membran der Zelle angereichert und dort festgehalten. Dort aktiviert es lokal den weiteren Signalweg über RhoA und Drok, was zur apikalen Akkumulation von Myosin führt. Myosin interagiert mit dem Aktinzytoskelett und führt zu einer apikalen Konstriktion der Zellen (Abbildung 3.1, rechts).

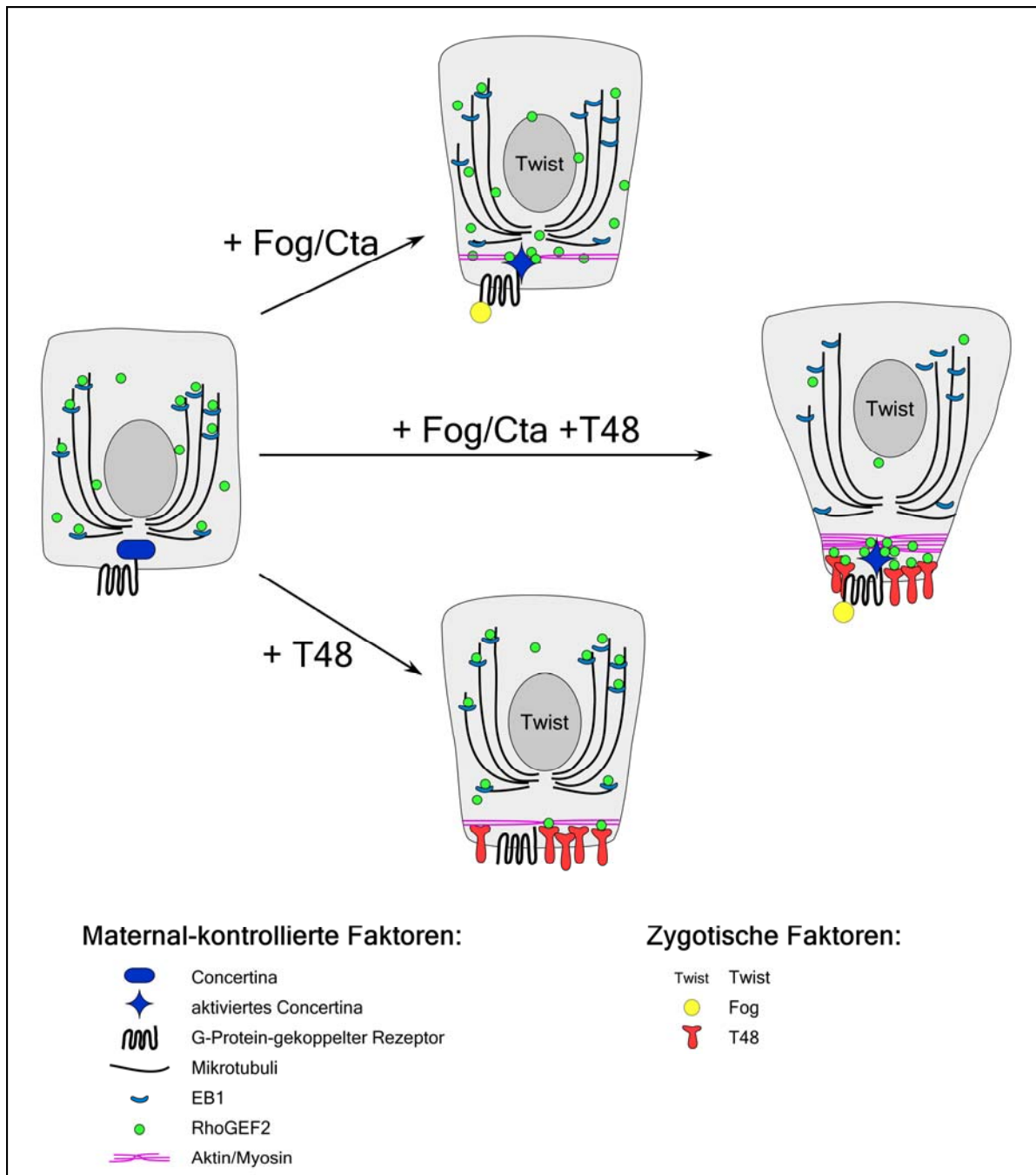


Abbildung 3.1: Modell zur Kooperation von T48 und Fog/Concertina in der Mesoderm-invagination (Details siehe Text)

Fällt nun T48 aus, wird Concertina weiterhin aktiviert und führt zu einem Ablösen von RhoGEF2 von den Mikrotubuli. Dies kann aber aufgrund des Fehlens von T48 nicht mehr rasch und in großen Mengen apikal konzentriert werden. Ein kleiner Teil von RhoGEF2 gelangt aber durch normale Diffusion an die apikale Membran und kann dort den Signalweg zur Akkumulation von Myosin aktivieren. Jedoch dauert dies länger als unter normalen Bedingungen. Daher kommt es zu einem verspäteten

Einsetzen und einem unkoordinierteren Ablauf der Gastrulation, wie es in Embryonen der Defizienz *Df(3R)CC1.2* zu beobachten war (Abbildung 3.1, oben).

In Embryonen, in denen Fog oder Concertina fehlt, kann RhoGEF2 nicht kontrolliert von den Mikrotubuli gelöst werden. Doch auch in diesen Embryonen wird RhoGEF2 durch Turnover von den Mikrotubuli gelöst. Einige dieser RhoGEF2-Moleküle gelangen in den apikalen Bereich der Zelle und werden dort durch Interaktion mit T48 angereichert. Somit kann auch in Abwesenheit des Fog/Concertina-Signalweges RhoGEF2 apikal akkumuliert werden. Auch in diesem Fall dauert es länger als im Wildtyp, bis ausreichende Mengen RhoGEF2 apikal vorhanden sind, um den Signalweg über RhoA zu aktivieren und Myosin zu akkumulieren. Somit ist die Mesoderminvagination auch hier nicht blockiert, sondern setzt nur verzögert ein, so wie man es in *fog*-mutanten Embryonen oder Embryonen von homozygot *concertina*-mutanten Müttern beobachtet (Abbildung 3.1, unten).

Fallen nun aber beide Signale aus, wie in *cta/T48*-mutanten Embryonen, so kann RhoGEF2 weder in grossen Mengen von den Mikrotubuli gelöst werden, noch apikal festgehalten werden. Die geringen Mengen RhoGEF2, die durch Diffusion in den apikalen Bereich der Zelle gelangen, können nicht festgehalten werden. Somit kommt es zu keiner apikalen Aktivierung des RhoA-Signalweges, der zur Akkumulation von Myosin und damit zur aktomyosin-basierter Konstriktion der apikalen Seite der Zellen führen würde. Die Invagination des Mesoderms ist vollständig blockiert, wie es in *cta/T48*-mutanten Embryonen beobachtet wurde.

In dem Modell von Rogers *et al.* (2004) wird davon ausgegangen, dass die Plus-Enden der Mikrotubuli nach apikal gerichtet sind. Allerdings sind die Plus-Enden der Mikrotubuli zu diesem Zeitpunkt nach basal ausgerichtet, nur ein geringer Anteil ist nach apikal gerichtet. Für das hier aufgestellte Modell muss also davon ausgegangen werden, dass Concertina sehr früh mit den EB1-RhoGEF2-Komplexen interagiert. Noch bevor diese entlang der Mikrotubuli nach basal gelangen können, wird RhoGEF2 apikal durch aktiviertes Concertina von EB1 abgelöst und durch Interaktion mit T48 an der apikalen Membran angereichert. Das Modell impliziert, dass RhoGEF2 und Concertina miteinander interagieren. Von den Homologen von RhoGEF2 und Concertina aus dem Menschen ist bekannt, dass PDZ-RhoGEF über die RGS-Domäne mit $G_{\alpha 12}$ und $G_{\alpha 13}$ interagiert (Hart *et al.* 1998; Kozasa *et al.* 1998; Fukuhara *et al.* 1999). Da auch RhoGEF2 eine RGS-ähnliche Domäne besitzt, wird postuliert, dass RhoGEF2 über diese Domäne mit Concertina interagiert. Für weitere

RhoGEFs im Menschen, LARG und p115RhoGEF konnte gezeigt werden, dass diese ebenfalls über die RGS-ähnliche Domäne eine Verbindung zwischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und RhoA oder anderen Effektormolekülen herstellen (Booden *et al.* 2002; Ying *et al.* 2005). In *C. elegans* konnte CeRhoGEF als GEF mit RGS-ähnlicher Domäne identifiziert werden. CeRhoGEF interagiert über die RGS-Domäne mit GPA-12, dem *C. elegans*-Homolog von $G_{\alpha 12/13}$ (Yau *et al.* 2003) und ist an der Steuerung der Embryonalentwicklung und der Entwicklung des Nervensystems beteiligt (Jansen *et al.* 1999; van der Linden *et al.* 2003; Yau *et al.* 2003). Diese Ergebnisse deuten auf eine hohe Konservierung des $G_{\alpha 12}$ -RGS-RhoGEF2-Signalweges in der Evolution hin. Ob jedoch RhoGEF2 und Concertina in *Drosophila* miteinander agieren, müsste in weiteren Experimenten, wie z. B. in Schneiderzellen oder Ko-Immunopräzipitationen, bestätigt werden. Es wäre auch interessant zu untersuchen, ob in den in anderen Organismen identifizierten $G_{\alpha 12}$ -RGS-RhoGEF2-Signalwegen Proteine wie T48 eine ähnliche Funktion zur lokalen Anreicherung von Komponenten der Signalwege übernehmen.

T48 ist nicht im Mitteldarmprimordium exprimiert und somit nicht an der Lokalisierung von RhoGEF2 in diesen Zellen beteiligt. Hier jedoch führt auch schon die Deletion des Fog/Concertina-Signalweges zu einer vollständigen Blockierung des Prozesses, ebenso wie das Fehlen von RhoGEF2. Die Beteiligung anderer Faktoren an der Lokalisierung von RhoGEF2 ist somit unwahrscheinlich. Hier reicht anscheinend die lokale apikale Aktivierung von Concertina aus, die Konstriktionen auf die apikale Seite der Zellen zu beschränken und zeitlich zu koordinieren. Möglicherweise kann Concertina alleine durch eine Interaktion mit RhoGEF2 ausreichende Mengen RhoGEF2 akkumulieren. Möglicherweise reichen hier geringere Mengen von apikal angereichertem RhoGEF2 als im Mesoderm aus, um rasche apikale Konstriktionen zu erreichen.

RhoGEF2 ist zusätzlich an der Morphogenese des Flügelscheiben-Epithels und der Invagination der Speicheldrüsen beteiligt (Nikolaidou *et al.* 2004; Chandrasekaran *et al.* 2005). Mutationen in *RhoGEF2* führen zu abnormalen Faltungen des Epithels der Flügelscheiben und zu einer Blockierung der Invagination der Zellen der Speicheldrüsen. Es wird postuliert, dass RhoGEF2 in beiden Geweben durch den Fog/Concertina-Signalweg aktiviert wird (Nikolaidou *et al.* 2004; Chandrasekaran *et al.* 2005). Bei der Morphogenese dieser Epithelien spielen ebenfalls apikale Konstriktionen der Zellen und eine Verlagerung der Zellkerne eine Rolle (Myat *et al.*

2000b; Myat *et al.* 2000a; Nikolaidou *et al.* 2004). Es wäre interessant zu untersuchen, ob *T48* in diesen Geweben exprimiert und genutzt wird, um RhoGEF2 an der apikalen Seite der Zellen zu lokalisieren und so eine lokale Konstriktion des Aktinzytoskeletts zu ermöglichen. Ist dies nicht der Falls, wie z. B. anscheinend im Mitteldarmprimordium, stellt sich die Frage, wie in diesen Geweben eine Lokalisation von RhoGEF2 erreicht wird. Es wäre zu klären, ob Concertina alleine ausreicht oder ob eine Interaktion von RhoGEF2 mit anderen Proteinen, entweder ebenfalls über PDZ-Bindemotive oder über andere Mechanismen der Proteininteraktion, notwendig für eine Lokalisation von RhoGEF2 ist. Sollte sich herausstellen, dass *T48* in diesen Geweben nicht genutzt wird, stellt sich die Frage, warum der Signalweg über Fog/Cta und RhoGEF2 in diesen Geweben konserviert ist, *T48* aber nicht und warum in der Mesoderminvagination ein weiterer Faktor wie *T48* benötigt wird. Eine mögliche Erklärung ist die Menge an RhoGEF2, die apikal akkumuliert werden muss. Bei der Ventralfurche handelt es sich im Vergleich zu z. B. den Speicheldrüsen um deutlich mehr Zellen, die gleichzeitig invaginieren müssen. Vielleicht ist hier eine exakte Koordination und stärkere Konstriktionen der Zellen und somit größere Mengen an RhoGEF2 und Myosin notwendig, um eine rasche und rechtzeitige Einwanderung aller Zellen zu ermöglichen. Diese stärkere Anreicherung könnte dann nur durch den zusätzlichen Faktor *T48* gewährleistet werden.

In Zebrafisch konnte gezeigt werden, dass auch in Vertebraten $G_{\alpha 12/13}$ -Proteine an der Regulation von Gastrulationsbewegungen beteiligt sind (Lin *et al.* 2005). $G_{\alpha 12/13}$ ist im Zebrafisch z. B. an der Regulation der Migration der eingewanderten Zellen nach dorsal und der Interkalierung von Zellen während der Konvergenz- und Extensionsbewegungen beteiligt. Es wird postuliert, dass $G_{\alpha 12/13}$ in den unterschiedlichen Prozessen von einer Vielzahl von Liganden und Rezeptoren aktiviert werden können, um so die verschiedenen Funktionen zu steuern. Bisher sind jedoch noch keine Effektormoleküle identifiziert worden. Somit ist nicht bekannt, ob auch hier Signalwege über RhoGEFs durch $G_{\alpha 12/13}$ aktiviert werden.

In *Xenopus* wurde eine weitere Möglichkeit identifiziert, Polarität in Zellen während der Gastrulationsbewegungen zu erreichen (Kwan *et al.* 2005). *Xlfc* ist ein RhoGEF, der die Polarisierung von Zellen während der Konvergenzbewegungen reguliert. *Xlfc* ist in seiner inaktiven Form an Mikrotubuli gebunden. Durch polarisierende Signale von umliegenden Zellen kommt es zu einer lokalen Depolymerisierung der Mikrotubuli und dadurch zu lokaler Aktivierung von *Xlfc*. Aktiver *Xlfc* induziert die

lokale Inhibierung von Lamellopodien und ermöglicht so die Ausbildung von lokalen Ausstreckungen der Zellen, die mit den Nachbarzellen Kontakt aufnehmen und Konvergenzbewegungen ermöglichen.

3.7 T48 ist Signal X

T48 und der Fog/Concertina-Signalweg sind die beiden entscheidenden Signale, die zur apikalen Konstriktion der Zellen während der Mesoderminvagination führen. T48 ist somit Signal X, dessen Transkription von Twist aktiviert wird und welches an der apikalen Lokalisation von RhoGEF2 beteiligt ist.

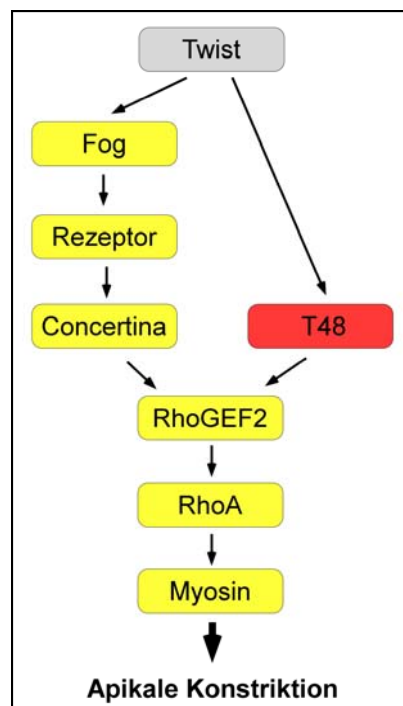


Abbildung 3.2: Modell zur Regulation der apikalen Konstriktion der Zellen während der Mesoderminvagination (Details siehe Text)

Möglicherweise gibt es auch einen weiteren Faktor Y oder mehrere Faktoren, die zusätzlich an der Steuerung der Mesoderminvagination beteiligt sind. Es ist jedoch davon auszugehen, dass weitere Faktoren keine essentiellen Funktionen erfüllen, da die Deletion von T48 und Fog/Concertina ausreicht, um die Mesoderminvagination vollständig zu blockieren. Bisher ist jedoch nicht klar, wie es z. B. zum Abflachen der apikalen Seite der Zellen kommt oder wie die Zellkerne ihre apikale Position

verlieren. Beides scheint jedoch mit der Konstriktion der apikalen Seite in Zusammenhang zu stehen, denn in *cta/T48*-mutanten Embryonen finden auch diese Prozesse nicht wie im Wildtyp statt.

3.8 Rolle von T48 und Fog/Concertina in der Verlagerung der Adhärenzverbindungen

Der Verlust von T48 hat keine Auswirkung auf die Adhärenzverbindungen während der Mesoderminvagination. In *cta/T48*-mutanten Embryonen jedoch lösen sich die Adhärenzverbindungen von ihrer subapikalen Position, akkumulieren aber nicht an der apikalen Seite der Membran. Bisher wurde davon ausgegangen, dass die Umlokalisierung der Adhärenzverbindungen eine Folge der mechanischen Kraft der Konstriktion des Aktinzytoskeletts ist: die Adhärenzverbindungen sind Ansatzstelle für das Aktinzytoskelett und durch apikale Konstriktion werden die Adhärenzverbindungen in eine apikale Position gezogen (Dawes-Hoang *et al.* 2005). Doch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Verlagerung der Adhärenzverbindungen erfolgt, bevor eine apikale Akkumulation des kontraktiven Aktinzytoskelett stattfindet, da die Verlagerung des Armadillo-Signals nach apikal erfolgt, bevor es zur Akkumulation von RhoGEF2 kommt. Ausserdem verschwindet Armadillo in den Doppelmutanten an der subapikalen Position, reakkumuliert aber nicht an der apikalen Membran. Dies weist darauf hin, dass es sich bei der Verlagerung der Adhärenzverbindungen nicht nur um ausschließliche Verlagerung handelt, sondern dass zumindest ein teilweiser Ab- und Wiederaufbau stattfindet.

Auffällig ist jedoch, dass Adhärenzverbindungen apikal nicht angereichert werden, aber trotzdem der epitheliale Verband der mesodermalen Zellen aufrechterhalten wird. In Embryonen mit Mutationen, die die Ausbildung von Adhärenzverbindungen verhindern, wie z. B. *stardust* und *bazooka*, verlieren die Zellen den epithelialen Charakter und werden zu mesenchymalen Zellen. Dies jedoch konnte in den *cta/T48*-mutanten Embryonen nicht beobachtet werden. Es könnte damit zusammenhängen, dass die Ausbildung der Adhärenzverbindungen nicht von Beginn an blockiert ist, sondern nur die Umlagerung verhindert wird. Möglicherweise ist das ausreichend, um den Zellverband bis zum Abschluss der Mesoderminvagination

aufrechtzuerhalten. Es könnte auch sein, dass zwar Armadillo nicht an der apikalen Membran akkumuliert wird, Teile der Verbindungen aber weiterhin vorhanden sind, was eine Aufrechterhaltung des Zellverbandes erklären würde. Dies könnte z. B. durch den Nachweis anderer Proteine der Adhärenzverbindungen oder durch eine elektronenmikroskopische Analyse der Adhärenzverbindungen in den Doppelmutanten geklärt werden. Es könnte auch eine Rolle spielen, dass die Adhärenzverbindungen in den nicht-mesodermalen Zellen weiterhin intakt sind. In Mutanten für Komponenten der Adhärenzverbindungen sind die Adhärenzverbindungen des gesamten Embryos betroffen, hier jedoch nur die der mesodermalen Zellen.

Obwohl es in Embryonen der *concertina/T48*-Doppelmutante nicht zu einer Akkumulation von Armadillo an der apikalen Membran kommt, sind die Zellen des Mesoderms weiterhin von den ektodermalen Zellen unterscheidbar. Armadillo verschwindet in den mesodermalen Zellen subapikal, während es in den nicht-mesodermalen Zellen subapikal erhalten bleibt. Die Analyse von *snail*-mutanten Embryonen zeigt, dass das subapikale Verschwinden der Adhärenzverbindungen in den mesodermalen Zellen von Snail abhängt. Welche Funktion Snail jedoch genau hat, muss in weiteren Experimenten geklärt werden. Ein Kernbestandteil der Adhärenzverbindungen ist DE-Cadherin (Oda *et al.* 1994). Snail ist ein Repressor von zygotisch-kontrolliertem DE-Cadherin im Mesoderm (Oda *et al.* 1998). Trotz Repression durch Snail findet man DE-Cadherin in den mesodermalen Zellen, da DE-Cadherin auch maternal kontrolliert wird (Uemura *et al.* 1996). Die Repression von zygotischem DE-Cadherin ist notwendig für den Übergang von einem epithelialen Verband zu Zellen mit mesenchymalem Charakter am Ende der Mesoderminvagination. Ob eine Repression des zygotischen DE-Cadherins für die Auflösung der Adhärenzverbindungen notwendig ist, könnte durch die Analyse von *DE-Cadherin*-Mutanten und *snail/DE-Cadherin*-Doppelmutanten getestet werden.

Embryonen, die Mutationen in Genen tragen, die an der Ausbildung der Adhärenzverbindungen oder des Subapikalen Komplexes beteiligt sind, wie z. B. *bazooka* oder *armadillo*, zeigen deutliche Störungen in der Mesoderminvagination. Diese sind darauf zurückzuführen, dass die Zellen die Adhärenzverbindungen nicht korrekt ausbilden können, ihre Zellpolarität verlieren und mesenchymalen Charakter annehmen (Müller *et al.* 1996; Tepass *et al.* 2001). Dadurch können die normalen Gastrulationsbewegungen, die ein Epithel voraussetzen, nicht erfolgen. Intakte

Adhärenzverbindungen sind somit notwendig für die Mesoderminvagination. Es ist jedoch noch unklar, ob eine nicht korrekt ablaufende Mesoderminvagination einen Einfluss auf die Ausbildung und das Erhaltenbleiben vollständiger Adhärenzverbindungen hat. In Vertebraten-Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass die Akkumulation von Cadherinen an Zellkontakten in der Abwesenheit von aktiviertem Myosin deutlich reduziert war. Myosin-Aktivität scheint notwendig zu sein, damit sich E-Cadherin lokal an den Zell-Zell-Kontakten akkumulieren kann. Es wird angenommen, dass Myosin als Teil eines positiven Feedback-Signalwegs fungiert, der die Lokalisation von Cadherinen an der Zelloberfläche nach homophiler Interaktion stabilisiert (Shewan *et al.* 2005). Ähnliches könnte auch in *Drosophila* der Fall sein. Myosin könnte durch DE-Cadherin an der Membran lokalisiert werden und dann seinerseits wiederum zu einer Stabilisierung des DE-Cadherin-Komplexes beitragen.

3.9 PDZ-Bindemotive als Mechanismus zur Lokalisation von Proteinen

T48 ist kein hochkonserviertes Gen. Bisher konnten homologe Proteine nur bei anderen Dipteren gefunden werden, wie z. B. *Anopheles gambiae*. Da sich bei keinem der Organismen außerhalb der Dipteren, für die Genomdaten vorhanden sind, homologe Proteine erkennen lassen, legt dies die Vermutung nahe, dass T48 eine Neuentwicklung im Bereich der Insekten, vielleicht sogar bei den Dipteren ist. In *Drosophila* läuft die Mesoderminvagination in einer sehr kurzen Zeit ab. Daher ist es notwendig, abzusichern, dass alle Prozesse genau zum richtigen Zeitpunkt einsetzen. T48 sichert die rasche apikale Akkumulation von RhoGEF2 und ermöglicht zusammen mit dem Fog/Concertina-Signalweg eine genaue zeitliche Kontrolle der Mesoderminvagination. Damit wird gewährleistet, dass der zeitliche Ablauf der Gastrulation genau kontrolliert wird und die Embryonalentwicklung nicht verzögert wird. In Vertebraten dauert die Embryonalentwicklung deutlich länger. Dadurch ist möglicherweise die Notwendigkeit eines Faktors wie T48, der keine essentielle Funktion erfüllt und nur den raschen Ablauf eines Prozesses gewährleistet, nicht gegeben. Auch in *C. elegans* konnte kein Homolog von T48

gefunden werden. Doch die zellbiologischen Prozesse während der Gastrulation in *C. elegans* ähneln denen in *Drosophila* (Nance *et al.* 2002) sehr. Zwei ventrale Zellen, die die Vorläufer des Endoderms sind, invaginieren an der ventralen Seite, dann folgen die mesodermalen Zellen. Diese invaginierenden Zellen zeigen apikale Konstriktionen und eine Anreicherung von Myosin an der apikalen Membran. Ob der in *C. elegans* identifizierte $G_{\alpha 12/13}$ -RGS-RhoGEF-Signalweg (Yau *et al.* 2003) an diesen Prozessen beteiligt ist, ist unklar. Es ist jedoch möglich, dass die apikale Lokalisierung von Myosin über einen Signalweg über einen RhoGEF und RhoA erreicht wird. In diesem Fall wäre es interessant, ob hier der Mechanismus, RhoGEF apikal über eine Bindung an andere Proteine über die PDZ-Domäne anzureichern, konserviert ist.

Interaktionen über PDZ-Motive werden sowohl in *Drosophila* als auch in anderen Organismen genutzt, um Proteinkomplexe in bestimmten Bereichen einer Zelle zu akkumulieren und Zellpolarität zu erreichen (Bilder 2001). Die Interaktionen über PDZ-Bindemotive ist somit ein vielgenutzter Weg, Proteine an bestimmten Stellen in Zellen anzureichern, um ihre Wirkung lokal zu konzentrieren.

Zumindest in Vertebraten wird die auch die Möglichkeit, RhoGEFs an bestimmten Bereichen der Zelle durch Interaktion mit Proteinen mit PDZ-Bindemotiven zu lokalisieren und somit Zellformveränderungen zu induzieren, genutzt. Während der Rückbildung von Wachstumskegeln in Neuronen assoziiert das membranständige Plexin B1 mittels seines PDZ-Bindemotivs mit den Rho-Guanine-Nukleotid-Austauschfaktoren PDZ-RhoGEF und LARG. Die Aktivierung von Plexin B1 durch Semaphorin-4D reguliert die Aktivität von PDZ-RhoGEF/LARG, was dann zur Aktivierung von RhoA führt. RhoA reguliert Effektormoleküle, die zum Kollabieren der Wachstumskegel in Neuronen führt (Swiercz *et al.* 2002).

Es scheint folglich so zu sein, dass T48 in der Evolution nicht konserviert ist, dass der Mechanismus aber, Zellformveränderungen durch Lokalisation von bestimmten Proteinen über PDZ-Bindemotive zu erreichen, konserviert ist.

4 Material

4.1 Chemikalien und Materialien

Chemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen) und Invitrogen (Carlsbad, USA) bezogen, Plastikware von den Firmen Greiner (Solingen) oder VWR (Darmstadt).

4.2 Antikörper, Farbstoffe und Seren

Folgende Antikörper wurden mit den angegebenen Konzentrationen verwendet:

Anti-Evenskipped aus Kaninchen, 1:5000	M. Frasch, New York (Frasch <i>et al.</i> 1987)
Anti-Twist aus Kaninchen, 1:5000	S. Roth, Köln (Roth <i>et al.</i> 1989)
Anti-Phosphotyrosin aus Maus, 1:10	D. Morrison, Frederick
Anti-RhoGEF2 aus Kaninchen, 1:1000	J. Grosshans, Heidelberg (Grosshans <i>et al.</i> 2005)
Anti-Armadillo aus Maus, 1:3000	E. Wieschaus, New York (Riggleman <i>et al.</i> 1990)
Anti-Neurotactin Aus Maus, 1:5000	C. Goodman, Berkeley (Hortsch <i>et al.</i> 1990)
Anti-Bazooka aus Kaninchen, 1:500	A. Wodarz, Düsseldorf (Wodarz <i>et al.</i> 1999)
Anti-Hämagglutinin (HA) aus Ratte 1:1000 (Schneiderzellen)	Roche, Mannheim

1:100 (Embryonen)	
Anti-Kaninchen, biotinyliert aus Ziege, 1:500	Dianova, Hamburg
Anti-Ratte, Alexa488 aus Ziege, 1:500	MoBiTec, Göttingen
Anti-Ratte, Alexa568 aus Ziege, 1:500	MoBiTec, Göttingen
Anti-Kaninchen, Alexa488 aus Ziege, 1:500	MoBiTec, Göttingen
Anti-Kaninchen, Alexa568 aus Ziege, 1:500	MoBiTec, Göttingen
Anti-Maus, Alexa568 aus Ziege, 1:500	MoBiTec, Göttingen
Anti-Digoxygenin, Alkalische Phosphatase-gekoppelt aus Maus, 1:500	Roche, Mannheim
Hoechst-Farbstoff 33258 (DAPI) 1:10000	Hoechst, Frankfurt
Rattenserum	Dianova, Hamburg
Ziegenserum (NGS)	Dianova, Hamburg
Rinder-Serumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Fötale Rinderserum (FBS) hitzebehandelt und steril aliquotiert	Sigma, Deisenhofen

4.3 Fertige Reagenziensätze („Kits“)

Vectastain ABC Elite Kit	VectorLabs, Burlingame USA
DIG-RNA-Labeling Mix	Boehringer, Mannheim
GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare, Braunschweig
Jetstar Plasmid Midiprep Kit	Genomed, Löhne

MEGAscript High Yield Transcription Kit	Ambion, Austin, USA
<i>In vitro</i> Translation Kit	NEN/ PerkinElmer, Boston, USA
Expand High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim

4.4 Enzyme und DNA-/Protein-Marker

Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt
Klenow	New England Biolabs, Frankfurt
1kb DNA-Leiter	Invitrogen, Carlsbad, USA
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt
RNAsin	Promega, Wisconsin, USA
Cellfectin Reagenz	Invitrogen, Carlsbad, USA
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma, Deisenhofen
Retikulozytenlysat	Promega, Mannheim
Precision Plus Protein Standard prestained	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
ProteinaseK	Qiagen, Hilden

4.5 Einbettungsmedien

Araldit	Serva, Heidelberg
Vectashield	VectorLabs, Burlingame, USA
Aquapolymount	Polysciences, Eppelheim

4.6 Fliegenstämme

w^{118}	Stammsammlung Leptin hier w^- , verwendet als Wildtyp
-----------	--

<i>w; BI/SM1</i>	Stammsammlung Leptin
<i>w; TM3/TM6</i>	Stammsammlung Leptin
<i>Df(3R)TI^P</i>	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center
<i>Df(3R)ro^{XB3}</i>	K. Anderson, New York
<i>Df(3R)ro⁸⁰</i>	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center
<i>Df(3R)TI^I</i>	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center
<i>Df(3R)TI^X</i>	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center
<i>Df(3R)D605</i>	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center
<i>Df(3R)CC1.2</i>	D. Strutt, Sheffield
<i>cta^{R10}/CyO</i>	K. Barrett, London
<i>Df(2L)TE116GW11</i>	Stammsammlung Leptin
<i>w; P(w⁺ mat α-tub Gal VP16) (matGal4)</i>	D. St. Johnston, Cambridge
<i>C(3L)st; C(3R)e</i>	E. Wieschhaus, Princeton
<i>w; Df(3R)CC1.2</i>	diese Arbeit
<i>cta^{R10}/CyO; Df(3R)CC1.2</i>	diese Arbeit
<i>2xPEeT48/CyO</i>	diese Arbeit
<i>w; 2xPEeT48/CyO; Df(3R)CC1.2</i>	diese Arbeit
<i>UAS T48-HA/SM1</i>	diese Arbeit

4.7 Oligonukleotide

Oligonucleotide wurden bei der Firma Roth (Karlsruhe) bestellt.

Nr.	Name	Sequenz 5' - 3'
1	T48 cDNA Fw1	CAACCGATTTGCACGTACCG
2	T48 cDNA Fw2	TCTATGTGAAGTGAGTGC
3	T48 cDNA Fw3	TGACGACAAGTTCCCCTACTGC
4	T48 cDNA Fw4	CAAACAGAAGCTCATCAACG
5	T48 cDNA Fw5	ACCACGAGGTGCTCTACG
6	T48 cDNA Fw6	CTCATCTCTGATCTCAACG
7	T48 cDNA Fw7	TAGATCAGTTAAGCAAGC
8	T48 cDNA Fw8	GATTATAAACCTTAGCG
9	T48 cDNA Rv1	AATTCAATTTGCGCTCGACG

10	pbluescript Fw	GTTTTCCCAGTCACGAC
11	pbluescript Rv	CAGGAAACAGCTATGAC
20	T48 ORF Fw2a	CATCTGCCATCTTCTGGCTC
21	T48 ORF Rv2	GTCCAAGTGCTAATCGTGG
22	scrb Fw	GTGCATTCCCATCTTCAAG
23	scrb Rv	CAATGCAAACAAGTCCAC
24	Pdf Fw	GTTCAATTCGCAAGTCTCC
25	Pdf Rv	CGACTTGAAATCTGGTAC
26	Ald Fw	GCTCTTTCATTTCGAGTTC
27	Ald Rv	CACTGATAGCAAGCTCAC
28	Amon Fw	CCTTGGAATCCGATATCC
29	Amon Rv	GATGTTACGACCTTATCGG
30	TI Fw	CGATAGTTAACATCCTGCC
31	TI Rv	CAAAGTCAAACCAGATCCG
32	Sda Fw	GTTACGTCAACGAAGGTG
33	Sda Rv	CATTCAGCAAAACACCGAC
34	Ets97D Fw	CACAGATCACTTGTTGAGC
35	Ets97D Rv	CCTATCAGTCAGTCAAGAG
36	Tsp97E Fw	CAAGACGAGAATCCTTGAG
37	Tsp97E Rv	GATCATTCTGTTTCATGCTG
38	NepYr Fw	GCTGTTCATCCTGAACTAC
39	NepYr Rv	GGAGCTTTATAAGCTTTGC
40	CG11929 Fw	CTGGTCTACAATGCAGTAG
41	CG11929 Rv	GTCACTAGTAGCTTGGTTG
42	CG5467 Fw	GGTTAGAGCCAGCAAATC
43	CG5467 Rv	CTATAACGACTCAGTCGAC
44	CG5471 Fw	GAACCATCTCACACCATC
45	CG5471 Rv	CATCTCCTCGTATGTGC
46	CG14243 Fw	CATTAGTTCCTCCTGTCAG
47	CG14243 Rv	CACGTGCAAGTTAACTAGC
48	beat-VII Fw	CATGCACAATTAGCTGACC
49	beat-VII Rv	GAGATCCATTGGCGATATTG
50	CG14250 Fw	CAATTACCAAGCTGCTG
51	CG14250 Rv	GCAGTAACTCCTCTCAC

52	CG14253 Fw	CTAACCACCAGCGATATTG
53	CG14253 Rv	GATGCAGCTCTCATCTATC
54	CG31077 Fw	CATGGATATGTCTGATGCG
55	CG31077 Rv	GTATGTACCACCTGGACAC
56	Gr97a Fw	CACGATTTGTCTTTACGC
57	Gr97a Rv	CTGCTTCCACTCGTATTC
58	CG5521 Fw	CAGCCGATAAGCAAGTTC
59	CG5521 Rv	CTGCTTCCACTCGTATTC
60	CG14248 Fw	CCACACTCTCACTTTATG
61	CG14248 Rv	CTCAACTGGCAGATTAGG
62	CG5480 Fw	CCAACACGTTAACAGATTG
63	CG5480 Rv	CTCATCAATCAGCTGCAC
64	T48 intra Fw	ATATAGATCTATGCGGCGAAG
65	T48 intra Rv	ACGGAGCTGTAAAGATCTATAT
67	Rb97D Fw	GAGACCAATATATCCGTG
68	Rb97D Rv	CAGCAGTCTTCGCAACAG
69	CG14254 Fw	CACTCAATGGTAAGTGGG
70	CG14254 Rv	CAATGGAGCGAAATCCTC
71	CG31075 Fw	CTGGGCATAAGTATGATC
72	CG31075 Rv	CTGCTATCAGTGCTCATC
73	CG31076 Fw	ATGCAGCACAATCGAGCAC
74	CG31076 Rv	CTTATCCAGACGACAAGTG
75	T48 intra delta Cterm Rv	TTTCGACCGCAGTAAAGATCTATAT
76	CG31072 Fw	GTA CT CGAATTCAGGCTAC
77	CG31072 Rv	CAATTAACCGCAGGTTGC
78	BcDNA:LD09009 Fw	GTCACGCAGAACTACTG
79	BcDNA:LD09009 Rv	GTTGATTCACGTACACCC
80	TI(2) Fw	CGACGATGAGCTATTGTTC
81	TI(2) Rv	CAGATTCAAGGACCTTACAC
82	T48 Rv3	CTAGTTAGCTTGTCGATG
84	crb intra+3'UTR Rv	TAGATGACATACAGATCTATAT
86	CG31078 Fw	ATGCCAAGCAATGTCAGC
87	CG31078 Rv	CAATGCGGCAACAACAGCT
88	CG5500 Fw	GGGCTGCATTATTGTTTG

89	CG5500 Rv	CTTGTA CTTAGTGTGTAAG
92	RhoGEF2 PDZ Fw	ATATGAATTCATGTCCCGGGAT
93	RhoGEF2 PDZ Rv	AACTTCAGGCGAATTCATAT
94	Scrb PDZ Fw	ATATGAATTCATGGCAGAGGCT
95	Scrb PDZ Rv	GGCCAGGCCGGGAATTCATAT
96	Dlg PDZ Fw	ATATGAATTCATGGACATTCAG
97	Dlg PDZ Rv	AAGCACGGCGAGAATTCATAT
98	Sdt PDZ Fw	ATATGAATTCATGATTCGTATC
99	Sdt PDZ Rv	GCGGGTAGTCCGAATTCATAT
100	crb intra-CycA Fw	TATAGATATCATCGCGGGAGCC
103	T48 HA-intern Sph1 Fw	CTGTACCCCTACGATGTGCCCGATTACG CAGGTACCAGCATG
104	T48 HA-intern Sph1 Rv	CATGCTGTACCCCTACGATGTGCCCGAT TACGCAGGTACCAG
113	pGEX 5'	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
114	pGEX 3'	CCTCTGACACATGCAGCTCCCGG
115	pRmHa/pDeGFP Fw	AAAGACCCGTGTGTAAAGCCG
116	pDeGFP Rv	GAGCTGGACGGCGACGTAAAC
118	2xPEeT48 ohne PDZ Fw	ATATGGATCCTAACCGCATCACAAA
119	2xPEeT48 ohne PDZ Rv	AATGCTGCGGCCTGCTCTAGAATAT
120	I(2)02045 cds Fw	CAGTAACAGGATCAAGAGCAAGGT
121	I(2)02045 cds Rv	TTAGTTTTATCCTTTAAACGATAC
122	I(2)02045 in pDeGFP Fw	ATATGAATTCATGCCGCTCTTCACA
123	I(2)02045 in pDeGFP Rv	ACCAGTCCCAAGGAGAATTCATAT
124	I(2)02045 in pGEX Fw	ATATGGATCCATGCCGCTCTTCACA
125	I(2)02045 in pGEX Rv	ACCAGTCCCAAGTAACTCTCGAGATAT
132	cta für 5'FLAG in pRmHa Fw	ATATGGTACCATGTCTGGCATTACA
133	cta für 5'FLAG in pRmHa Rv	ATATTCTAGATTACTACTGAAGCATAAG
134	5'FLAG in pRmHa Fw	CGATATCATGGATTACAAGGACGATGAC GATAAGGAGCT
135	5'FLAG in pRmHa Rv	CCTTATCGTCATCGTCCTTGTAATCCATG ATATCGAGCT
140	RhoGEF2 5'FLAG Fw	TATGAGATCTATGGATATCATGGATTACA AGGACGATGACGATAAGCA

141	RhoGEF2 5'FLAG Rv	TGAGATCTATGGATATCATGGATTACAAG GACGATGACGATAAGCATA
150	T48 delta ITTEL Fw	ATATGGATCCTTTTCGGCAGCAGT
151	T48 delta ITTEL Rv	ATATGGATCCTTACTCGTCCTGCGGTCC

4.8 Verwendete Vektoren

Vektor	Quelle
pCRII-TOPO	Invitrogen, Carlsbad, USA
pKS	Stratagene
pUAST	Rubin <i>et al.</i> 1982
2xPEßGal	Jiang <i>et al.</i> 1991; Jiang <i>et al.</i> 1993
pSP64T	R. Wilson; (Krieg <i>et al.</i> 1984)
pGEX-4T-2	Amersham Biosciences, Braunschweig
pGEX-4T-3	Amersham Biosciences, Braunschweig
pSP72	Promega, Mannheim
pRmHa	Bunch <i>et al.</i> 1988
pDeGFP	Bunch <i>et al.</i> 1988

4.9 Puffer und Lösungen

Ampicillin	100 mg/ml Stocklösung in 50 % Ethanol 0,1 mg/ml Endkonzentration
Apfelsaftagar	375 ml Wasser 13,5 g Agar 6,25 g Zucker 1 g Nipagin 125 ml Apfelsaft
Araldit	57,4 g Araldit CY212 48 g Härter HY964 2 ml Beschleuniger DY964

Blocklösung	1 % BSA in PBT + 5 µl NGS
Coomassie-Entfärber	10 % Essigsäure 30 % Ethanol
Coomassie-Färber	0,25 % Coomassie Brilliant Blue 50 % Methanol 10 % Essigsäure
Färbelösung DAB-Färbung	500 µl PBT 50 µl DAB (Stock: 1 mg/ml in H ₂ O) Für Blaufärbung: 0,6 µl NiCl ₂ (6 %ige Stocklösung in H ₂ O) 0,6 µl CoCl ₂ (6 %ige Stocklösung in H ₂ O)
Hitzefix-Salzlösung	0,4 % NaCl 0,03 % TritonX-100
Homogenisierungspuffer (Single-Embryo-PCR)	10 mM Tris pH 8,3 0,5 % Tween20 0,5 % NP-40 50 µM KCl 0,2 µl ProteinaseK
Hybridisierungslösung	50 ml Formamid 25 ml 20x SSC 0,1 ml Heparin (50 mg/ml) 1 ml 10 % Tween20 auf 100 ml mit A. dest
<i>in situ</i> -Färbelösung (pro Ansatz)	1 ml Färbepuffer 3,5 µl NBT 3,5 µl X-Phosphat
NBT (4-Nitrotetrazoliumchlorid)	10 mg/ml in 70 % Dimethylformamid
X-Phosphat (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat)	10 mg/ml in Dimethylformamid
<i>In situ</i> -Färbepuffer	100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂ 100 mM Tris, pH 9,5 0,1 % Tween20
IP-Puffer	10 % Glycerol

	50 mM HEPES pH 7,5
	150 mM NaCl
	1 % TritonX-100
	1,5 mM MgCl ₂
	1 mM EGTA
IP-Waschpuffer	10 % Glycerol
	20 mM HEPES pH 7,5
	0,1 % TritonX-100
	150 mM NaCl
Kanamycin	50 mg/ml Stocklösung in H ₂ O
	30 µg/ml Endkonzentration
Lämmli, 4x	8 % SDS
	400 mM Dithiothreitol (DDT)
	240 mM Tris pH 6,8
	0,004 % Bromphenolblau
	40 % Glycerol
Laufpuffer, 5x	72 g Glycin
	15 g Tris
	5 g SDS
	auf 1 l mit A. dest
LB-Agar	LB-Medium mit 1,2 % Agar
LB-Medium	10 g Bactotrypton
	5 g Hefeextrakt
	10 g NaCl
	auf 1 l mit A. dest
	pH 7,2
Maismehlagar	90 g Agar
	1 kg Maismehl
	1 kg Malzextrakt
	230 g Zuckerrübensirup
	120 ml 20 % Nipagin in 70 % Ethanol
	360 ml 20 % Propionsäure
	auf 12 l mit A. dest
PBS, 10x	80 g NaCl

	2 g KCl
	14,4 g Na ₂ HPO ₄
	2,4 g KH ₂ PO ₄
	auf 1 l mit A. dest
	pH 7,4
PBT	1x PBS + 0,1 % Tween20
Sammelgel	1,3 ml 30:0,8 Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung
	2,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8
	6,1 ml A. dest
	50 µl 20 % SDS
	10 µl TEMED
	50 µl Ammoniumpersulfat (APS)
SSC, 20x	175,3 g NaCl
	88,2 g Natriumcitrat
	pH 7
Stopp- und Auftragspuffer	0,5 % (w/v) Xylencyanol
	0,5 % (w/v) Bromphenol
	40 % (v/v) Glycerin in TAE-Puffer
TAE	200 mM Tris-Acetat, pH 7,7
	10 mM EDTA
Trenngel, 12,5 %	4,2 ml 30:0,8 Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung
	1,25 ml 3 M Tris-HCl pH 8,9
	4,4 ml A. dest
	50 µl 20 % SDS
	5 µl TEMED
	50 µl Ammoniumpersulfat (APS)
2x TY-Medium	16 g Bactotrypton
	10 g Hefeextrakt
	5 g NaCl
	auf 1 l mit A. dest
	pH 7,0

4.10 Computer-Software

Adobe Photoshop 7.0

Canvas 9

Vector NTI 9

5 Methoden

5.1 Fliegenhaltung

Die Fliegenhaltung erfolgte in kleinen Kunststoffröhrchen mit Watte-Cerapenstopfen, die zu einem Viertel mit Maismehlagar gefüllt waren. Die Fliegen wurden entweder bei 18 °C oder 24 °C gehalten.

5.2 Ablagen von Embryonen

Ablagen von Embryonen wurden in kleinen Ablagekäfigen durchgeführt, die auf auswechselbare Schalen mit Apfelsaftagar und ein wenig Frischhefe gesetzt wurden. Die Ablagen erfolgten bei 24 °C, wurden alle 2 Std gewechselt und dann 2 Std nachentwickelt, so dass die Embryonen ein Alter von 2-4 Std hatten.

5.3 Dechorionisieren von Embryonen

Zur Entfernung des Chorions wurden die Embryonen für eine Minute in einem 1:1-Gemisch aus Wasser und Bleiche inkubiert, mit Wasser von der Agarplatte in ein Netzchen gespült und gründlich mit Wasser gewaschen.

5.4 Fixieren von Embryonen

5.4.1 Standardfixierung mit 4 % Formaldehyd in PBS

Die dechorionisierten Embryonen wurden in ein Eppendorfgefäß mit einem 1:1-Gemisch aus 4 % Formaldehyd in PBS und Heptan gegeben und für 15 min auf einem Rollrad bei 37 °C geschüttelt. Fixierte Embryonen sammeln sich an der Phasengrenze. Anschließend wurde das Formaldehyd-PBS-Gemisch entfernt. Nach Zugabe von gleicher Menge Methanol wurden die Embryonen zur Devitellinisierung 30 sec gevortext. Devitellinisierte Embryonen sinken anschließend ab, während nicht-devitellinisierte Embryonen an der Phasengrenze verbleiben. Das Heptan-Methanol-Gemisch wurde zusammen mit den nicht abgesunkenen Embryonen abgezogen und die verbliebenen Embryonen mehrfach mit Methanol gewaschen und bei -20 °C in Methanol gelagert. Die so fixierten Embryonen konnten sowohl für Antikörperfärbungen, als auch für *in situ* Hybridisierungen verwendet werden.

5.4.2 Hitzefixierung

Für Antikörperfärbungen mit RhoGEF2 wurden die Embryonen hitzefixiert. Dazu wurden 3 ml einer Salzlösung für 10 sec in der Mikrowelle in einem 10 ml-Szintillationsgefäß aufgekocht und die dechorionisierten Embryonen samt Netzchen in die Lösung gegeben. Nach 10 sec wurden Eisstückchen in die Lösung gegeben, das Gefäß mit Salzlösung aufgefüllt und auf Eis gestellt. Das Netzchen wurde entfernt, die Flüssigkeit nach Absinken der Embryonen vollständig entfernt und jeweils 1 ml Methanol und Heptan zugegeben. Die Embryonen wurden etwa 30 sec gevortext, die abgesunkenen Embryonen mehrfach mit Methanol gewaschen, in ein Eppendorfgefäß transferiert und bei -20 °C gelagert.

5.4.3 Fixierung mit Paraformaldehyd

Für Antikörperfärbungen zur Detektion von T48HA wurden die Embryonen mit einer 1:1 Mischung aus 4 % Paraformaldehyd (Methanol-frei) in PBS und Heptan fixiert. Zur Devitellinisierung wurde anstelle von Methanol 80 % Ethanol verwendet und für mindestens 2 min gevortext. Anschliessend wurden die Embryonen in 80 % Ethanol gewaschen und direkt gefärbt.

5.5 Herstellung transgener Fliegen

Die Herstellung transgener Fliegen erfolgte über P-Element-vermittelte Transformation von *Drosophila*-Embryonen (Rubin *et al.* 1982). Bei dieser Methode wird die DNA stabil in das Genom der Fliege integriert. Als Transformationsvektor wurde der P-Elementvektor pUAST und zusätzlich ein Helferplasmid mit $\Delta 2-3$ Transposase verwendet (Rubin *et al.* 1982).

5.5.1 Injektionsmix

100 $\mu\text{g/ml}$ $\Delta 2-3$ Transposase (Helfer-Plasmid) und 400 $\mu\text{g/ml}$ Konstrukt-DNA wurden in einem 50 μl -Ansatz in H_2O gemischt. Nach Zugabe von 0,1 Vol 3 M Natriumacetat und 3 Vol Ethanol wurde die DNA für mindestens 1 Std bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ präzipitiert und anschliessend durch Zentrifugation (14.000 rpm, 20 min $4\text{ }^\circ\text{C}$) gefällt. Das Pellete wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und nach Trocknen in 40 μl H_2O resuspendiert. 2 μl dieses Mixes wurden zum Beladen der Injektionsnadel verwendet.

5.5.2 Injektion

0,5 Std alte Embryonen wurden dechorionisiert, auf einer Apfelsaftagarplatte untereinander aufgereiht und auf ein Deckgläschen mit Heptankleber überführt. Die Embryonen wurden für etwa 10 min in einem Exsikator getrocknet und anschließend mit 10S-Voltalef-Öl überschichtet. Unter Verwendung einer Mikroinjektionsapparatur wurden geringe Mengen des vorbereiteten DNA-Mix injiziert. Anschließend wurde das Deckgläschen mit den Embryonen in eine Petrischale überführt und mit 3S-Voltalef-Öl überschichtet. Nach etwa 24 Std wurden die geschlüpften Larven abgesammelt und in ein Futterröhrchen mit extra Hefe überführt.

Mögliche transgene Tiere wurden durch Kreuzen mit w^- ermittelt und die Integration des Transgens mit Hilfe von Balancerstämmen für das zweite und dritte Chromosom lokalisiert.

5.6 Antikörperfärbungen

5.6.1 Antikörperfärbung nach der „Avidin-Biotinylated Enzyme Complex“-Methode (ABC-Methode)

Bei dieser Methode (Lawrence *et al.* 1989) macht man sich zu nutze, dass Avidin und Biotin miteinander eine der stärksten Bindungen in der Natur eingehen. Ein ummarkierter Erstantikörper wird durch einen biotinylierten Zweitantikörper erkannt. Avidin verbindet sich mit Meerrettichperoxidase zu einem Komplex, wobei einige Biotinbindestellen frei bleiben. Mit diesen lagert sich der bis zu mehrere Stunden stabile Komplex an den biotinylierten Zweitantikörper. Bei Zugabe von Wasserstoffperoxid als Katalysator ist die Peroxidase in der Lage, chromogene Stoffe, wie in diesem Fall das Diaminobenzidin, zu oxidieren, was zu einer dunklen Färbung am Ort der Peroxidaseaktivität führt. Der Weg über diesen AB-Komplex wird angewandt, da durch die mehrfache Bindung der Avidin-Peroxidase-Komplexe an den Zweitantikörper eine Verstärkung des ursprünglichen Signals erreicht wird.

Die Embryonenmenge pro Eppendorfgefäß entsprach etwa einem Volumenäquivalent von 50 µl. Alle Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten unter leichtem Bewegen auf dem Schüttler. Von den fixierten Embryonen wurde der Methanol vollständig abgezogen und durch 500 µl PBT ersetzt. Darin wurden die Embryonen einmal kurz, anschließend 3x 10 min gewaschen. Dann wurde das PBT vollständig abgezogen und die Embryonen in 500 µl Blocklösung inkubiert. Nach 1 Std wurde die Blocklösung vollständig abgezogen und 500 µl des entsprechend verdünnten Erstantikörpers zugegeben. Die Inkubation des Erstantikörpers erfolgte über Nacht bei 4 °C.

Am folgenden Tag wurde der Erstantikörper vollständig von den Embryonen abgezogen. Die Embryonen wurden wieder 1x kurz, dann 3x 10 min in 500 µl PBT gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen 1 Std in Blocklösung zur Absättigung unspezifischer Bindungen des Zweitantikörpers inkubiert. Nach dem Blocken wurden die Embryonen mit 500 µl des entsprechend verdünnten Zweitantikörpers für 1 Std bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Embryonen wieder 1x kurz und 3x 10 min in 500 µl PBT gewaschen.

Während dieser Waschschriffe wurde der AB-Komplex aus dem Vectastain ABC Elite Kit vorbereitet. Dazu wurden pro Färbeansatz 500 µl PBT mit 10 µl Lösung A

(Avidin) und 10 µl Lösung B (biotinylierte Peroxidase) versetzt, gut gemischt und 30 min inkubiert. Die Embryonen wurden nach ausreichend Waschsritten mit jeweils 500 µl dieses AB-Komplexes für 30 min bewegt. Nach erneutem Waschen für 3x 10 min erfolgte die Farbreaktion. Dazu wurden die Embryonen mit der Färbelösung versetzt und in eine 24-Lochplatte überführt. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 10 µl 0,03 %igem Wasserstoffperoxid gestartet. Die Färbung wurde unter dem Stereomikroskop verfolgt und bei ausreichender Intensität durch mehrfaches Waschen der Embryonen mit PBT gestoppt.

5.6.2 Färbung mit Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörpern

Bis einschließlich der Waschsritte nach der Inkubation mit dem Erstantikörper wurde hier ebenso verfahren, wie bei der Antikörperfärbung nach ABC-Methode. Nach den Waschsritten wurden die Embryonen ebenfalls geblockt und dann mit 500 µl des entsprechenden Zweitantikörpers inkubiert. Ab diesem Schritt erfolgten jedoch alle weiteren Waschsritte im Dunkeln aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Fluoreszenzfarbstoffe. Nach 1 Std Inkubation wurden die Embryonen wieder 1x kurz und 3x 10 min in 500 µl PBT gewaschen und konnten dann unter dem Mikroskop analysiert werden.

5.7 *In situ* Hybridisierung

Bei der *in situ* Hybridisierung handelt es sich um einen Nachweis von mRNA. Dazu wird eine der natürlichen mRNA komplementäre RNA- oder DNA-Sonde generiert, wobei markierte Nukleotide verwendet werden (Tautz *et al.* 1989). Die endogene RNA kann durch Hybridisierung mit der markierten Sonde im Embryo lokalisiert werden. Hier wurden ausschließlich RNA-Sonden verwendet.

5.7.1 Herstellung einer Sonde

Für die Herstellung einer Sonde wurde die entsprechende cDNA linearisiert und aufgereinigt. Unter Verwendung des DIG RNA Labelling Mix wurde dann eine RNA-Sonde hergestellt. Hierbei wurden bei der Transkription der Gegenstrangprobe mit

Digoxygenin markierte Nukleotide verwendet. Dadurch konnte die Sonde später in einer Farbreaktion über einen Enzym-gekoppelten Antikörper detektiert werden.

Folgender Reaktionsansatz wurde verwendet:

- 8 µl linearisierte, aufgereinigte DNA
- 2 µl DIG RNA Labelling Mix
- 0,5 µl RNasin
- 2 µl T7-Polymerase
- 2 µl Transkriptionspuffer
- 5,5 µl A. dest

Der Ansatz wurde 3 Std bei 37 °C inkubiert und anschließend bei –20 °C gelagert.

5.7.2 Hybridisierung

Für die *in situ* Hybridisierung wurden fixierte und devitellinisierte Embryonen verwendet. Die Embryonenmenge pro Eppendorfgefäß entsprach einem Volumenäquivalent von etwa 50 µl. Während der Waschschrte und Antikörperinkubationen wurden die Embryonen auf einem Schüttler leicht bewegt.

Der Methanol wurde von den Embryonen abgezogen und diese 3x 5 min in 1 ml PBT auf dem Schüttler leicht bewegt. Die Embryonen wurden dann mit Proteinase behandelt. Dazu wurden sie mit 5 µl ProteinaseK (10 mg/ml) in 1 ml PBT für 35 sec kräftig geschüttelt, die Embryonen wurden 30 sec absinken gelassen, die Lösung abgezogen und sofort 100 µl Glycin und 900 µl PBT zugegeben und erneut für 3 min kräftig geschüttelt. Anschließend wurden die Embryonen 3x 5 min in PBT gewaschen. Für eine zweite Fixierung wurden die Embryonen in 500 µl 4 % Formaldehyd in PBT für 20 min inkubiert, gefolgt von erneutem Waschen für 3x 5 min in 1 ml PBT. Nach diesen Waschschrten wurden die Embryonen 10 min in 1 ml eines 1:1-Gemisches aus PBT und Hybridisierungslösung, dann 2x 10 min in 1 ml Hybridisierungslösung inkubiert. Daraufhin wurden die Embryonen im Heizblock bei 55 °C zur Anpassung an die Hybridisierungstemperatur für 1 Std vorinkubiert. Während dieser Zeit wurde die hergestellte Sonde 1:10 in H₂O verdünnt und 1,5 µl davon in 150 µl Hybridisierungspuffer 5 min aufgeköcht.

Von den Embryonen wurde die Hybridisierungslösung vollständig abgezogen, die Sonde auf die Embryonen gegeben und über Nacht bei 55 °C ohne Schütteln hybridisiert. Am nächsten Tag wurde die Sonde von den Embryonen entfernt und

diese zuerst 3x 20 min mit 1 ml vortemperierter Hybridisierungslösung, dann 1x mit 1 ml 1:1 Hybridisierungslösung/PBT bei 55 °C gewaschen. Anschließend wurde 5x 20 min in PBT gewaschen und die Temperatur dabei langsam an Raumtemperatur angepasst. Während dieser Zeit erfolgte die Präabsorption des anti-Digoxigenin-Antikörpers, Alkalische Phosphatase-gekoppelt.

Die Embryonen wurden anschließend mit 500 µl dieses Antikörpers, 1:500 in PBT verdünnt, für 1 Std bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen des Antikörpers wurde 4x 20 min in 1 ml PBT, anschließend 1x 5 min und 2x 10 min in Färbepuffer gewaschen.

5.7.3 Detektion

Für die Farbreaktion wurden die Embryonen in eine 24-Loch-Platte überführt und die Farbreaktion durch Zugabe der Färbelösung gestartet. Die Färbung erfolgte aufgrund der Lichtempfindlichkeit des NBT im Dunkeln. Mit Hilfe des Stereomikroskops wurde die Färbung kontrolliert und nach Erreichen der gewünschten Farbtintensität durch mehrfaches Waschen in PBT gestoppt. Die Embryonen wurden dazu wieder in ein Eppendorfgefäß überführt.

5.8 Einbetten von Embryonen und Mikroskopie

5.8.1 Fluoreszenzfärbung

Nach der Färbung wurden die Embryonen direkt in Vectashield eingebettet und mit einem ApoTom (Zeiss, Jena) mikroskopiert und fotografiert.

5.8.2 DAB-Färbung/ *In situ* Hybridisierung

Nach der Farbreaktion und mehrfachem Waschen wurden die Embryonen in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert, einmal in Aceton gewaschen und dann in einem 1:1-Gemisch aus Araldit und Aceton für 1 Std inkubiert. Anschließend wurden die Embryonen in Araldit auf einem Schnappdeckelchen eingebettet und bei -20 °C gelagert. Embryonen wurden in diesen Deckelchen sortiert und gegebenenfalls

einzelnen in Araldit auf Objektträger überführt und mit einem Axioplan (Zeiss, Jena) mikroskopiert und fotografiert.

5.9 Schnitte von Embryonen

5.9.1 Fluoreszenzschnitte

Bei Fluoreszenzfärbungen wurden die Embryonen manuell geschnitten. Dazu wurde ein Deckglas auf einem Objektträger fixiert und darauf die Embryonen in PBT selektioniert. Die übrigen Embryonen wurden ebenso wie das gesamte PBT entfernt und die Embryonen in Aquapolymount überführt. Nach einer kurzen Inkubationszeit wurden die Embryonen mit einer feinen Kanüle geschnitten und die Schnitte der einzelnen Embryonen in einer Linie aufgereiht. Nach mehrstündiger Polymerisation des Aquapolymount wurden die Deckgläser mit Aquapolymount auf einem Objektträger erneut eingebettet und über Nacht polymerisiert. Die Auswertung erfolgte mit einem ApoTom (Zeiss, Jena).

5.9.2 Schnitte nach DAB-Färbung

Die in Araldit eingebetteten Embryonen wurden in den Deckelchen sortiert und gewünschte Embryonen in eine Form mit Araldit überführt und ausgerichtet. Nach Polymerisation des Araldits über Nacht bei 60 °C wurden die entstandenen Araldit-Blöckchen mit den Embryonen mit einer Klinge vorgetrimmt und anschließend mit einem Microtom (Leica, Solms) geschnitten. Die 8 µm dicken Schnitte wurden auf Objektträgern in Araldit eingebettet, über Nacht bei 60 °C polymerisiert und anschließend mit einem Axioplan (Zeiss, Jena) mikroskopiert und fotografiert.

5.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

5.10.1 Standard-PCR an Plasmid-DNA

Für eine Standard-PCR an Plasmid-DNA wurde das Expand High Fidelity PCR System verwendet. Folgender Reaktionsansatz in einem Volumen von 50 µl wurde verwendet:

- 1 µg Template
- 0,2 mM dNTPs (10 mM)
- 1x Puffer ohne MgCl₂
- 2,5 mM MgCl₂ (25 mM)
- 1,75 U µl Polymerase
- je 0,5 mM Primer

Das Standard-PCR-Programm war wie folgt:

- 95 °C 10 min
- 95 °C 45 sec
- 50 °C 60 sec (je nach Primer)
- 72 °C 2 min (je nach Produktlänge)
- 72 °C 10 min
- 24 Zyklen

Die PCR-Produkte wurden anschließend in pCRII-TOPO kloniert (siehe 2.12.6).

5.10.2 PCR an einzelnen Embryonen („Single embryo PCR“)

Embryonen wurden nach Standardprotokoll fixiert und gegen Twist gefärbt. Einzelne Embryonen etwa gleichen Alters (am besten etwa Stadium 10) wurden in PCR-Gefäße mit 10 µl Homogenisierungspuffer überführt, 1 Std bei -20 °C, 30 min bei 37 °C und 3 min bei 95 °C inkubiert. 1 µl dieser DNA-Lösung wurde für die PCR-Reaktion eingesetzt. Für jeden Embryo wurden parallel verschiedene Ansätze gemacht:

- „Positivkontrolle“ (mit Sicherheit nicht deletierter Bereich), hier *CG11929*
- „Negativkontrolle“ (mit Sicherheit deletierter Bereich), hier *71* (außer für *Df(3R)ro^{XB3}*).
- Zu testende Primerkombinationen (bis zu 4 verschiedene)

Zur Bestimmung der Bruchpunkte der Defizienzen wurden verschiedene genspezifische Primerpaare getestet.

PCR-Ansatz in einem Reaktionsvolumen von 25 μ l:

- 1 μ l DNA-Lösung
- 1x Puffer ohne $MgCl_2$
- 2,5 mM $MgCl_2$
- 0,2 mM dNTPs
- je 0,5 mM Primer
- 0,3 μ l Polymerase High fidelity
- 15,7 μ l A. dest

PCR-Reaktion:

- 95 °C 5 min
- 95 °C 45 sec
- 50 °C 60 sec (je nach Primer)
- 72 °C 2 min 30 sec
- 72 °C 10 min
- 30 Zyklen

Alle verwendeten Primer wurden zuvor an genomischer DNA auf Funktion getestet.

5.11 Konstrukte

5.11.1 Konstrukte zur Herstellung transgener Fliegen

Für 2xPEe*T48* wurde die gesamte cDNA von *T48* über die Schnitte *Bam*HI/*Xho*I aus pNB48.1 (zur Verfügung gestellt von R. White, Brown *et al.* 1988) geschnitten und anstelle des *lacZ*-Gens in die *Bam*HI/*Xho*I-Schnittstelle des pCaSpeR 2xPE β Gal Transformationsvectors gesetzt.

Für *T48HA* wurde ein Linker mit den Primern 103/104 in den *Sph*I-Schnitt der *T48* cDNA in pKS eingesetzt. Durch Exzision von *T48HA* aus pKS und Insertion in pUAST wurde pUAST*T48HA* generiert.

5.11.2 Konstrukte für *in vitro* translation

Um die *in vitro* Translations-Konstrukte für *T48* zu erhalten, wurden PCR-Fragmente der gesamten intrazellulären Domäne (AS 183-419, Primer 64/65) und der intrazellulären Domäne ohne PDZ-Bindemotiv (AS 183-411, Primer 64/75) in die *Bgl*II-Schnittstelle von pSP64T (mit β Globin 5'- und 3'UTR) kloniert.

Der intrazelluläre Teil von *crumbs* wurde über PCR von pGEX-*crb*_{intra} (zur Verfügung gestellt von E. Knust) amplifiziert (Primer 100/84) und in die *Eco*RV- Schnittstelle von pSP64CycA ligiert.

5.11.3 Konstrukte für GST-Fusionsproteine der PDZ Domänen

Für *RhoGEF2*-GST wurde das *Sma*I/*Not*I-Fragment der *RhoGEF2*-cDNA, welches die PDZ-Domäne enthält, in pGEX-4T-3 ligiert.

Die *Scribbled*-cDNA (pNB40 *Scribbled*, zur Verfügung gestellt von D. Bilder, Berkeley) wurde mit *Nae*I/*Nhe*I geschnitten, mittels Klenow aufgefüllt und in die *Sma*I- Schnittstelle von pGEX-4T-3 inseriert.

Für *Discs large* wurde ein *Bam*HI/*Xho*I-Fragment aus pT7 β link*DlgPDZ1-3* (zur Verfügung gestellt von F. Schweisguth, Paris), welches die PDZ-Domänen enthält, in pGEX-4T-2 kloniert. *Bazooka*-PDZ-GST wurde zur Verfügung gestellt von A. Wodarz (Düsseldorf), *Stardust*-PDZ-GST von E. Knust (Düsseldorf).

Für *I(2)02045* wurde der offene Leserahmen mittels PCR mit den Primern 124/125 amplifiziert und über *Bam*HI/*Eco*RI im gleichen Leserahmen mit GST in pGEX-4T-3 kloniert.

5.11.4 Konstrukte für Transfektion von Schneiderzellen

Für das Zellkultur-Konstrukt von *T48* wurde *T48HA* über *Eco*RI/*Sac*I aus pKS in pSP72 subkloniert und dann über *Eco*RI/*Xma*I in pRmHa inseriert. Für das Deletionskonstrukt *T48HA*_{ΔITTEL} wurde der offene Leserahmen von *T48* ohne die letzten 15 Basenpaare mittels PCR amplifiziert (Primer 150/151) und über *Eco*RI/*Sac*I in pRmHa ligiert.

Für die Expression von *RhoGEF2*-PDZ wurde ein Fragment, welches die PDZ-Domäne beinhaltet, über PCR von pUASp*RhoGEF2* (von K. Barrett) amplifiziert (Primer 92/93) und im gleichen Leserahmen mit GFP in den *Eco*RI-Schnitt von pDeGFP kloniert.

Um die RGS-Domäne von *RhoGEF2* in Schneiderzellen zu exprimieren, wurde dieser Bereich über PCR von pUASp*RhoGEF2* (von K. Barrett) amplifiziert (Primer 160/161) und im gleichen Leserahmen mit GFP in den *EcoRI*-Schnitt von pDeGFP kloniert.

Für die Expression des vollständigen *RhoGEF2* wurde in pRmHa mit Hilfe von Linkern (Primer 140/141) ein 5'-FLAG-Epitop eingebracht und der offene Leserahmen von *RhoGEF2* aus pUASp*RhoGEF2* über *KpnI/XbaI* in pKS subkloniert und anschliessend über *XbaI*, aufgefüllt/*KpnI* und *BamHI*, aufgefüllt/*KpnI* in pRmHa 5'-FLAG inseriert.

Um die PDZ-Domänen von *Discs large* in Schneiderzellen zu exprimieren, wurde ein Fragment mittels PCR von pT7βlink*DlgPDZ1-3* amplifiziert (Primer 96/97), welches die PDZ-Domänen enthält und über *EcoRI* im gleichen Leserahmen mit GFP in pDeGFP kloniert.

Für *Scribbled* wurde ein Fragment mit allen 4 PDZ-Domänen mittels PCR von pNB40 *Scribbled*-cDNA amplifiziert (Primer 94/95) und in den *EcoRI*-Schnitt von pDeGFP kloniert.

Für *concertina* und die konstitutiv aktive Form *concertina** wurde über einen Linker ein 5'-FLAG-Epitop in pRmHa eingesetzt (Primer 134/135). Mittels PCR wurde der offene Leserahmen beider Gene amplifiziert (Primer 132/133) und über *KpnI/XbaI* in pSP72 kloniert. Nach Subklonierung in pKS über *KpnI/XhoI* wurden beide Konstrukte über *KpnI/BamHI* in pRmHa 5'FLAG inseriert. Die konstitutiv aktive Form Concertina* trägt eine Punktmutation in Aminosäure 276 (Arginin zu Cystein) in der GTP-Bindetasche, die zu einem konstitutiv aktiven Molekül führt.

5.12 DNA-Arbeiten

5.12.1 *E. coli*-Stämme

- DH5αTM-T1^R: F⁻Φ80/*lacZ*ΔIM15 Δ(*ZYA-argF*)U169/*lac recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA*
- Mach1TM-T1^R: F⁻Φ80(*lacZ*)ΔIM15 Δ/*lacX74 hsdR*(r_k⁻, m_k⁺) Δ*recA1398 endA1 tonA*
- BL21 (DE3): F⁻ *dcm ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *galλ* (DE3)

5.12.2 Restriktionsanalysen

Zur analytischen Restriktion von Plasmid-DNA wurden 0,5-1,0 µg DNA eingesetzt; für präparative Zwecke wurden 5-10 µg DNA gespalten. Die Spaltungsansätze aus Wasser, Puffer (optimaler Puffer laut Hersteller-Protokoll), Restriktionsenzym und DNA wurden für 2 Std bei 37 °C inkubiert.

5.12.3 Agarose-Gel

Anhand der Gel-Elektrophorese können DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden, da DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe unterschiedlich schnell im angelegten Spannungsfeld wandern.

Dazu wurde 1 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer unter Erhitzen gelöst (1 %iges Gel) und 2 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Die flüssige Agarose wurde in eine entsprechende Elektrophoresekammer gegossen und ein Kamm eingesteckt, um Taschen auszusparen. Sobald die Agarose fest geworden war, wurde der Kamm gezogen und das Gel mit TAE überschichtet.

Die aufzutragenden Proben wurden mit 5 Volumenprozent Stopp- und Auftragspuffer, der das Einsinken der Probe in die Geltasche ermöglicht, versetzt und das ganze in die Geltasche pipettiert. Zusätzlich wurden in einer weiteren Tasche 5 µl eines Größenmarkers (DNA-Leiter Mix) aufgetragen. Nun wurde eine Spannung von 85 Volt angelegt, um die Auftrennung zu starten.

Da es sich bei Ethidiumbromid um eine interkalierende Substanz handelt, die durch UV-Licht angeregt werden kann, war es möglich, die Größe der DNA Fragmente nach ausreichender Auftrennung unter einem UV-Schirm durch Vergleich mit dem Größenmarker zu identifizieren.

5.12.4 DNA-Aufreinigung aus dem Gel

Hierzu wurde das GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) verwendet und nach Herstellerangaben eingesetzt. Die DNA wurde im letzten Schritt mit 30 µl A. dest eluiert.

5.12.5 Ligation und Transformation

Zur kovalenten Verknüpfung von Vektor- und Fragment-DNA wurde nach folgendem Schema ein Ligationsansatz hergestellt:

- 1 µl Vektor
- 2 µl Insert
- 1 µl Ligasepuffer
- 1 µl Ligase
- 5 µl A. dest

Die Reaktion wurde 1 Std bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wurden 2 µl für die Transformation verwendet. 50 µl-Aliquots von chemisch kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 2 µl der Ligation gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Für einen Hitzeschock wurden die Bakterien 40 sec bei 37 °C inkubiert, mit 200 µl LB-Medium versetzt und 1 Std bei 37 °C geschüttelt. Aliquots von 50 µl und 200 µl wurden auf Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

5.12.6 TOPO-TA-Klonierung

Für die direkte Klonierung von PCR-Fragmenten wurde die TOPO-TA-Klonierung von Invitrogen (Carlsbad, USA) verwendet. Dies basiert auf dem von der Polymerase produzierten A-Überhang. PCR-Fragmente werden mittels einer Topoisomerase-Reaktion in den geöffneten TOPO-Vektor ligiert.

Folgender Ansatz wurde für die Ligation verwendet:

- 2 µl PCR-Reaktion, direkt nach Ablauf des Programms
- 0,5 µl Salzlösung
- 0,5 µl Vector

Die Reaktion wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, und dann 2 µl für eine Standard-Transformation verwendet.

Um auf das PCR-Produkt zu selektionieren und keine Kolonien durch Template zu erhalten, wurde der Transformationsansatz auf einer Platte mit Ampicillin und zusätzlich Kanamycin ausplattiert.

5.13 Isolierung von Plasmid-DNA

5.13.1 Mini-Präparation durch Alkalische Lyse

Durch alkalische Lyse bakterieller Zellen kann die Plasmid-DNA nach Ausfällen der restlichen zelluläre Bestandteile, einschließlich chromosomaler DNA, isoliert werden (Sambrook *et al.* 1989).

Zu diesem Zweck wurden ausgehend von Einzelkolonien Kulturen in 2 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Von dieser Kultur wurden dann 1,5 ml in ein Eppendorfgesäß überführt und 5 min (5000 rpm) bei Raumtemperatur sedimentiert. Das Bakterienpellet wurde durch alkalische Lyse nach Standardmethode aufgeschlossen. Die DNA wurde in 50 µl Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert.

5.13.2 Plasmid-Midi-Präparation über Säulen-Chromatografie

Mit Hilfe dieser Methode konnten grössere Mengen gereinigter Plasmid-DNA aus 50 ml Übernachtskulturen gewonnen werden.

Alle Arbeitsschritte erfolgten gemäß Standardprotokoll des Herstellers (Genomed, Löhne). Die DNA wurde in 50 µl A. dest resuspendiert, anschließend photometrisch bei 260 nm die Konzentration bestimmt, die DNA auf eine Standardkonzentration von 1 µg/µl eingestellt und bei -20 °C gelagert.

5.14 Vorhersage möglicher Bindepartner von T48

Um mögliche Bindepartner für T48 zu bestimmen, wurde mit Hilfe des Algorithmus PERLA bestimmt, welche PDZ-Domäne die geeignete Struktur hat, um den C-Terminus von T48 zu binden (Reina *et al.* 2002, in Zusammenarbeit mit G. J. Ballester und L. Serrano). Für die Vorhersagen wurde die 3. PDZ-Domäne des synaptischen Proteins PSD-95 im Komplex mit dem C-terminalen Peptid seines natürlichen Liganden CRIPT (-KQTSV, RCSB Protein Data Bank Code 1be9.pdb) verwendet. Die PDZ-Domäne von PSD-95 ist in Bezug auf die Struktur eine klassische PDZ-Domäne und ihre Struktur kristallographisch detailliert bestimmt

worden. Mit Hilfe des entworfenen Algorithmus PERLA wurde die PDZ-Spezifität durch Mutation von Aminosäuren, die wichtig sind für die Bindung des Liganden, so verändert, dass sie den Liganden ITTEL optimal bindet (Fisinger *et al.* 2001; Lopez de la Paz *et al.* 2001). Mit FoldX (<http://foldx.embl.de>) wurden die Energieverhältnisse bestimmt. Die so bestimmte Sequenz wurde dann mit allen PDZ-Sequenzen von *Drosophila* verglichen. Die PDZ-Sequenzen, die an allen wichtigen Positionen mit der theoretischen Sequenz übereinstimmten, wurden als mögliche Interaktionspartner selektioniert.

5.15 SDS-PAGE und Coomassie-Färbung

Die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese dient der Analyse komplexer Proteinmischungen und ermöglicht den schnellen Nachweis zu identifizierender Proteine und der Bestimmung von Molekulargewichten.

Zur Auftrennung von Proteingemischen oder aufgereinigten Proteinen wurden die Proben mit Lämmli-Puffer versetzt und auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden bei einer Anfangsspannung von 100 Volt bei konstanter Amperezahl aufgetrennt, bis die unterste blaue Markerlinie aus dem Gel herauslief. Anschliessend wurde das Gel 20 min in Coomassie-Färbelösung leicht bewegt, bis zur gewünschten Entfärbung in Coomassie-Entfärber gewaschen und dann auf Whatmanpapier in einem Geltrockner getrocknet.

5.16 *In vitro* Transkription

Für die *in vitro* Transkription wurden die entsprechenden cDNAs linearisiert und in folgendem Reaktionsansatz unter Verwendung des MEGAscript High Yield Transcription Kits (Ambion, Austin, USA) transkribiert:

- 2 µl 10x Reaktionspuffer
- je 2 µl ATP, CTP, GTP, UTP (50 mM)
- 2 µl Enzymmix

- 1 µg linearisierte DNA
- Nuklease-freies Wasser bis zu einem Endvolumen von 20 µl

Der Ansatz wurde 3 Std bei 37 °C inkubiert und nach Zugabe von 1 µl RNase-freier DNase1 (2 U/µl) für weitere 15 min bei 37 °C inkubiert. Um die RNA zu fällen, wurden 25 µl LiCl-Lösung und 30 µl Nuklease-freies Wasser zugegeben, das ganze dann mindestens 30 min bei -20 °C inkubiert und anschließend für 15 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10 µl Nuklease-freiem Wasser resuspendiert.

5.17 *In vitro* Translation

Für die *in vitro* Translation unter Verwendung des *in vitro* Translation Kits (NEN/Perkin Elmer, Boston, USA) wurde folgender Reaktionsansatz für 2 Std bei 30 °C im Wasserbad inkubiert:

- 17,5 µl Retikulozytenlysat
- 1,5 µl RNA (1 µg/µl)
- 0,5 µl Aminosäure-Mix ohne Methionin
- 0,25 µl RNasin
- 3,25 µl Nuclease-freies Wasser
- 2 µl ³⁵S-Methionin (11 µCi/µl ³⁵S-Methionin)

Anschließend wurde der Reaktionsansatz bei -20 °C gelagert.

5.18 Autoradiografie

Zur Kontrolle der Reaktion der *in vitro* Translation wurden 3 µl der Reaktion mit Lämmli-Puffer versetzt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Input). Das Gel wurde getrocknet und die Proteine mittels Autoradiografie detektiert.

5.19 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Die GST-Fusionsproteine wurden im *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) exprimiert. Mit einer Übernachtsstarterkultur wurden 200 ml-Kulturen 1:100 in 2xTY-Medium + Ampicillin angeimpft. Die Kulturen wurden bei 37 °C geschüttelt, bei einer OD₆₀₀ ~0,6 mit 0,1 M IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) induziert und für weitere 4 Std bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen abzentrifugiert (4000 rpm, 10 min) und in 10 ml PBS + Protease-Inhibitorcocktail (Sigma, Deisenhofen) resuspendiert. Die Bakterien wurden durch Ultraschallbehandlung (Output control ~3, Duty Cycle +20, 3x 45 sec, 10 sec Pause) lysiert und anschließend bei 4000 rpm, 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Falcon überführt und 1 % TritonX-100 zugegeben. Während des Zentrifugationsschritts wurden die Glutathion-Sepharose-Kügelchen (beads) vorbereitet: pro 200 ml Kulturansatz wurden 70 µl des Gemischs (75 % beads) abzentrifugiert (3000 rpm, 5 min), mit 1,3 ml PBS + 1 % TritonX-100 gewaschen, erneut abzentrifugiert und in 100 µl PBS + 1 % TritonX-100 resuspendiert. Diese 100 µl wurden zu dem Überstand der Kulturen nach Ultraschallbehandlung gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler bewegt, um die Proteine aus dem Bakterienlysat an die Sepharose-beads zu koppeln. Als Negativkontrolle wurde PBS + 1 % TritonX-100 mit den beads versetzt und im Folgenden wie die anderen Proben behandelt. Nach 30 min Inkubation wurden die beads zentrifugiert, in 1 ml PBS + 1 % Triton resuspendiert, mehrfach mit PBS + 1 % TritonX-100 gewaschen und zum Schluss in 100 µl IP-Puffer resuspendiert. Die Menge der gebundenen Fusionsproteine wurde durch SDS-PAGE und anschließende Coomassie-Färbung bestimmt.

5.20 Co-Immunopräzipitation

Für die Immunopräzipitation wurden 25 µl des *in vitro* translatierten Proteins mit je 30 µl des an Sepharose-beads gebundenen Fusionsproteins gemischt und für 3 Std bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit IP-Puffer auf 500 µl aufgefüllt und zentrifugiert (3000 rpm, 5 min). Die beads wurden nun 2x 5 min in 500 µl Waschpuffer auf dem Schüttler inkubiert und abzentrifugiert. Nach 2 Waschschr

wurden die beads nach der Zentrifugation in 25 μ l Lämmli resuspendiert, 5 min auf 95 °C erhitzt und dann 10 μ l davon mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt, um die GST-Proteine zu detektieren, und anschließend getrocknet. Mittels Autoradiografie konnte bestimmt werden, wie viel des *in vitro* translatierten Proteins präzipitiert werden konnte.

5.21 Arbeiten mit Schneiderzellen

5.21.1 Kultivierung von Schneiderzellen

Die Kultivierung von Schneiderzellen erfolgte in 50 ml Gewebekulturflaschen bei 27 °C. Dazu wurden die Zellen in 10 ml Schneider's *Drosophila* Medium mit 5 % Fötalem Rinderserum (FBS) kultiviert und etwa alle 2-3 Tage 1:2 mit frischem Medium + FBS verdünnt und in neue Flaschen transferiert. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter der Sterilbank durchgeführt.

5.21.2 Transiente Transfektion von Schneiderzellen

Für die transiente Transfektion von Schneiderzellen wurde Cellfectin-Reagenz verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Lipid-Gemisch, welches Komplexe mit der DNA formt und so deren Aufnahme in die Zellen ermöglicht. Transfektionen erfolgten immer in serumfreien Medium, da Serum die Komplexbildung inhibiert.

Sämtliche verwendeten Konstrukte stehen unter der Kontrolle eines Kupfer-induzierbaren Promotors. Die Expression kann durch die Zugabe von Kupfer zum Medium induziert werden.

Für Transfektionen wurden 10^6 Zellen verwendet und gut gewachsene Kulturen gegebenenfalls entsprechend verdünnt. Die Zellsuspension wurde mit je 3 ml auf 6-Loch-Platten verteilt und so über Nacht bei 27 °C inkubiert.

Für das getrennte Ansetzen des DNA-Mix und des Cellfectin-Mix wurden am nächsten Tag in Eppendorff-Gefäßen je 100 μ l serumfreies Medium pro Transfektion vorbereitet. Für den DNA-Mix wurden pro Konstrukt 300 ng DNA zugegeben und für den Cellfectin-Mix wurden jeweils 10 μ l Cellfectin zugegeben. Diese beiden Ansätze wurden dann gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Währenddessen wurden die Zellen vorbereitet und einmal in serumfreien Medium gewaschen. Anschließend wurde das Cellfectin-DNA-Gemisch mit weiteren 800 µl Medium auf die Zellen gegeben und diese bei 27 °C inkubiert. Nach 3-5 Std wurden jeweils 50 µl Serum hinzugegeben und alles weiter über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und 3 ml Medium mit FBS zugegeben. Ausserdem erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM CuSO₄.

Um Antikörperfärbungen an Zellen machen zu können, ist es notwendig, die Zellen auf Deckgläschen wachsen zu lassen. Dazu wurden autoklavierte Deckgläschen (10x 10 mm) mit 30 µl Concanavalin (0,5 mg/ml) beschichtet. Zwei dieser so vorbereiteten Deckgläschen wurden nun zu jedem Transfektionsansatz gegeben und die Zellen weitere 24 Std inkubiert. Während dieser weiteren 24 Std wurde den Zellen ausreichend Zeit gegeben, die gewünschten Proteinen zu exprimieren. Am nächsten Tag konnte die Antikörperfärbung erfolgen.

5.21.3 Antikörperfärbung an Schneiderzellen

Für die Antikörperfärbung wurde das Medium von den Transfektionen abgesaugt und die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen. Zur Fixierung wurden die Zellen für 10 min in 1 ml 4 % Formaldehyd in PBS, und zur anschließenden Permeabilisierung 30 sec in 1 ml PBS mit 0,5 % TritonX-100 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3x 10 min mit PBT gewaschen. Nach Inkubation mit dem jeweiligen Erstantikörper für 1 Std bei Raumtemperatur wurden die Zellen erneut 3x 10 min gewaschen und anschließend mit dem Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörper ebenfalls für 1 Std inkubiert. Ab hier erfolgten alle Schritte im Dunkeln. Nach der Antikörperinkubation wurden die Zelle nochmals 3x 10 min gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen in einem kleinen Tropfen Vectashield eingebettet, mit Nagellack versiegelt und dann am Mikroskop (Zeiss, Jena) ausgewertet.

6 Literaturverzeichnis

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Watson, J. D. (1995).** Molekularbiologie der Zelle.
- Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y. und Kaibuchi, K. (1996).** "Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase)." *J Biol Chem* 271(34): 20246-9.
- Azpiazu, I. und Gautam, N. (2004).** "A fluorescence resonance energy transfer-based sensor indicates that receptor access to a G protein is unrestricted in a living mammalian cell." *J Biol Chem* 279(26): 27709-18.
- Azpiazu, N., Lawrence, P. A., Vincent, J. P. und Frasch, M. (1996).** "Segmentation and specification of the *Drosophila* mesoderm." *Genes Dev* 10(24): 3183-94.
- Bachmann, A., Schneider, M., Theilenberg, E., Grawe, F. und Knust, E. (2001).** "Drosophila Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity." *Nature* 414(6864): 638-43.
- Barrallo-Gimeno, A. und Nieto, M. A. (2005).** "The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer." *Development* 132(14): 3151-61.
- Barrett, K., Leptin, M. und Settleman, J. (1997).** "The Rho GTPase and a putative RhoGEF mediate a signaling pathway for the cell shape changes in *Drosophila* gastrulation." *Cell* 91(7): 905-15.
- Baylies, M. K. und Bate, M. (1996).** "twist: a myogenic switch in *Drosophila*." *Science* 272(5267): 1481-4.
- Bilder, D. (2001).** "PDZ proteins and polarity: functions from the fly." *Trends in Genetics* 17(9): 511-519.
- Bilder, D. und Perrimon, N. (2000).** "Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble." *Nature* 403(6770): 676-80.
- Booden, M. A., Siderovski, D. P. und Der, C. J. (2002).** "Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor promotes G alpha q-coupled activation of RhoA." *Mol Cell Biol* 22(12): 4053-61.
- Boulay, J. L., Dennefeld, C. und Alberga, A. (1987).** "The *Drosophila* developmental gene snail encodes a protein with nucleic acid binding fingers." *Nature* 330(6146): 395-8.
- Brand, A. H. und Perrimon, N. (1993).** "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes." *Development* 118(2): 401-15.
- Brown, N. H. und Kafatos, F. C. (1988).** "Functional cDNA libraries from *Drosophila* embryos." *J Mol Biol* 203(2): 425-37.
- Bunch, T. A., Grinblat, Y. und Goldstein, L. S. (1988).** "Characterization and use of the *Drosophila* metallothionein promoter in cultured *Drosophila melanogaster* cells." *Nucleic Acids Res* 16(3): 1043-61.
- Campos-Ortega, J. A. und Hartenstein, V. (1985).** The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Berlin, Springer-Verlag.
- Cano, A., Perez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., Portillo, F. und Nieto, M. A. (2000).** "The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression." *Nat Cell Biol* 2(2): 76-83.

- Chandrasekaran, V. und Beckendorf, S. K. (2005).** "Tec29 controls actin remodeling and endoreplication during invagination of the *Drosophila* embryonic salivary glands." *Development*: dev.01926.
- Cho, K. O., Hunt, C. A. und Kennedy, M. B. (1992).** "The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein." *Neuron* 9(5): 929-42.
- Chou, T. B., Noll, E. und Perrimon, N. (1993).** "Autosomal P[ovoD1] dominant female-sterile insertions in *Drosophila* and their use in generating germ-line chimeras." *Development* 119(4): 1359-69.
- Costa, M., Wilson, E. T. und Wieschaus, E. (1994).** "A putative cell signal encoded by the folded gastrulation gene coordinates cell shape changes during *Drosophila* gastrulation." *Cell* 76(6): 1075-89.
- Cox, R. T., Kirkpatrick, C. und Peifer, M. (1996).** "Armadillo is required for adherens junction assembly, cell polarity, and morphogenesis during *Drosophila* embryogenesis." *J Cell Biol* 134(1): 133-48.
- Dawes-Hoang, R. E., Parmar, K. M., Christiansen, A. E., Phelps, C. B., Brand, A. H. und Wieschaus, E. F. (2005).** "folded gastrulation, cell shape change and the control of myosin localization." *Development* 132(18): 4165-78.
- De Craene, B., van Roy, F. und Berx, G. (2005).** "Unraveling signalling cascades for the Snail family of transcription factors." *Cell Signal* 17(5): 535-47.
- De Vries, L. und Gist Farquhar, M. (1999).** "RGS proteins: more than just GAPs for heterotrimeric G proteins." *Trends in Cell Biology* 9(4): 138-144.
- Dhanasekaran, N. und Dermott, J. M. (1996).** "Signaling by the G12 class of G proteins." *Cell Signal* 8(4): 235-45.
- Duffy, J. B. (2002).** "GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife." *Genesis* 34(1-2): 1-15.
- Fisinger, S., Serrano, L. und Lacroix, E. (2001).** "Computational estimation of specific side chain interaction energies in alpha helices." *Protein Sci* 10(4): 809-18.
- Foe, V. E. (1989).** "Mitotic domains reveal early commitment of cells in *Drosophila* embryos." *Development* 107(1): 1-22.
- Foe, V. E., Odell, G. M. und Edgar, B. A. (1993).** Mitosis and morphogenesis in the *Drosophila* embryo: point and counterpoint. *The Development of Drosophila melanogaster*. Martinez-Arias, M. B. a. A. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Frasch, M. und Levine, M. (1987).** "Complementary patterns of even-skipped and fushi tarazu expression involve their differential regulation by a common set of segmentation genes in *Drosophila*." *Genes Dev* 1(9): 981-95.
- Fukuhara, S., Chikumi, H. und Gutkind, J. S. (2001).** "RGS-containing RhoGEFs: the missing link between transforming G proteins and Rho?" *Oncogene* 20(13): 1661-8.
- Fukuhara, S., Murga, C., Zohar, M., Igishi, T. und Gutkind, J. S. (1999).** "A novel PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor links heterotrimeric G proteins to Rho." *J Biol Chem* 274(9): 5868-79.
- Fullilove, S. L., G., J. A. und F.R., T. (1978).** Embryonic development: Descriptive. *The genetics and biology of Drosophila*. Wright, M. A. a. T. R. F. New York, Academic Press. vol. 2c: pp. 105-227.
- Giot, L., Bader, J. S., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., Hao, Y. L., Ooi, C. E., Godwin, B., Vitols, E., Vijayadamodar, G., Pochart, P., Machineni, H., Welsh, M., Kong, Y., Zerhusen, B., Malcolm, R., Varrone, Z., Collis, A., Minto, M., Burgess, S., McDaniel, L., Stimpson, E., Spriggs,**

- F., Williams, J., Neurath, K., Ioime, N., Agee, M., Voss, E., Furtak, K., Renzulli, R., Aanensen, N., Carrola, S., Bickelhaupt, E., Lazovatsky, Y., DaSilva, A., Zhong, J., Stanyon, C. A., Finley, R. L., Jr., White, K. P., Braverman, M., Jarvie, T., Gold, S., Leach, M., Knight, J., Shimkets, R. A., McKenna, M. P., Chant, J. und Rothberg, J. M. (2003). "A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*." *Science* 302(5651): 1727-36.
- Gohla, A., Harhammer, R. und Schultz, G. (1998). "The G-protein G13 but not G12 mediates signaling from lysophosphatidic acid receptor via epidermal growth factor receptor to Rho." *J Biol Chem* 273(8): 4653-9.
- Gould, A. P., Brookman, J. J., Strutt, D. I. und White, R. A. (1990). "Targets of homeotic gene control in *Drosophila*." *Nature* 348(6299): 308-12.
- Grosshans, J., Müller, H. A. und Wieschaus, E. (2003). "Control of cleavage cycles in *Drosophila* embryos by frühstart." *Dev Cell* 5: 285-294.
- Grosshans, J., Wenzl, C., Herz, H. M., Bartoszewski, S., Schnorrer, F., Vogt, N., Schwarz, H. und Müller, H. A. (2005). "RhoGEF2 and the formin Dia control the formation of the furrow canal by directed actin assembly during *Drosophila* cellularisation." *Development* 132(5): 1009-20.
- Gumbiner, B. M. (2005). "Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis." *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(8): 622-34.
- Häcker, U. und Perrimon, N. (1998). "DRhoGEF2 encodes a member of the Dbl family of oncogenes and controls cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*." *Genes Dev.* 12(2): 274-284.
- Hall, A. (1994). "Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton." *Annu Rev Cell Biol* 10: 31-54.
- Hamm, H. E. (1998). "The many faces of G protein signaling." *J Biol Chem* 273(2): 669-72.
- Harris, B. Z. und Lim, W. A. (2001). "Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly." *J Cell Sci* 114(Pt 18): 3219-31.
- Harris, T. J. C. und Peifer, M. (2004). "Adherens junction-dependent and -independent steps in the establishment of epithelial cell polarity in *Drosophila*." *J. Cell Biol.* 167(1): 135-147.
- Hart, M. J., Eva, A., Evans, T., Aaronson, S. A. und Cerione, R. A. (1991). "Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the db1 oncogene product." *Nature* 354(6351): 311-4.
- Hart, M. J., Eva, A., Zangrilli, D., Aaronson, S. A., Evans, T., Cerione, R. A. und Zheng, Y. (1994). "Cellular transformation and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the db1 oncogene product." *J Biol Chem* 269(1): 62-5.
- Hart, M. J., Jiang, X., Kozasa, T., Roscoe, W., Singer, W. D., Gilman, A. G., Sternweis, P. C. und Bollag, G. (1998). "Direct Stimulation of the Guanine Nucleotide Exchange Activity of p115 RhoGEF by G{alpha}13." *Science* 280(5372): 2112-2114.
- Hashimoto, C., Hudson, K. L. und Anderson, K. V. (1988). "The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein." *Cell* 52(2): 269-79.
- Hein, P., Frank, M., Hoffmann, C., Lohse, M. J. und Bunemann, M. (2005). "Dynamics of receptor/G protein coupling in living cells." *EMBO J.* 24(23): 4106-4114.
- Hortsch, M., Patel, N. H., Bieber, A. J., Traquina, Z. R. und Goodman, C. S. (1990). "*Drosophila* neurotactin, a surface glycoprotein with homology to

- serine esterases, is dynamically expressed during embryogenesis." *Development* 110(4): 1327-40.
- Hunter, C. und Wieschaus, E. (2000).** "Regulated expression of *nullo* is required for the formation of distinct apical and basal adherens junctions in the *Drosophila* blastoderm." *J Cell Biol* 150(2): 391-401.
- Ip, Y. T., Park, R. E., Kosman, D., Yazdanbakhsh, K. und Levine, M. (1992).** "dorsal-twist interactions establish *snail* expression in the presumptive mesoderm of the *Drosophila* embryo." *Genes Dev* 6(8): 1518-30.
- Izumi, Y., Ohta, N., Itoh-Furuya, A., Fuse, N. und Matsuzaki, F. (2004).** "Differential functions of G protein and Baz-aPKC signaling pathways in *Drosophila* neuroblast asymmetric division." *J. Cell Biol.* 164(5): 729-738.
- Jansen, G., Thijssen, K. L., Werner, P., van der Horst, M., Hazendonk, E. und Plasterk, R. H. (1999).** "The complete family of genes encoding G proteins of *Caenorhabditis elegans*." *Nat Genet* 21(4): 414-9.
- Jiang, J., Kosman, D., Ip, Y. T. und Levine, M. (1991).** "The dorsal morphogen gradient regulates the mesoderm determinant *twist* in early *Drosophila* embryos." *Genes Dev* 5(10): 1881-91.
- Jiang, J. und Levine, M. (1993).** "Binding affinities and cooperative interactions with bHLH activators delimit threshold responses to the dorsal gradient morphogen." *Cell* 72(5): 741-52.
- Kam, Z., Minden, J. S., Agard, D. A., Sedat, J. W. und Leptin, M. (1991).** "*Drosophila* gastrulation: analysis of cell shape changes in living embryos by three-dimensional fluorescence microscopy." *Development* 112(2): 365-70.
- Kasai, Y., Nambu, J. R., Lieberman, P. M. und Crews, S. T. (1992).** "Dorsal-ventral patterning in *Drosophila*: DNA binding of *snail* protein to the single-minded gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(8): 3414-8.
- Kim, E., Niethammer, M., Rothschild, A., Jan, Y. N. und Sheng, M. (1995).** "Clustering of Shaker-type K⁺ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases." *Nature* 378(6552): 85-8.
- Klebes, A. und Knust, E. (2000).** "A conserved motif in *Crumbs* is required for E-cadherin localisation and zonula adherens formation in *Drosophila*." *Curr Biol* 10(2): 76-85.
- Kornau, H. C., Schenker, L. T., Kennedy, M. B. und Seeburg, P. H. (1995).** "Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95." *Science* 269(5231): 1737-40.
- Kosman, D., Ip, Y. T., Levine, M. und Arora, K. (1991).** "Establishment of the mesoderm-neuroectoderm boundary in the *Drosophila* embryo." *Science* 254(5028): 118-22.
- Kozasa, T., Jiang, X., Hart, M. J., Sternweis, P. M., Singer, W. D., Gilman, A. G., Bollag, G. und Sternweis, P. C. (1998).** "p115 RhoGEF, a GTPase Activating Protein for G α ₁₂ and G₁₃." *Science* 280(5372): 2109-2111.
- Krieg, P. A. und Melton, D. A. (1984).** "Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs." *Nucleic Acids Res* 12(18): 7057-70.
- Kwan, K. M. und Kirschner, M. W. (2005).** "A microtubule-binding Rho-GEF controls cell morphology during convergent extension of *Xenopus laevis*." *Development* 132(20): 4599-4610.
- Lawrence, P. A. und Johnston, P. (1989).** "Pattern formation in the *Drosophila* embryo: allocation of cells to parasegments by even-skipped and *fushi tarazu*." *Development* 105(4): 761-7.

- Lemmon, M. A., Ferguson, K. M. und Schlessinger, J. (1996).** "PH domains: diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface." *Cell* 85(5): 621-4.
- Leptin, M. (1991).** "twist and snail as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development." *Genes Dev* 5(9): 1568-76.
- Leptin, M. (1999).** "Gastrulation in *Drosophila*: the logic and the cellular mechanisms." *Embo J* 18(12): 3187-92.
- Leptin, M. (2004).** *Gastrulation in Drosophila. Gastrulation - From Cells to Embryo.* Stern, C. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: pp. 91-104.
- Leptin, M. und Grunewald, B. (1990).** "Cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*." *Development* 110(1): 73-84.
- Lin, F., Sepich, D. S., Chen, S., Topczewski, J., Yin, C., Solnica-Krezel, L. und Hamm, H. (2005).** "Essential roles of G α _{12/13} signaling in distinct cell behaviors driving zebrafish convergence and extension gastrulation movements." *J Cell Biol* 169(5): 777-87.
- Lopez de la Paz, M., Lacroix, E., Ramirez-Alvarado, M. und Serrano, L. (2001).** "Computer-aided design of beta-sheet peptides." *J Mol Biol* 312(1): 229-46.
- Mahowald, A. P. (1963).** "Electron Microscopy of the Formation of the Cellular Blastoderm in *Drosophila Melanogaster*." *Exp Cell Res* 32: 457-68.
- Mazumdar, A. und Mazumdar, M. (2002).** "How one becomes many: blastoderm cellularization in *Drosophila melanogaster*." *Bioessays* 24(11): 1012-22.
- Merrill, P. T., Sweeton, D. und Wieschaus, E. (1988).** "Requirements for autosomal gene activity during precellular stages of *Drosophila melanogaster*." *Development* 104(3): 495-509.
- Morisato, D. und Anderson, K. V. (1995).** "Signaling pathways that establish the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo." *Annu Rev Genet* 29: 371-99.
- Morize, P., Christiansen, A. E., Costa, M., Parks, S. und Wieschaus, E. (1998).** "Hyperactivation of the folded gastrulation pathway induces specific cell shape changes." *Development* 125(4): 589-97.
- Müller, H. A. (2000).** "Genetic control of epithelial cell polarity: lessons from *Drosophila*." *Dev Dyn* 218(1): 52-67.
- Müller, H. A. und 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(1): 149-63.
- Myat, M. M. und Andrew, D. J. (2000a).** "Fork head prevents apoptosis and promotes cell shape change during formation of the *Drosophila* salivary glands." *Development* 127(19): 4217-26.
- Myat, M. M. und Andrew, D. J. (2000b).** "Organ shape in the *Drosophila* salivary gland is controlled by regulated, sequential internalization of the primordia." *Development* 127(4): 679-91.
- Nance, J. und Priess, J. R. (2002).** "Cell polarity and gastrulation in *C. elegans*." *Development* 129(2): 387-97.
- Narumiya, S. (1996).** "The small GTPase Rho: cellular functions and signal transduction." *J Biochem (Tokyo)* 120(2): 215-28.
- Neubig, R. R. (1994).** "Membrane organization in G-protein mechanisms." *Faseb J* 8(12): 939-46.
- Neubig, R. R., Gantzog, R. D. und Thomsen, W. J. (1988).** "Mechanism of agonist and antagonist binding to alpha 2 adrenergic receptors: evidence for a

- precoupled receptor-guanine nucleotide protein complex." *Biochemistry* 27(7): 2374-84.
- Niethammer, M., Kim, E. und Sheng, M. (1996).** "Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases." *J. Neurosci.* 16(7): 2157-2163.
- Nieto, M. A. (2002).** "The snail superfamily of zinc-finger transcription factors." *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(3): 155-66.
- Nieto, M. A., Sargent, M. G., Wilkinson, D. G. und Cooke, J. (1994).** "Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene." *Science* 264(5160): 835-9.
- Nikolaidou, K. K. und Barrett, K. (2004).** "A Rho GTPase Signaling Pathway Is Used Reiteratively in Epithelial Folding and Potentially Selects the Outcome of Rho Activation." *Current Biology* 14(20): 1822-1826.
- Oda, H., Tsukita, S. und Takeichi, M. (1998).** "Dynamic behavior of the cadherin-based cell-cell adhesion system during *Drosophila* gastrulation." *Dev Biol* 203(2): 435-50.
- Oda, H., Uemura, T., Harada, Y., Iwai, Y. und Takeichi, M. (1994).** "A *Drosophila* homolog of cadherin associated with armadillo and essential for embryonic cell-cell adhesion." *Dev Biol* 165(2): 716-26.
- Oda, H., Uemura, T., Shiomi, K., Nagafuchi, A., Tsukita, S. und Takeichi, M. (1993).** "Identification of a *Drosophila* homologue of alpha-catenin and its association with the armadillo protein." *J Cell Biol* 121(5): 1133-40.
- Offermanns, S., Laugwitz, K. L., Spicher, K. und Schultz, G. (1994).** "G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(2): 504-8.
- Padash Barmchi, M., Rogers, S. und Häcker, U. (2005).** "DRhoGEF2 regulates actin organization and contractility in the *Drosophila* blastoderm embryo." *J. Cell Biol.* 168(4): 575-585.
- Pan, D. J., Huang, J. D. und Courey, A. J. (1991).** "Functional analysis of the *Drosophila* twist promoter reveals a dorsal-binding ventral activator region." *Genes Dev* 5(10): 1892-901.
- Parks, S. und Wieschaus, E. (1991).** "The *Drosophila* gastrulation gene *concertina* encodes a G alpha-like protein." *Cell* 64(2): 447-58.
- Peifer, M. (1993).** "The product of the *Drosophila* segment polarity gene *armadillo* is part of a multi-protein complex resembling the vertebrate adherens junction." *J Cell Sci* 105 (Pt 4): 993-1000.
- Poulson, D. F. (1950).** Histogenesis, organogenesis and differentiation in the embryo of *Drosophila melanogaster*. *Biology of Drosophila*. Demerec, M. New York, Wiley: pp. 168-274.
- Reina, J., Lacroix, E., Hobson, S. D., Fernandez-Ballester, G., Rybin, V., Schwab, M. S., Serrano, L. und Gonzalez, C. (2002).** "Computer-aided design of a PDZ domain to recognize new target sequences." *Nat Struct Biol* 9(8): 621-7.
- Riggleman, B., Schedl, P. und Wieschaus, E. (1990).** "Spatial expression of the *Drosophila* segment polarity gene *armadillo* is posttranscriptionally regulated by wingless." *Cell* 63(3): 549-60.
- Rogers, S. L., Rogers, G. C., Sharp, D. J. und Vale, R. D. (2002).** "*Drosophila* EB1 is important for proper assembly, dynamics, and positioning of the mitotic spindle." *J Cell Biol* 158(5): 873-84.

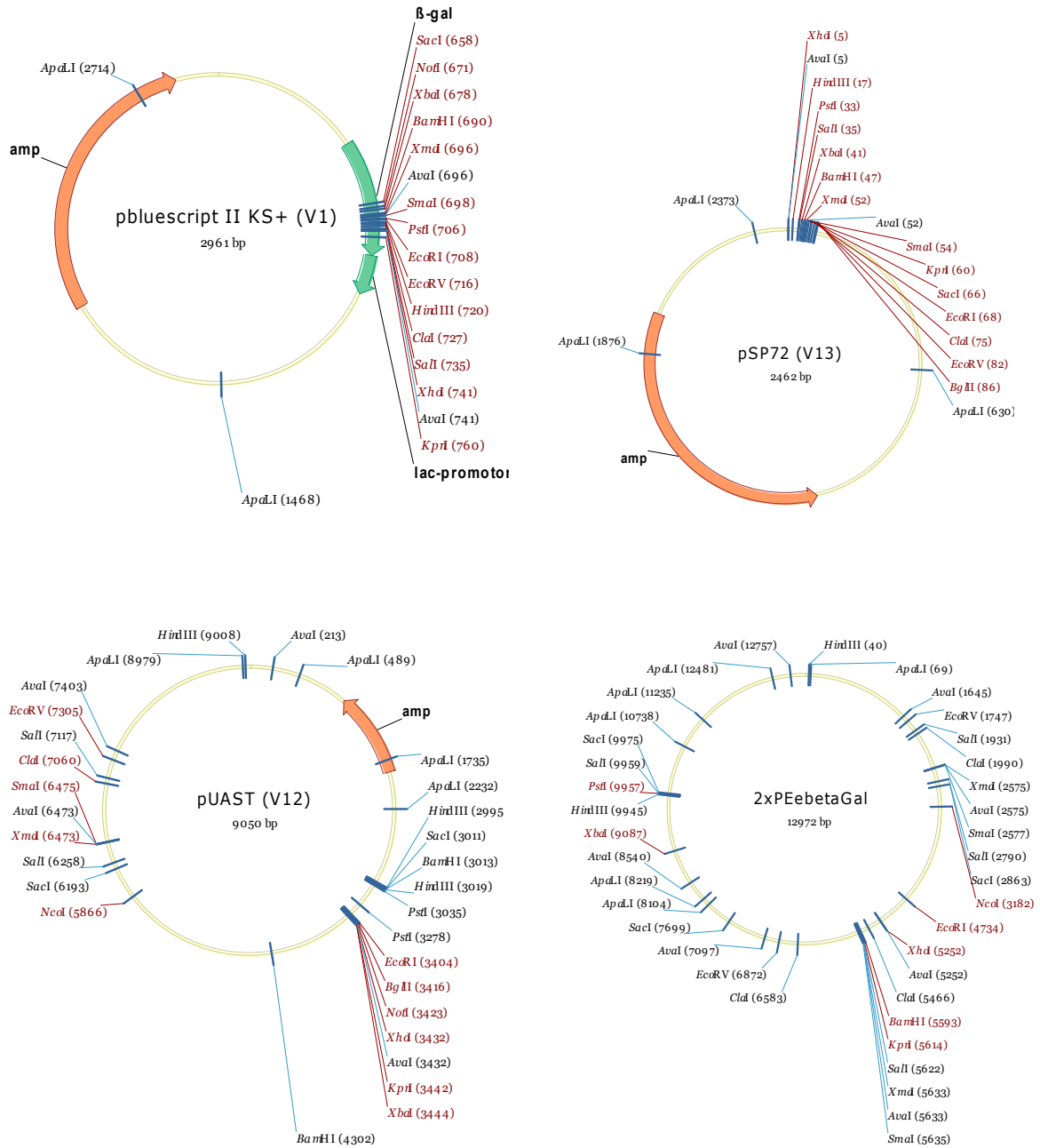
- Rogers, S. L., Wiedemann, U., Häcker, U., Turck, C. und Vale, R. D. (2004).** "Drosophila RhoGEF2 Associates with Microtubule Plus Ends in an EB1-Dependent Manner." *Curr Biol* 14(20): 1827-33.
- Roth, S., Stein, D. und Nüsslein-Volhard, C. (1989).** "A gradient of nuclear localization of the dorsal protein determines dorsoventral pattern in the *Drosophila* embryo." *Cell* 59(6): 1189-202.
- Royou, A., Field, C., Sisson, J. C., Sullivan, W. und Karess, R. (2004).** "Reassessing the role and dynamics of nonmuscle myosin II during furrow formation in early *Drosophila* embryos." *Mol Biol Cell* 15(2): 838-50.
- Rubin, G. M. und Spradling, A. C. (1982).** "Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors." *Science* 218(4570): 348-53.
- Rushlow, C. A., Han, K., Manley, J. L. und Levine, M. (1989).** "The graded distribution of the dorsal morphogen is initiated by selective nuclear transport in *Drosophila*." *Cell* 59(6): 1165-77.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989).** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Schaefer, M., Petronczki, M., Dorner, D., Forte, M. und Knoblich, J. A. (2001).** "Heterotrimeric G proteins direct two modes of asymmetric cell division in the *Drosophila* nervous system." *Cell* 107(2): 183-94.
- Schejter, E. D. und Wieschaus, E. (1993).** "Functional elements of the cytoskeleton in the early *Drosophila* embryo." *Annu Rev Cell Biol* 9: 67-99.
- Schonbaum, C. P., Organ, E. L., Qu, S. und Cavener, D. R. (1992).** "The *Drosophila melanogaster* stranded at second (sas) gene encodes a putative epidermal cell surface receptor required for larval development." *Developmental Biology* 151(2): 431-445.
- Seher, T. C. (2004).** Untersuchungen zur genetischen Kontrolle der Gastrulation bei *Drosophila melanogaster*. Institut für Genetik. Köln, Universität Köln.
- Seher, T. C. und Leptin, M. (2000).** "Tribbles, a cell-cycle brake that coordinates proliferation and morphogenesis during *Drosophila* gastrulation." *Curr Biol* 10(11): 623-9.
- Shewan, A. M., Maddugoda, M., Kraemer, A., Stehbens, S. J., Verma, S., Kovacs, E. M. und Yap, A. S. (2005).** "Myosin 2 Is a Key Rho Kinase Target Necessary for the Local Concentration of E-Cadherin at Cell-Cell Contacts." *Mol. Biol. Cell* 16(10): 4531-4542.
- Songyang, Z., Fanning, A. S., Fu, C., Xu, J., Marfatia, S. M., Chishti, A. H., Crompton, A., Chan, A. C., Anderson, J. M. und Cantley, L. C. (1997).** "Recognition of Unique Carboxyl-Terminal Motifs by Distinct PDZ Domains." *Science* 275(5296): 73-77.
- Sonnenblick, B. P. (1950).** The early embryology of *Drosophila melanogaster*. *Biology of Drosophila*. Demerec, M. New York, Wiley: pp. 62-167.
- St Johnston, D. und Nüsslein-Volhard, C. (1992).** "The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo." *Cell* 68(2): 201-19.
- Stern, C. (2004).** *Gastrulation - From Cells to Embryo*. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Steward, R. (1989).** "Relocalization of the dorsal protein from the cytoplasm to the nucleus correlates with its function." *Cell* 59(6): 1179-88.
- Strathmann, M., Wilkie, T. M. und Simon, M. I. (1989).** "Diversity of the G-protein family: sequences from five additional alpha subunits in the mouse." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(19): 7407-9.

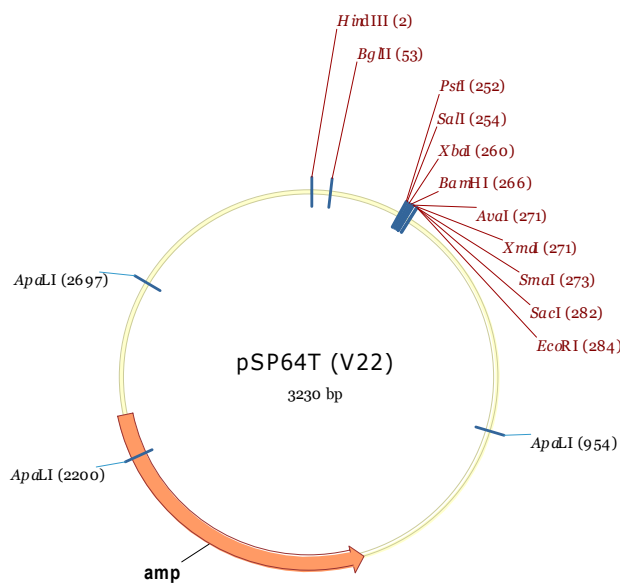
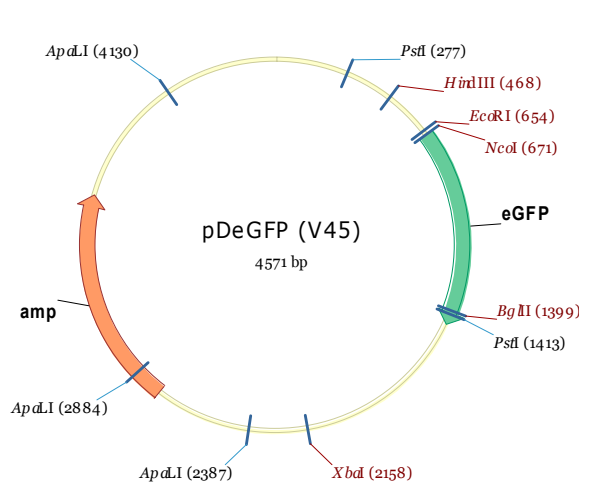
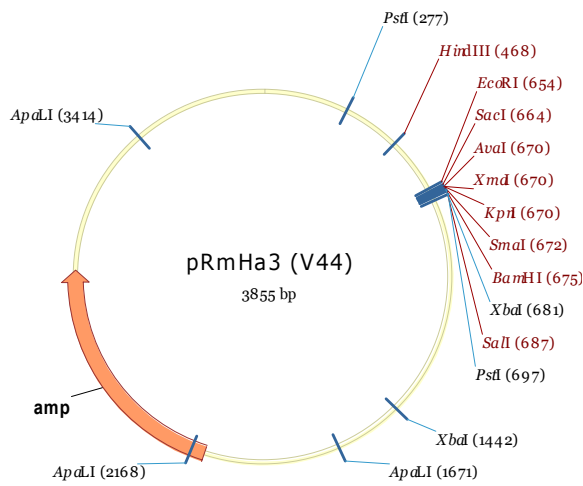
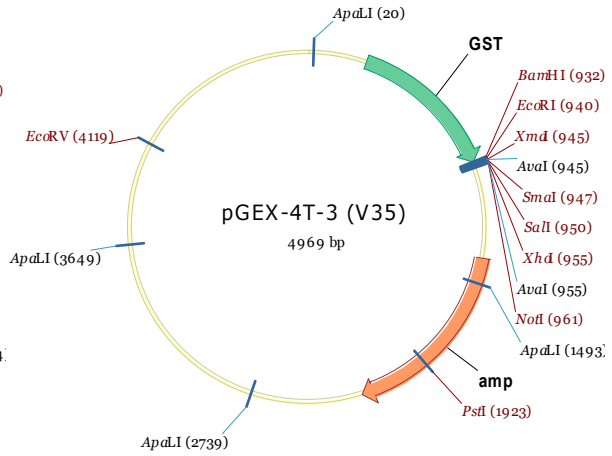
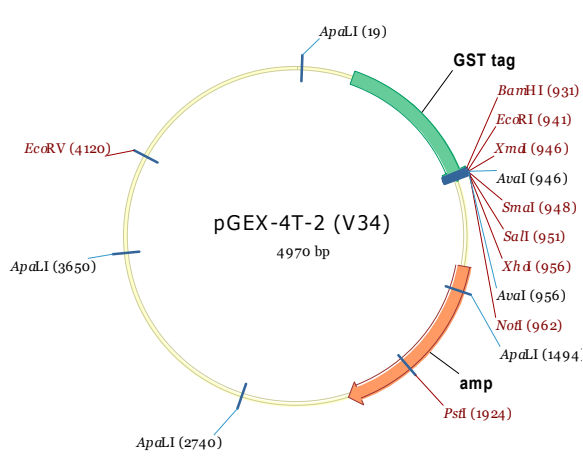
- Strathmann, M. P. und Simon, M. I. (1991).** "G alpha 12 and G alpha 13 subunits define a fourth class of G protein alpha subunits." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(13): 5582-6.
- Straub, K. L., Stella, M. C. und Leptin, M. (1996).** "The gelsolin-related flightless I protein is required for actin distribution during cellularisation in *Drosophila*." *J Cell Sci* 109 (Pt 1): 263-70.
- Strutt, D. I. und White, R. A. (1994).** "Characterisation of T48, a target of homeotic gene regulation in *Drosophila* embryogenesis." *Mech Dev* 46(1): 27-39.
- Stryer, L. und Bourne, H. R. (1986).** "G proteins: a family of signal transducers." *Annu Rev Cell Biol* 2: 391-419.
- Sweeton, D., Parks, S., Costa, M. und Wieschaus, E. (1991).** "Gastrulation in *Drosophila*: the formation of the ventral furrow and posterior midgut invaginations." *Development* 112(3): 775-89.
- Swiercz, J. M., Kuner, R., Behrens, J. und Offermanns, S. (2002).** "Plexin-B1 directly interacts with PDZ-RhoGEF/LARG to regulate RhoA and growth cone morphology." *Neuron* 35(1): 51-63.
- Takai, Y., Sasaki, T., Tanaka, K. und Nakanishi, H. (1995).** "Rho as a regulator of the cytoskeleton." *Trends Biochem Sci* 20(6): 227-31.
- Takata, K. und Singer, S. (1988).** "Phosphotyrosine-modified proteins are concentrated at the membranes of epithelial and endothelial cells during tissue development in chick embryos." *J. Cell Biol.* 106(5): 1757-1764.
- Tautz, D. und Pfeifle, C. (1989).** "A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback." *Chromosoma* 98(2): 81-5.
- Tepass, U., Gruszynski-DeFeo, E., Haag, T. A., Omatyar, L., Torok, T. und Hartenstein, V. (1996).** "shotgun encodes *Drosophila* E-cadherin and is preferentially required during cell rearrangement in the neuroectoderm and other morphogenetically active epithelia." *Genes Dev* 10(6): 672-85.
- Tepass, U., Tanentzapf, G., Ward, R. und Fehon, a. R. (2001).** "Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*." *Annual Review of Genetics* 35(1): 747-784.
- Thisse, B., Stoetzel, C., Gorostiza-Thisse, C. und Perrin-Schmitt, F. (1988).** "Sequence of the twist gene and nuclear localization of its protein in endomesodermal cells of early *Drosophila* embryos." *Embo J* 7(7): 2175-83.
- Thomas, G. H. und Williams, J. A. (1999).** "Dynamic rearrangement of the spectrin membrane skeleton during the generation of epithelial polarity in *Drosophila*." *J Cell Sci* 112 (Pt 17): 2843-52.
- Tomlinson, A., Kimmel, B. E. und Rubin, G. M. (1988).** "rough, a *Drosophila* homeobox gene required in photoreceptors R2 and R5 for inductive interactions in the developing eye." *Cell* 55(5): 771-84.
- Tsukita, S., Oishi, K., Akiyama, T., Yamanashi, Y. und Yamamoto, T. (1991).** "Specific proto-oncogenic tyrosine kinases of src family are enriched in cell-to-cell adherens junctions where the level of tyrosine phosphorylation is elevated." *J Cell Biol* 113(4): 867-79.
- Turner, F. R. und Mahowald, A. P. (1977).** "Scanning electron microscopy of *Drosophila melanogaster* embryogenesis. II. Gastrulation and segmentation." *Dev Biol* 57(2): 403-16.
- Ueda, T., Kikuchi, A., Ohga, N., Yamamoto, J. und Takai, Y. (1990).** "Purification and characterization from bovine brain cytosol of a novel regulatory protein inhibiting the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to rhoB p20, a ras p21-like GTP-binding protein." *J Biol Chem* 265(16): 9373-80.

- Uemura, T., Oda, H., Kraut, R., Hayashi, S., Kotaoka, Y. und Takeichi, M. (1996).** "Zygotic Drosophila E-cadherin expression is required for processes of dynamic epithelial cell rearrangement in the Drosophila embryo." *Genes Dev* 10(6): 659-71.
- Van Aelst, L. und D'Souza-Schorey, C. (1997).** "Rho GTPases and signaling networks." *Genes Dev* 11(18): 2295-322.
- van der Linden, A. M., Moorman, C., Cuppen, E., Korswagen, H. C. und Plasterk, R. H. (2003).** "Hyperactivation of the G12-mediated signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* induces a developmental growth arrest via protein kinase C." *Curr Biol* 13(6): 516-21.
- Vincent, S., Wilson, R., Coelho, C., Affolter, M. und Leptin, M. (1998).** "The Drosophila protein Dof is specifically required for FGF signaling." *Mol Cell* 2(4): 515-25.
- Whitehead, I. P., Campbell, S., Rossman, K. L. und Der, C. J. (1997).** "Dbl family proteins." *Biochim Biophys Acta* 1332(1): F1-23.
- Wodarz, A., Ramrath, A., Kuchinke, U. und Knust, E. (1999).** "Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in Drosophila neuroblasts." *Nature* 402(6761): 544-7.
- Wolpert, L., Beddington, R., Jessell, T., Lawrence, P. A., Meyerowitz, E. und Smith, J. (2001).** *Principles of Development*. Oxford, Oxford University Press.
- Woods, D. F. und Bryant, P. J. (1991).** "The discs-large tumor suppressor gene of Drosophila encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions." *Cell* 66(3): 451-64.
- Woods, D. F. und Bryant, P. J. (1993).** "Apical junctions and cell signalling in epithelia." *J Cell Sci Suppl* 17: 171-81.
- Woods, D. F., Wu, J. W. und Bryant, P. J. (1997).** "Localization of proteins to the apico-lateral junctions of Drosophila epithelia." *Dev Genet* 20(2): 111-8.
- Yau, D. M., Yokoyama, N., Goshima, Y., Siddiqui, Z. K., Siddiqui, S. S. und Kozasa, T. (2003).** "Identification and molecular characterization of the G alpha12-Rho guanine nucleotide exchange factor pathway in *Caenorhabditis elegans*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(25): 14748-53.
- Yin, Z., Xu, X. L. und Frasch, M. (1997).** "Regulation of the twist target gene tinman by modular cis-regulatory elements during early mesoderm development." *Development* 124(24): 4971-82.
- Ying, z., Jin, L., Palmer, T. und Webb, R. C. (2005).** "Angiotensin II Up-regulates Leukemia-associated Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor (LARG), a RGS Domain Containing RhoGEF, in Vascular Smooth Muscle Cells 10.1124/mol.105.017830." *Mol Pharmacol*: mol.105.017830.
- Young, P. E., Pesacreta, T. C. und Kiehart, D. P. (1991).** "Dynamic changes in the distribution of cytoplasmic myosin during Drosophila embryogenesis." *Development* 111(1): 1-14.
- Zusman, S. B. und Wieschaus, E. F. (1985).** "Requirements for zygotic gene activity during gastrulation in Drosophila melanogaster." *Dev Biol* 111(2): 359-71.

7 Anhang

7.1 Vektorkarten





lacZα ATG

M13 Reverse Primer: CAG GAA ACA GCT AAG ACC ATG ATT ACC CCA AGC TAT TTA GGT GAC ACT ATA GAA GTC CTT TGT CGA TAC TGC TAC TAA TGC GGT TCG ATA AAT CCA CTG TGA TAT CTT

Sp6 Promoter: ↓

NsiI HindIII KpnI SacI BamHI SpeI

TAC TCA AGC TAT GCA TCA AGC TTG GTA CCG AGC TCG GAT CCA CTA GTA AGC GCC ATG AGT TCG ATA CGT AGT TCG AAC CAT GGC TCG AGC CTA GGT GAT CAT TCG CCG

BstXI EcoRI

GCC AGT CTT CTG GAA TTC GGC CCG ATG GGC GAA TTC TCG ACA TAT OGG TGA CAC GAC CTT AAG OGG GAT TTC CCG CTT AAG ACG TCT ATA

PCR Product

BstXI NotI XhoI NsiI XbaI ApaI

OCA TCA CAC TGG CCG CCG CTC GAG CAT GCA TCT AGA GGG CCC AAT TCG CCC TAT GGT AGT GTG ACC GGC GGC GAG CTC GTA CGT AGA TCT CCG GGG TTA AGC CCG ATA

T7 Promoter

M13 (-20) Forward Primer: AGT GAG TCG TAT TAC AAT TCA CTG GGC CTC GTT TTA GAA CCA CGT CTT GAC TGG GAA AAC TCA CTC AGC ATA ATG TTA AGT GAC CCG CAG CAA AAT GTT GCA GCA CTG ACC CTT TTS

Comments for pCR®II-TOPO®
3973 nucleotides

LacZα gene: bases 1-589
M13 Reverse priming site: bases 205-221
Sp6 promoter: bases 239-256
Multiple Cloning Site: bases 269-383
T7 promoter: bases 406-425
M13 (-20) Forward priming site: bases 433-448
f1 origin: bases 590-1027
Kanamycin resistance ORF: bases 1361-2155
Ampicillin resistance ORF: bases 2173-3033
pUC origin: bases 3178-3851

Danksagung

An dieser Stelle danke ich Maria Leptin, dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Promotion in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen, und für die Betreuung während meiner Arbeit.

Frank Sprenger danke ich für die Funktion als zweiter Prüfer meiner Arbeit. Siegfried Roth und Veit Riechmann danke ich, dass sie Vorsitz und Beisitz bei der Disputation übernehmen.

Mein Dank gilt allen jetzigen und früheren Mitgliedern der Arbeitsgruppen Leptin, Sprenger und Klein für Diskussionen, Hilfe, aber auch so manche schöne Feier und Ablenkung vom Stress der Arbeit! Besonders danke ich den Leuten der Gruppe Sprenger, dass sie mich so nett in ihrem Schreibraum aufgenommen haben. Dort drohte einem wenigstens nicht die Gefahr, durch umkippende Papierstapel erschlagen zu werden!

Besonders danke ich Juliane für die tolle technische Assistenz und für die vielen Minis, und natürlich für so manchen Spass an der Laborbank! Lisa danke ich besonders für die Hilfe bei den Injektionen. Auch möchte ich an dieser Stelle ausdrücklich unseren Spülfrauen Erika und Sigrid für ihre Arbeit danken! Denn ohne Euch wäre normales Arbeiten gar nicht möglich! Ausserdem danke ich Inge für ihre Hilfe bei sämtlichen, für mich immer noch schwer zu durchschauenden Formalitäten.

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle meinen Eltern für alle Unterstützung und Liebe, die sie mir geben!

Meinem Freund Maik gilt ebenso besonderer Dank für seine Hilfe, Liebe und Unterstützung – aber Du weißt ja eh, was ich sagen will!

Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Maria Leptin betreut worden.

Kölsch, V, Seher, T, Ballester, GFJ, Serrano, L, Leptin, M (submitted)

Control of *Drosophila* gastrulation by apical localisation of adherens junctions and RhoGEF2

Köln, Februar 2006

Verena Kölsch

Lebenslauf

Zur Person

Verena Kölsch
geboren am 20.01.78 in Hamburg
ledig

Schulbildung

1984-1988 Grundschule in Altenberge
1988-1997 Gymnasium Paulinum Münster

Studium und berufliche Tätigkeiten

1997-2002 Studium der Biologie an der Philipps Universität Marburg
Schwerpunkte: Entwicklungsbiologie, Genetik und Zoologie
während des Studiums: studentische Hilfskraft und Betreuung von Praktika
Titel der Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Expression und Regulation des *hand*-Gens bei *Drosophila melanogaster*“, betreut durch Dr. Achim. Paululat

2002-2006 Promotion an der Universität Köln , betreut durch Prof. Dr. Maria Leptin
Titel der Dissertation: „T48 reguliert mit Fog/Concertina die Zellformveränderungen während der Mesoderminvagination in *Drosophila melanogaster*“

Publikationen und Poster

Kölsch V, Paululat A.

The highly conserved cardiogenic bHLH factor Hand is specifically expressed in circular visceral muscle progenitor cells and in all cell types of the dorsal vessel during *Drosophila* embryogenesis. *Dev Genes Evol.* 2002 Nov;212(10):473-85.

Sellin, J, Albrecht, S, Kölsch, V and Paululat, A (in press)

Dynamics of heart differentiation, visualized utilizing enhancer elements of the *Drosophila melanogaster* bHLH transcription factor Hand. *Gene Expression Patterns*

Kölsch, V, Seher, T, Ballester, GFJ, Serrano, L, Leptin, M (submitted)

Control of *Drosophila* gastrulation by apical localisation of adherens junctions and RhoGEF2

2003 **18th Drosophila Research Conference 2003, Göttingen**
Poster: Identification of novel genes involved in ventral furrow formation

2004 **European Life Scientist Organisation Meeting 2004, Nizza**
Poster:T48 is involved in gastrulation in *Drosophila*

2005 **46th Annual Drosophila Research Conference 2005, San Diego**
Poster: T48 is involved in ventral furrow formation

Auszeichnungen

2005 **3. Preis: GSA student poster competition** (46th Annual Drosophila Research Conference 2005)