

Molekulare und funktionelle Analyse des Gens *rings lost*
(CG4420) in der Entwicklung von *Drosophila melanogaster*

Dissertation
zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades
"Doctor rerum naturalium"
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von
Tobias Morawe
aus Hamm (Westf.)

Göttingen 2010

Referent: Prof. Dr. Andreas Wodarz

Korreferent: Prof. Dr. Ernst Wimmer

Tag der mündlichen Prüfung: 21.04.2010

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Die potentielle Interaktion von CG4420 und Bazooka.....	1
1.2 Das Aktinzytoskelett.....	2
1.3 Die Oogenese von <i>Drosophila melanogaster</i>	5
1.3.1 Teilung der Keimbahnstammzellen und Zystenentwicklung	5
1.3.2 Die Etablierung der Ringkanäle.....	7
1.3.3 Endoreplikation und Zellzykluskontrolle	9
1.4 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS).....	11
1.5 <i>Ddi1/Vsm1</i> , das Homolog von <i>CG4420</i> in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
1.6 Themenstellung.....	16
2 Material und Methoden.....	17
2.1 Chemikalien und sonstige Reagenzien	17
2.1.1 Fotoarbeiten und Bildbearbeitung.....	18
2.1.2 Bakterienstämme.....	18
2.1.3 Plasmide/Vektoren.....	19
2.1.4 Oligonukleotide.....	19
2.1.5 Primärantikörper	23
2.1.6 Sekundärantikörper	24
2.2 Molekularbiologische Methoden	24
2.2.1 Isolierung von genomischer DNA aus Fliegen.....	24
2.2.2 Isolierung von genomischer DNA aus Embryonen mit Chelex.....	25
2.2.3 Plasmid-DNA Präparation im kleinen Maßstab (Minipräp)	25
2.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	26
2.2.5 Sequenzierungen von Nukleinsäuren.....	26
2.2.6 Transformation chemisch kompetenter Zellen	27
2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	27
2.2.8 Agarose-Gelelektrophorese.....	29
2.2.9 Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	29
2.2.10 DNA-Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen	29
2.2.12 Gateway pENTR/D-TOPO Klonierung.....	31

2.2.12.1 TOPO Klonierung in den pENTR-Vektor	31
2.2.12.2 Gateway LR Rekombination in Destinationsvektoren	31
2.2.13 Erzeugung von Punktmutationen in <i>rngo</i>	33
2.2.14 Erzeugung von Deletionskonstrukten von <i>rngo</i>	33
2.2.15 Zellkultur.....	34
2.3 Proteinbiochemische Methoden.....	35
2.3.1 Herstellung von Proteinextrakten	35
2.3.2 Koimmunpräzipitation (Ko-IP).....	35
2.3.3 SDS-PAGE und Western-Blot.....	36
2.3.4 GFP-Trap [®] für die Analyse von Interaktionspartnern von Rngo mittels Massenspektrometrie	37
2.3.5 Herstellung von GST/MBP-Fusionsproteinen.....	38
2.3.6 GST-Pulldown	39
2.3.7 Protease Aktivitätsassay.....	39
2.4 Histologische Methoden	40
2.4.1 Antikörperfärbungen an Ovarien	40
2.4.2 DNA-Fluoreszenz-Markierung.....	40
2.4.3 TUNEL-Färbung.....	41
2.5 Genetische Methoden.....	42
2.5.1 Fliegenzucht.....	42
2.5.2 Fliegenstämme	42
2.5.3 Das UAS-GAL4-System.....	43
2.5.4 Kreuzungen zur Rettung der Letalität von <i>rngo</i> -mutanten Fliegen mittels des UAS-GAL4-Systems	44
2.5.5 Keimbahntransformation von <i>Drosophila melanogaster</i>	45
2.5.6 Erzeugung von GFP-Keimbahnklonen mittels des FRT-FLP-Systems.....	45
2.5.7 Erzeugung von GFP-Follikelzellklonen mittels des FRT-FLP-Systems	47
3 Ergebnisse	48
3.1 Die Annotierung von <i>rings lost</i> (<i>rngo</i>)	48
3.2 Rettungsexperimente.....	49
3.3 Die wildtypische Expression von Rngo.....	51
3.4 Untersuchung des Follikelepithels in <i>rngo</i> -mutanten Fliegen	54

3.4.1 Die Polarität des Follikelepithels von <i>rngo</i> -mutanten Fliegen ist nicht verändert	55
3.5 Untersuchung der Ovarien von Keimbahnklonen des mutanten <i>rngo</i> -Allels.....	56
3.5.1 Keimbahnklone des mutanten <i>rngo</i> -Allels zeigen verschiedene Phänotypen während der Oogenese	57
3.5.1.1 Keimbahnklone des mutanten <i>rngo</i> -Allels zeigen eine Fehllokalisierung von Ringkanal-assoziierten Proteinen, ektopische F-Aktin Akkumulationen und das Einwandern von Nährzellkernen in die Oozyte.....	58
3.5.1.2 Keimbahnklone des mutanten <i>rngo</i> -Allels zeigen keine Fehllokalisierung von monomeren Aktinuntereinheiten (G-Aktin)	68
3.5.1.3 Keimbahnklone des mutanten <i>rngo</i> -Allels zeigen keine apoptotischen Merkmale	69
3.5.1.4 Keimbahnklone des mutanten <i>rngo</i> -Allels zeigen eine atypische Morphologie des Oozytenkerns und der Nährzellkerne	71
3.5.1.5 Keimbahnklone des mutanten <i>rngo</i> -Allels zeigen keine Veränderung in der Expression von Cyclin E.....	73
3.5.1.6 Keimbahnklone des mutanten <i>rngo</i> -Allels zeigen keine Veränderung in der Formation des Fusoms	75
3.6 Rngo kolokalisiert in wildtypischen Ovarien mit dem Proteasom und Ubiquitin	76
3.7 Funktionelle Charakterisierung der vorhergesagten Proteindomänen von Rngo	79
3.8 Die Analyse von Interaktionspartnern von Rngo mittels Massenspektrometrie	94
4 Diskussion	97
4.1 Defekte in der Etablierung der Ringkanäle können nicht auf Fehler während der unvollständigen Zytokinese im Germarium zurückgeführt werden	98
4.2 <i>rngo</i> -Keimbahnklone weisen Abnormalitäten in der Größenkontrolle der Ringkanäle auf	99
4.3 Die Degenerierung der Plasmamembran von Keimbahnzellen in <i>rngo</i> -Keimbahnklonen und damit einhergehende multinukleäre Zellen, sind vermutlich auf eine fehlerhafte Verknüpfung von Aktinfilamenten zurückzuführen.....	104
4.4 <i>rngo</i> -Keimbahnklone zeigen eine atypische Morphologie der Nährzellkerne und des Oozytenkerns	109

4.5 Rngo könnte als extraproteasomaler Polyubiquitinrezeptor die Regulierung und Degradierung von Zielproteinen durch das Proteasom beeinflussen.....	112
4.6 Die Identifizierung von potentiellen Interaktionspartnern von Rngo	114
4.7 Die potentielle Interaktion von Rngo und Bazooka.....	115
5 Zusammenfassung.....	117
6 Literatur.....	119
7 Anhang.....	130

1 Einleitung

1.1 Die potentielle Interaktion von CG4420 und Bazooka

Apiko-basolaterale Zellpolarität ist ein Merkmal von Epithelien und neuronalen Stammzellen, den sogenannten Neuroblasten. Beide Zelltypen weisen eine apikale und eine basolaterale Plasmamembran auf, die sich in der Verteilung und Zusammensetzung verschiedener Proteine unterscheiden (Johnson und Wodarz, 2003). Die Neuroblasten delaminieren aus dem darüber liegenden neuroektodermalen Epithel und behalten dabei die ausgeprägte Polarität der Epithelzellen bei. Apikal befindet sich der PAR/aPKC-Komplex (bestehend aus *bazooka*, *baz*; *atypische Protein Kinase C*, *DaPKC*; *partitioning defective protein 6*, *DmPar6*) der einen kortikalen Halbmond bildet (Wodarz et al., 1999). Wenn Mutationen in den Komponenten des PAR/aPKC-Komplexes vorliegen, kommt es zu einem Verlust der apiko-basolateralen Polarität in Neuroblasten und Epithelien (Petronczki und Knoblich, 2001; Wodarz et al., 2000). Doch wie genau die Verteilung der apikal und basolateral lokalisierten Proteine abläuft, ist noch nicht ganz geklärt. Alle Proteine des PAR/aPKC-Komplexes sind zytoplasmatische Proteine und es konnte erst vor kurzem für Bazooka gezeigt werden, dass es einen Lipidanker besitzt und so direkt an die Membran binden kann (Krahn et al., 2010). Also könnten die anderen Proteine des PAR/aPKC-Komplexes an Baz oder an andere Adapterproteine binden, welche dann die Lokalisierung der Komponenten an der apikalen Plasmamembran vermitteln. Aber wie diese Proteine zu den jeweiligen Zellpolen transportiert werden, ist bisher nicht bekannt. Hierbei könnte der vesikuläre Transport eine Rolle spielen.

Baz ist eine Schlüsselkomponente des PAR/aPKC-Komplexes und besitzt eine evolutionär hoch konservierte N-terminale Domäne, drei zentral gelegene PDZ-Domänen, ein aPKC-Bindemotiv und einen evolutionär nicht konservierten C-Terminus. Um mögliche Adapterproteine dieses Komplexes zu identifizieren, wurde ein Hefe zwei-Hybrid-Screen mit den drei PDZ Domänen von Baz durchgeführt. Hierbei wurde unter anderem CG4420 als Interaktionspartner ermittelt (von Stein, 2005). Das Gen kodiert für ein zytoplasmatisches Protein, welches evolutionär hochkonserviert ist. Homologe von *CG4420* existieren in beinahe allen Eukaryoten,

eingeschlossen Tieren, Pilzen und Pflanzen. Besonders die Funktion des Homologs aus der Hefe Ddi1/Vsm1 (DNA-damage-inducible 1/v-SNARE master 1), gibt Grund zur Annahme, dass CG4420 an dem gerichteten Transport von Baz beteiligt sein könnte. In *Saccharomyces cerevisiae* reguliert Ddi1/Vsm1 Exozytose, welche für die Polarisierung von Zellen benötigt wird (Lustgarten und Gerst, 1999). Ddi1/Vsm1 bindet an die v-SNARE (*vesicle-soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor*) Proteine Snc1 und Snc2 und verhindert damit die Bindung der v-SNAREs an das t-SNARE (*target-SNARE*) Protein Sec9 (Lustgarten und Gerst, 1999; Marash und Gerst, 2003). Dadurch kann kein Fusionskomplex mehr gebildet werden und die Vesikel können nicht mit der Plasmamembran verschmelzen. Die Überexpression von Ddi1/Vsm1 führt zu einer Akkumulation von sekretorischen Vesikeln an der Plasmamembran. Da bisher in Epithelien und Neuroblasten von *Drosophila melanogaster* wenig über die Kontrolle des vesikulären Transports und der Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran bekannt ist, könnte CG4420 ein wichtiges Bindeglied in diesem Prozess darstellen und sollte daher im Rahmen dieser Arbeit näher auf seine Funktion hin untersucht werden.

Im Verlauf dieser Arbeit konnte CG4420 eine Rolle in der Etablierung des Aktinzytoskeletts während der Oogenese sowie eine Assoziation mit dem Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) zugeordnet werden. Daher werden die grundlegenden Mechanismen dieser Prozesse in den folgenden Kapiteln zusammengefasst.

1.2 Das Aktinzytoskelett

Das Aktinzytoskelett besteht aus verknüpften Aktinfilamenten (F-Aktin, filamentöses-Aktin) und bestimmt die Form von lebenden Zellen und deren Beweglichkeit. Die Etablierung dieser Filamente wird durch die Verknüpfung von monomeren Aktinuntereinheiten (G-Aktin, globuläres-Aktin) an die Enden eines Polymers bewerkstelligt. Unter physiologischen Bedingungen polymerisieren Aktinmonomere spontan zu langen Filamenten. Die Polymerisierung beginnt erst sehr langsam, da kleine Oligomere relativ instabil sind. Ist jedoch erst ein Filament etabliert, vollzieht sich der Prozess sehr schnell. Aktinfilamente sind polar aufgebaut, da die Untereinheiten alle in dieselbe Richtung weisen. Dieser Prozess ist jedoch nicht

statisch, sondern sehr dynamisch und so wird an beiden Enden des Polymers kontinuierlich G-Aktin abgebaut. Das dynamischere der beiden Enden, an dem sowohl Wachstum als auch Abbau am schnellsten sind, wird als plus-Ende, das andere als minus-Ende bezeichnet (Alberts et al., 2008). Die entstehenden Polymere allein sind relativ instabil und erhalten ihre Festigkeit durch Anlagerung an andere Aktinpolymere mit denen sie Protofilamente bilden. Diese Protofilamente sind in der Form einer Helix miteinander verbunden.

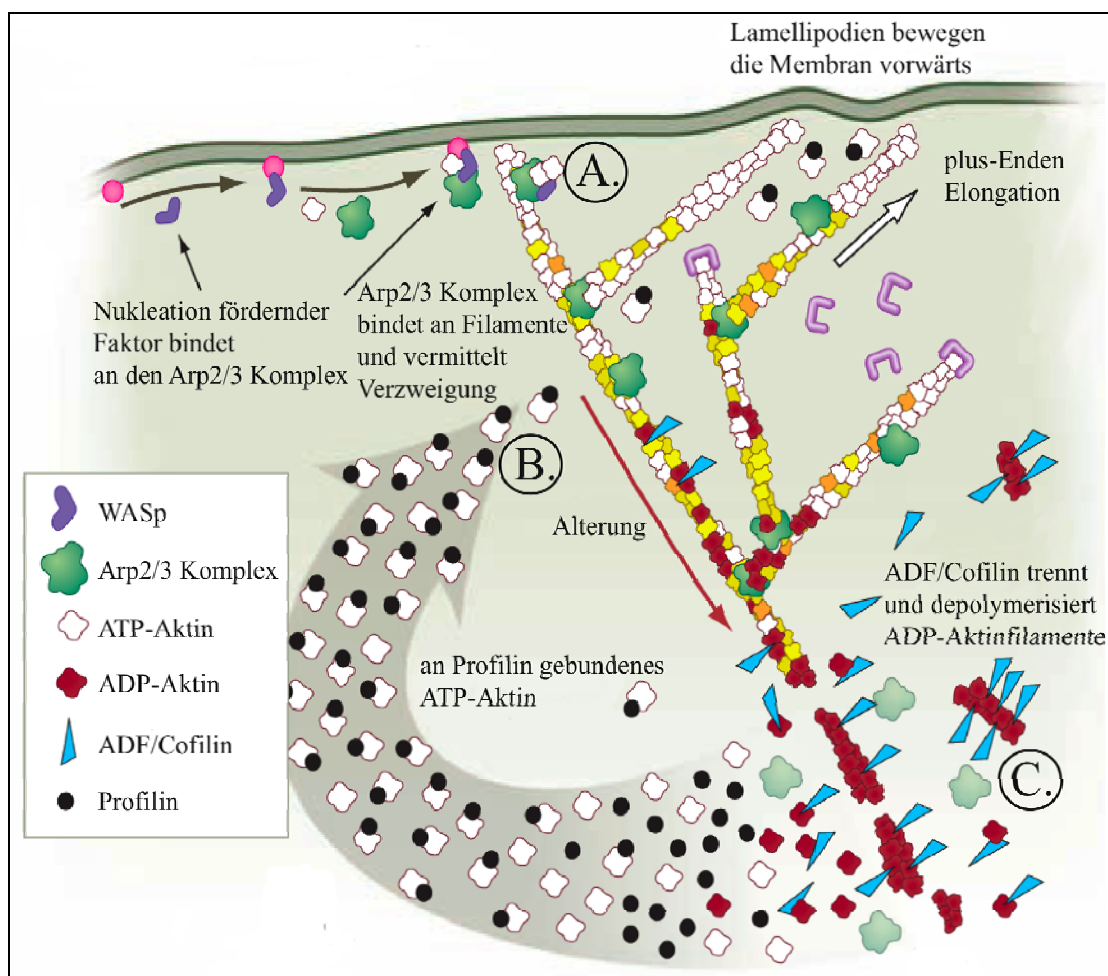


Abbildung 1.1: **Das Aktinzytoskelett.** A. Die Verzweigung der Aktinfilamente wird durch den Arp2/3-Komplex zusammen mit seinem Regulator WASp vermittelt. Hierdurch können Filamente entstehen, die den Leitsaum bilden und so für die Bewegung der Zelle zuständig sind. B. Profilin fördert den Austausch von Nukleotiden an Aktin und verhindert die Filamentverlängerung am minus- aber nicht am plus-Ende. C. Die Depolymerisierung von F-Aktin zu G-Aktin wird durch ADF/Cofilin vermittelt (verändert nach Pollard und Cooper, 2009).

Dieser Prozess wird auch als Keimbildung bzw. Nukleation bezeichnet (Kabsch und Vandekerckhove, 1992). Durch die Nukleation bildet sich an der Plasmamembran der sogenannte Leitsaum aus, welcher aus Lamellipodien besteht. Diese Aktin-reichen

Lamellipodien erlauben es der Zelle sich über eine Oberfläche zu bewegen (Condeelis, 1993; Small, 1989).

Der Arp2/3-Komplex (Abbildung 1.1A) ist ein Komplex aus sieben Proteinen und reguliert die Verzweigung von Aktinfilamenten. Er besteht aus den Aktin verwandten Proteinen Arp2, Arp3 und Arpc1-5. Für die Nukleation von Aktinfilamenten benötigt er als aktivierenden Ko-Faktor das Wiskott-Aldrich-Syndrom Protein (WASp). Der Arp2/3-Komplex bindet an WASp und an Aktinfilamente. Dieser aktivierte Komplex imitiert die Struktur eines plus-Endes und führt so zu einer Polymerisierung von neuen Aktinfilamenten in einem charakteristischen Winkel von 70° zum Ausgangsfilament (Bailly et al., 2001; Mullins et al., 1998; Robinson et al., 2001; Volkman et al., 2001), so dass verzweigte Filamente entstehen können.

Abbildung 1.1B zeigt die durch Profilin vermittelte Elongation von Aktinfilamenten. Aktinmonomere sind ATPasen, die einen Zyklus aus Bindung und Hydrolyse von Nukleotiden (ATP/ADP) durchlaufen. Bei der Polymerisierung von Aktinfilamenten lagern sich ATP-gebundene Aktinmonomere hauptsächlich an das plus-Ende an, bei der Depolymerisierung dissoziieren ADP-gebundene Monomere vor allem vom minus-Ende. Profilin, welches ein Aktinmonomer bindet, verringert die Affinität von Aktin zu seinem gebundenen Nukleotid um das 1000-fache. Da ATP generell im großen Überschuss zu ADP in der Zelle vorliegt, bewirkt dies den Austausch von ADP-Aktin zu ATP-Aktin. Dies führt dazu, dass Profilin die Filamentverlängerung unterstützt (Bear und Gertler, 2009; Theriot und Mitchison, 1993). Profilin kann die Filamentverlängerung auch durch einen weiteren Mechanismus steuern. Es konnte gezeigt werden, dass der Profilin-Aktin-Komplex direkt an die plus-Enden der wachsenden Filamente binden kann. Profilin selbst besitzt aber eine relativ geringe Affinität für die plus-Enden und dissoziiert deshalb von diesen, lässt aber die Aktinuntereinheit zurück. Da die plus-Enden-Verlängerung mit Profilin gegenüber der Verlängerung ohne Profilin begünstigt ist, ist der Gesamtgehalt von freien Aktinmonomeren in der Gegenwart von Profilin geringer als ohne (Ferron et al., 2007).

ADF/Cofilin (*actin depolymerizing factor*, ADF) ist ein Aktin-depolymerisierendes Protein (Abbildung 1.1C) und spaltet die Aktinfilamente an den minus-Enden. Hierdurch wird der Vorrat an monomerem Aktin wieder aufgefüllt und der Aufbau von Aktinfilamenten bleibt dynamisch. Phosphorylierung von ADF/Cofilin durch Kinasen hemmt dessen Aktivität, während Dephosphorylierung durch Phosphatasen das Protein

aktiviert. Zusätzlich zum Abbau der minus-Enden kann ADF/Cofilin auch die Verzweigung der Aktinfilamente durch den Arp2/3-Komplex auflösen (Chan et al., 2009). Die auf Aktin-basierende Beweglichkeit von Zellen beruht auf der dynamischen Neuordnung der Aktinfilamente. ADF/Cofilin bindet an ADP-Aktinfilamente und induziert dort eine Drehung, welche zu einem Verlust der Verzweigung, aber auch zu einem Bruch des Filaments führen kann (McGough et al., 1997).

1.3 Die Oogenese von *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster besitzt paarig angelegte Eierstöcke, die sogenannten Ovarien. Ein Ovar besteht aus mehreren Bündeln von Ovariolen. Die Ovariolen münden in die seitlichen Eileiter, wobei sich die beiden seitlichen Eileiter im zentralen Eileiter vereinigen. Anterior in den Ovariolen befinden sich die Germarien, welche ihrerseits anterior die Keimbahnstammzellen beherbergen. Diese Keimbahnstammzellen geben posterior die Zystoblasten ab, welche sich zu Zellzysten entwickeln. Nach der Verpackung der Zysten in Eikammern werden diese in den Ovariolen perlschnurartig aufgereiht und wachsen, während sie in Richtung der Ovidukte transportiert werden. Nach der Befruchtung der Weibchen erfolgt die Eiablage und es schließt sich die Embryonalentwicklung an.

1.3.1 Teilung der Keimbahnstammzellen und Zystenentwicklung

Die Oogenese wird in 14 Stadien unterteilt, wobei in Abbildung 1.2A exemplarisch die Entwicklung bis zum Stadium 10 veranschaulicht wird. Stadium 1 zeigt das Germarium mit einer sich abkoppelnden Zyste. Anterior im Germarium liegen die Keimbahnstammzellen (Abbildung 1.2B), welche mit dem Terminalfilament und den Kappenzellen in Verbindung stehen, die zusammen die Stammzellnische bilden (Xie und Spradling, 2000). Diese Keimbahnstammzellen teilen sich asymmetrisch und produzieren so wieder eine Stammzelle und eine Tochterzelle (Zystoblast), die sich weiter differenziert (Kai und Spradling, 2004). Der Zystoblast durchläuft weitere vier mitotische Teilungen mit unvollendeter Zytokinese und produziert so eine 16-

Zellzyste. Durch die unvollständige Zellteilung sind alle 16 Zellen durch zytoplasmatische Brücken, die sogenannten Ringkanäle, miteinander verbunden.

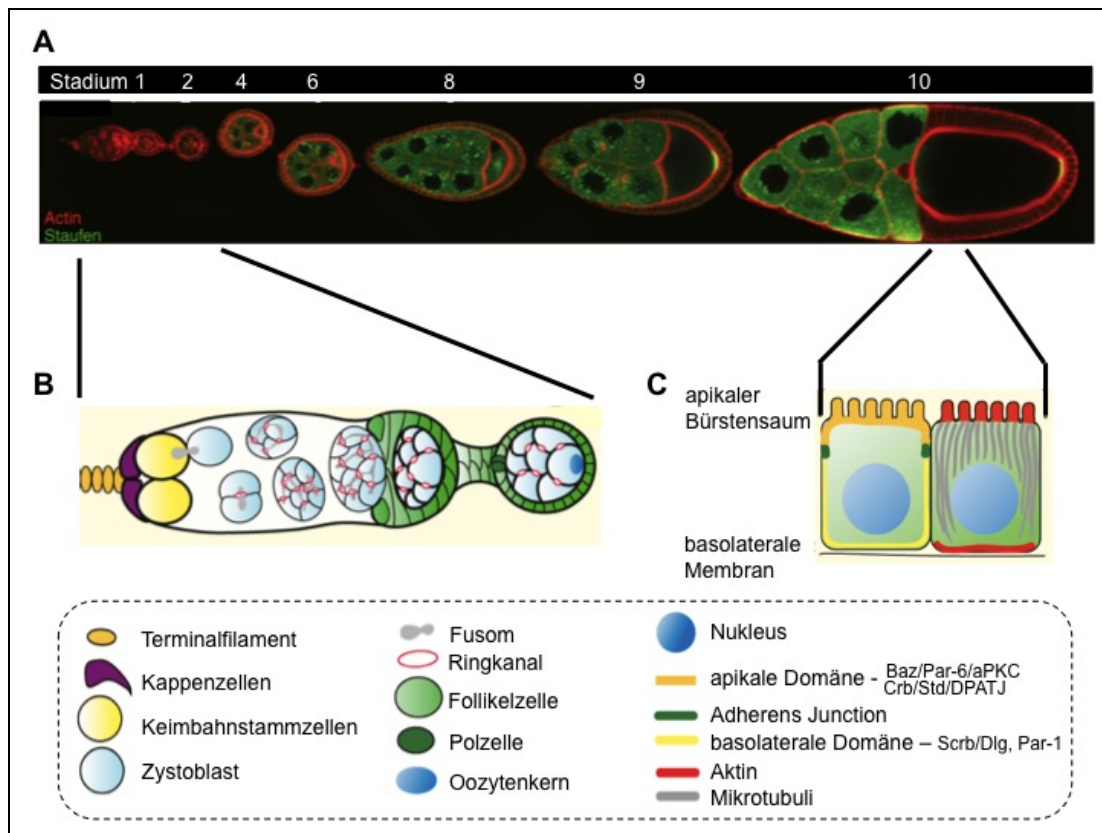


Abbildung 1.2: **Entwicklung der Ovariolen in *Drosophila melanogaster*.** **A.** Gezeigt ist eine Ovariolen, die GFP-Staufen (grün) exprimiert und in der durch Phalloidin (rot) filamentöses Aktin gefärbt wurde. Zu sehen sind die verschiedenen Stadien der Oogenese vom Germarium bis zum Stadium 10. **B.** Das Schema eines Germariums zeigt die Keimbahnstammzellen (gelb), aus denen sich der Zystoblast (blau) entwickelt. Der Zystoblast teilt sich weitere vier mal mit unvollständiger Zytokinese und so entsteht eine 16-Zellzyste. Alle 16 Zellen sind über Aktin-reiche Ringkanäle (rot) und das Fusom (grau) miteinander verbunden. **C.** Die somatischen Follikelzellen (grün) umgeben die Keimbahn und besitzen eine ausgeprägte apiko-basolaterale Polarität. Die apikale Domäne (orange) des Epithels wird durch zwei Proteinkomplexe (Baz/Par-6/aPKC sowie Crb/Std/DPATJ) repräsentiert, während der Scrb/Dlg-Komplex und Par-1 (gelb) die basolaterale Domäne charakterisieren. Die Adhärenz junctions sind in dunkelgrün, das Zytoskelett in rot und Mikrotubuli in grau dargestellt (verändert nach Bastock und St Johnston, 2008).

Die Orientierung dieser Zellteilungen wird von einer verzweigten Struktur, dem Fusom, kontrolliert. Das Fusom entsteht aus dem Spektrosom, welches durch dicht gepackte Vesikel gebildet wird. Diese Vesikel werden durch submembrane Zytoskelettbestandteile wie α -Spectrin, β -Spectrin und Hts-F (Hu-li tai shao-Fusom) zusammengehalten (de Cuevas et al., 1996; Lin et al., 1994). Wenn sich der Zystoblast teilt, bindet ein Teil des Spindelpols am Fusom (dem „originalen“ Fusom) während sich ein „neues“ Fusom am anderen Ende der Zelle im arretierten Ringkanal bildet (de Cuevas und Spradling, 1998; Storto und King, 1989).

Die beiden Fusome fusionieren, wobei die eine Zelle nun das „originale“ und eine Hälfte des „neuen“ Fusoms besitzt, während die andere Zelle nur die zweite Hälfte des neu gebildeten Fusoms aufweist. Diese asymmetrische Verteilung findet auch in den drei nachfolgenden Zellteilungen statt. Nach den vier mitotischen Teilungen besteht die Zyste aus acht Zellen mit je einem Ringkanal, aus vier Zellen mit zwei Ringkanälen, zwei Zellen mit drei und zwei Zellen mit vier Ringkanälen. Die Zelle, die nun vier Ringkanäle und das „originale“ Fusom aufweist differenziert zur Oozyte während die anderen Zellen polyploide Nährzellen werden.

1.3.2 Die Etablierung der Ringkanäle

Ringkanäle entstehen durch unvollständige Zytokinese während der vier mitotischen Teilungen der Keimbahnzyste (Kapitel 1.3.1). Sie verbinden alle 16 Zellen der Zyste miteinander, wodurch Proteine und RNAs von den Nährzellen in die Oozyte transportiert werden können (Cooley und Theurkauf, 1994). Sowohl die Etablierung der Ringkanäle, als auch der zytoplasmatische Transport von den Nährzellen in die Oozyte hängt von Aktin ab. Die Bildung der Ringkanäle ist ein hoch geordneter Prozess. Die Stabilisierung der aus einer Teilungsfurche entstehenden Ringkanäle erfolgt durch die Rekrutierung von Anillin (Ani), einem Aktin-bindenden Protein. Ani assoziiert bevorzugt mit F-Aktin in Teilungsfurchen und stabilisiert dadurch die dortigen Aktinfilamente (Abbildung 1.3A) (Field und Alberts, 1995).

Im Zuge der Entwicklung wachsen die Ringkanäle und es werden weitere Proteine zu diesen rekrutiert. Hu-li tai shao-Ring Canal (Hts-RC) und bisher nicht identifizierte Proteine, welche Phosphotyrosine tragen, assoziieren mit dem äußeren Rand der Ringkanäle und werden für deren weitere Expansion benötigt (Dodson et al., 1998; Roulier et al., 1998; Yue und Spradling, 1992). Zuletzt akkumulieren Kelch (Kel) und Cheerio (das *Drosophila* Filamin) an den Ringkanälen (Abbildung 1.3A) (Li et al., 1999; Robinson et al., 1994; Sokol und Cooley, 1999; Yue und Spradling, 1992). Kel bündelt und organisiert die Aktinfilamente während der Ausdehnung der Ringkanäle.

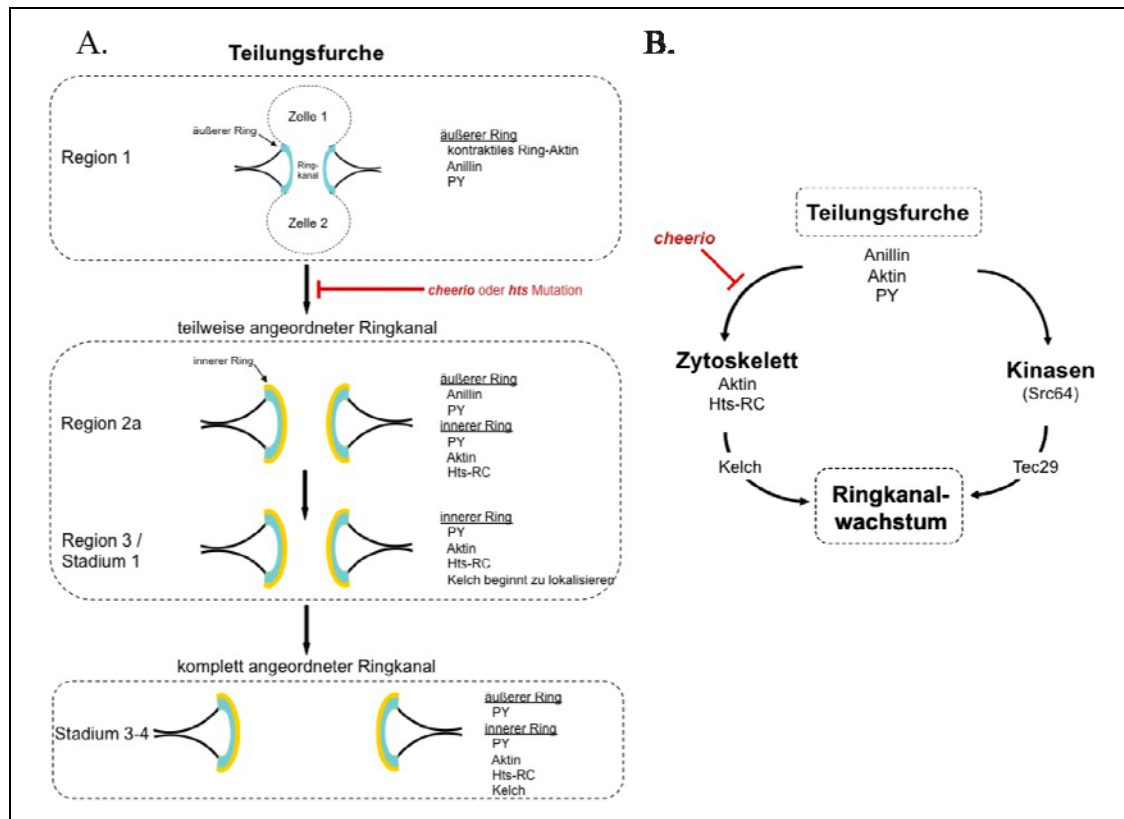


Abbildung 1.3: **Die Etablierung der Ringkanäle.** **A.** Die Ringkanäle etablieren sich an den Teilungsfurchen, während der vier mitotischen Teilungen der Keimbahnzyte. Zuerst lokalisieren unbekannte Proteine, die Phosphotyrosine tragen, zusammen mit Anillin an den Ringkanälen und bilden den äußeren Ring. Der innere Ring besteht aus Hts-RC und Aktinfilamenten. Kel lokalisiert als letztes Protein an den Ringkanälen und organisiert und bündelt die Aktinfilamente (verändert nach Robinson und Cooley, 1997b). **B.** Die bekannten Zytoskelettproteine und Phosphotyrosinkinasen werden unabhängig voneinander zu den Ringkanälen rekrutiert. Beide Wege werden für das Wachstum der Kanäle benötigt (verändert nach Cooley, 1998).

Außerdem wird die Expansion der Ringkanäle durch die zytoplasmatischen Tyrosinkinasen Src64 und Tec29 reguliert (Abbildung 1.3B) (Roulier et al., 1998). Mutationen in *src64* und *tec29* verringern dramatisch die Färbung von Phosphotyrosinen an den Ringkanälen sowie die Gesamtgröße der Kanäle (Guarnieri et al., 1998; Roulier et al., 1998), jedoch nicht die Lokalisierung von Aktin, Hts-RC oder Kel. Dies verdeutlicht, dass zwei Prozesse parallel die Ausdehnung der Ringkanäle steuern.

Weiterhin ist Aktin essentiell für den zytoplasmatischen Transport von Proteinen, mRNAs und Ribosomen durch die Ringkanäle in die Oozyte. Eine Phase des langsamen Transportes in frühen Stadien der Oogenese erfordert Aktinfilamente und Mikrotubuli (Bohrmann und Biber, 1994; Theurkauf et al., 1992). Anschließend

benötigt die schnelle Phase des Transportes (auch als *nurse cell dumping* bezeichnet) in Stadium 10b zwei verschiedene Aktin-Netzwerke in den Nährzellen. Das erste Netzwerk besteht aus kortikalem Aktin, welches zusammen mit zytoplasmatischem Myosin eine kontraktile Kraft bildet, die das Nährzellenzytoplasma schnell in die Oozyte pumpt (Edwards und Kiehart, 1996; Gutzeit, 1986; Wheatley et al., 1995). Das zweite Aktinnetzwerk besteht aus zytoplasmatischen Aktinfilamenten. Diese werden vor dem *nurse cell dumping* etabliert und bilden von der Plasmamembran der Nährzellen aus ein strahlenförmiges Netz, um die Nährzellkerne während des *dumpings* festzuhalten (Guild et al., 1997; Gutzeit, 1986; Riparbelli und Callaini, 1995).

1.3.3 Endoreplikation und Zellzykluskontrolle

Nach der Determinierung der Oozyte im 16-Zellstadium der Oogenese kondensiert das Chromatin der Oozyte zu einem dicht gepackten Karyosom (King, 1970). Die Bildung des Karyosoms beginnt schon im Stadium 1 der Eikammerentwicklung und hinterlässt einen Oozytenkern, der transkriptionell inaktiv ist (Liu et al., 2006). Die Vollendung der Meiose beginnt erst mit der Befruchtung des Eies. Die Nährzellen stellen große Mengen an Ribosomen, Proteinen und mRNAs zur Verfügung, welche dann über die Ringkanäle in die Oozyte transportiert werden. Hierfür werden polyploide Zellkerne benötigt, die durch Endoreplikation entstehen.

Bei der Endoreplikation folgen mehrere Runden der DNA-Vervielfältigung ohne Mitose aufeinander. Diese so entstehenden Polytänchromosomen zeichnen sich durch eine stark erhöhte transkriptionelle Aktivität aus, an die eine hohe Translation gekoppelt ist. Die Zyklen der Endoreplikation der Nährzellen sind asynchron, so dass posterior gelegene Nährzellen mehr Endozyklen durchlaufen als anteriore (Dej und Spradling, 1999). Die Regulierung der mitotischen und endoreplikatorischen Zellzyklen wird durch Cyclin abhängige Kinasen (*cyclin dependent kinases*, Cdks) vermittelt. Die Cdks bilden einen Komplex mit Cyclinen, durch die sie aktiviert werden. Der Cyclin-Cdk-Komplex kann zusätzlich durch Cyclin abhängige Kinaseinhibitoren (*cyclin dependent kinase inhibitor*, CKI) reguliert werden, welche an den Komplex binden und durch eine Konformationsänderung das aktive Zentrum der Cdks deaktivieren. Cycline werden im Laufe des Zellzyklus durch Ubiquitin

vermittelte Degradierung im 26S Proteasom abgebaut, wodurch die Cdks ebenfalls inaktiviert werden (Edgar und Orr-Weaver, 2001).

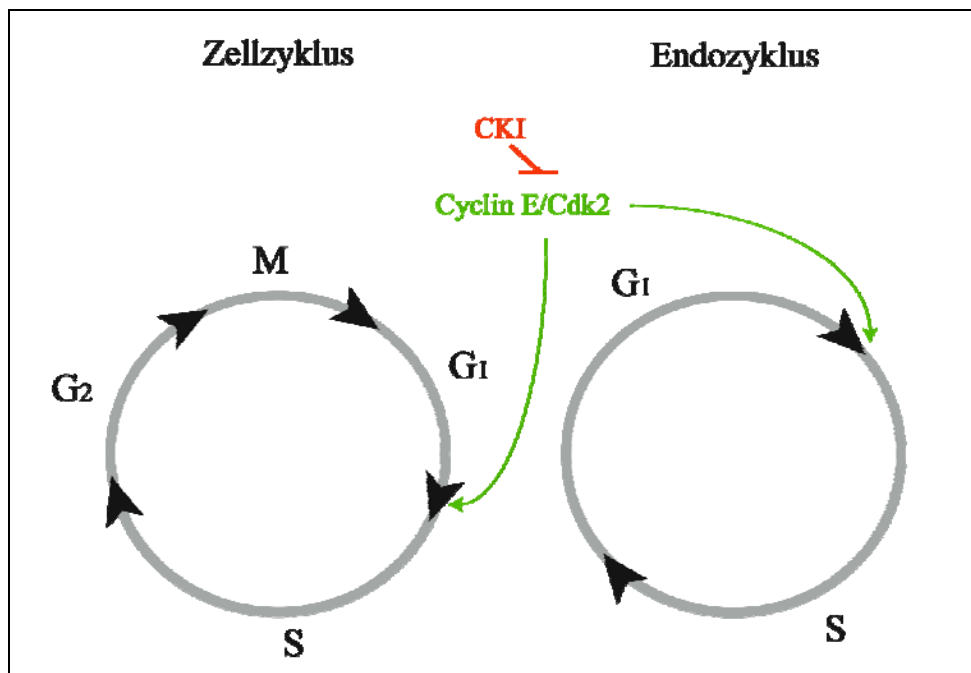


Abbildung 1.4: **Zellzyklus vs. Endozyklus.** Im Zellzyklus folgen vier Phasen aufeinander. Nach der Mitose (M) schließt sich die erste Ruhephase G₁ an, auf die die DNA-Synthese (S) Phase folgt. Dieser Übergang wird durch den Cyclin E/Cdk2-Komplex vermittelt und kann durch Cyclin abhängige Kinaseinhibitoren (CKIs) blockiert werden. Gefolgt von einer zweiten Ruhephase G₂ wird erneut die Mitose eingeleitet. Der Endozyklus, durch den polyploide Kerne entstehen, weist nur zwei dieser Phasen auf. Nach der G₁- folgt die S-Phase und anschließend direkt wieder die G₁-Phase.

Eine Schlüsselkomponente dieses Regulierungsprozesses stellt Cyclin E (CycE) dar. In der mitotischen Zellteilung folgen vier Phasen aufeinander. Nach der Mitose schließt sich die erste Ruhephase G₁ (*gap phase 1*) an. Dieser folgt die DNA-Synthese Phase S, wobei Cyclin E am Ende der G₁-Phase an Cdk2 bindet und so den Übergang in die S-Phase vermittelt. Es schließt sich die Ruhephase G₂ an, gefolgt von einer weiteren Mitose, die den Zyklus vervollständigt (Abbildung 1.4) (Alberts et al., 2008). Bei der Endoreplikation folgt auf die S-Phase direkt wieder eine G₁-Phase, wodurch polyploide Nährzellkerne entstehen. Da die Nährzellkerne ihre DNA asynchron replizieren ist CycE immer nur in einigen Kernen nachweisbar. Durch die Regulierung von CycE können also Aussagen über den korrekten Ablauf der Endozyklen getroffen werden (Doronkin et al., 2003).

1.4 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist für die räumliche und zeitliche Degradierung von Proteinen im Zytoplasma und im Zellkern von eukaryotischen Zellen verantwortlich (Hershko und Ciechanover, 1998). Diese strikte Kontrolle des Abbaus von Proteinen ist für viele zelluläre Prozesse, wie z.B. Zellzyklusregulierung, Induzierung von Apoptose, intrazelluläre Signalwege, transkriptionelle Regulierung und DNA-Reparatur wichtig. Außerdem reguliert das UPS auch die Qualitätskontrolle von Proteinen, da falsch gefaltete oder falsch lokalisierte Proteine erkannt und degradiert werden (Sherman und Goldberg, 2001). Das UPS hat generell zwei Funktionen: erstens die Ubiquitinierung von Proteinen und zweitens die Degradierung durch das Proteasom (Abbildung 1.5). Proteine, die durch das Proteasom abgebaut werden sollen, werden durch die Konjugation von Ubiquitin markiert (Pickart, 2001). Ubiquitin ist ein aus 76 Aminosäuren bestehendes Protein und wird durch verschiedene Enzyme an bestimmte Zielproteine gekoppelt. Für die Verknüpfung von Ubiquitin mit anderen Proteinen muss Ubiquitin erst von einem ATP-abhängigen Enzym (E1) aktiviert werden. Danach wird dieses auf ein Ubiquitin-verknüpfendes Enzym (E2) übertragen, welches dann zusammen mit Helferproteinen (E3) einen Komplex bildet. Im E2-E3-Komplex bindet die E3-Komponente an das Zielprotein und hilft so dem E2-Enzym bei der Konjugation von Ubiquitin sowie bei der Bildung von Multiubiquitinketten am Zielprotein, welche eine Erkennungssequenz für die Degradierung im Proteasom darstellen (Pickart, 2001). Hierbei erfolgt die Verbindung von Ubiquitin zu Polyubiquitinketten über eine Verknüpfung am Lysin48. Nach der Ubiquitinierung von Zielproteinen folgt aber nicht immer die Degradierung durch das Proteasom. Proteine können auch Ubiquitinketten aufweisen, die über Lysin63 verknüpft sind. Diese Ketten sowie multiple Monoubiquitinierung sind Erkennungssequenzen, die bei der Signaltransduktion, der DNA-Reparatur oder der Endozytose eine Rolle spielen (Hoege et al., 2002; Stelter und Ulrich, 2003; Wu et al., 2006).

Das 26S Proteasom ist ein tonnenförmiger Komplex (20S Untereinheit), welcher an beiden Enden eine Öffnung mit einem Deckel aufweist (19S Untereinheit) (Abbildung 1.5). Die 20S Untereinheit besteht aus zwei äußeren Ringen, die beide sieben α -Untereinheiten besitzen und zwei inneren Ringen, welche jeweils sieben β -

Untereinheiten aufweisen. Drei dieser β -Untereinheiten haben eine proteolytische Aktivität, die ins Innere der Kammer gerichtet ist. Die 19S Untereinheit besteht aus vielen einzelnen Untereinheiten, welche auf den Öffnungen der 20S Untereinheit sitzen (Glickman et al., 1998; Voges et al., 1999). Sie besitzt sechs ATPase-Untereinheiten (Rpt1-6), daneben drei Nicht-ATPase-Untereinheiten (Rpn1, Rpn2 und Rpn10) und eine Deckeluntereinheit bestehend aus Rpn3-Rpn9 und Rpn11-Rpn13. Die regulatorische 19S Untereinheit rekrutiert, entfaltet und transportiert Lysin48-polyubiquitinierte Proteine in das Proteasom, wo diese dann in der katalytischen 20S Untereinheit degradiert werden. Vor der Degradierung werden die Polyubiquitinketten von Deubiquitinierungs-Enzymen (DUB's) abgespalten und können so wieder verwertet werden, um weitere Proteine zu markieren (Verma et al., 2002; Yao und Cohen, 2002).

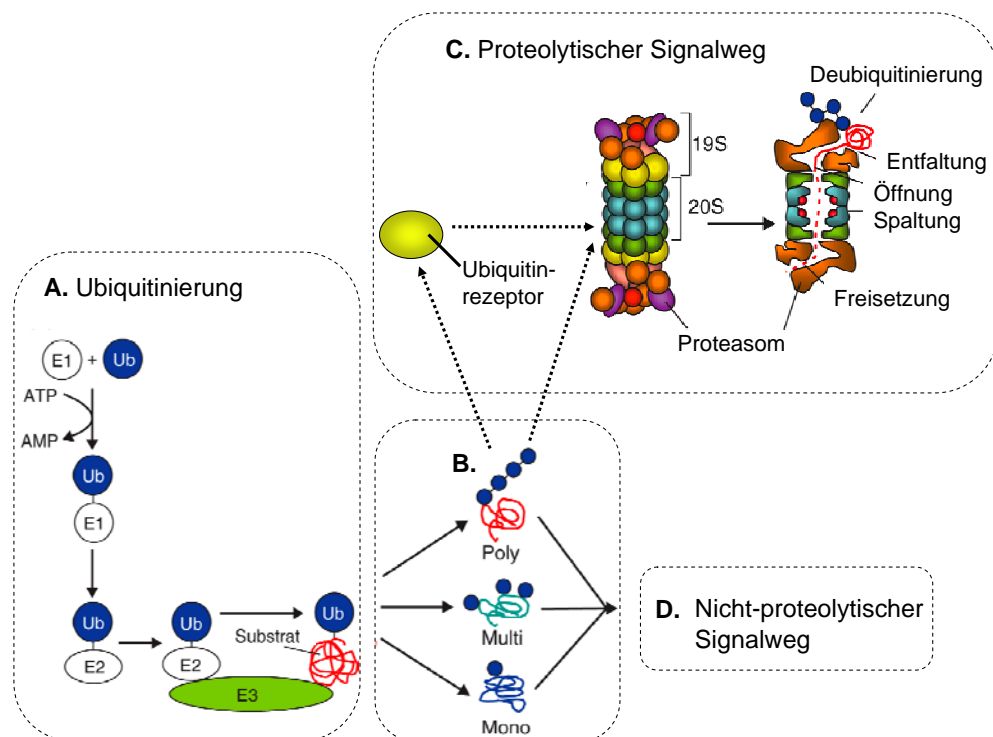


Abbildung 1.5: **Das Ubiquitin-Proteasom-System.** **A.** Ubiquitin wird durch ein Ubiquitin-aktivierendes-Enzym (E1) aktiviert und durch ein Ubiquitin-konjugierendes-Enzym (E2) und eine Ubiquitin-Ligase (E3) auf ein Substrat transferiert. **B.** Dies führt zu einer Anheftung von Monoubiquitin, Multiubiquitin oder Polyubiquitinketten am Zielprotein. Überwiegend werden polyubiquitinierte Proteine durch das 26S Proteasom degradiert, welches aus einer katalytischen 20S Untereinheit und zwei regulatorischen 19S Untereinheiten besteht. **C.** Entweder wird das Zielprotein durch extraproteasomale Polyubiquitinrezeptoren zum Proteasom transportiert oder direkt von Teilen der 19S Untereinheit erkannt. Diese entfaltet das Substrat bevor es in die katalytische 20S Untereinheit transportiert und dort degradiert wird. **D.** Ubiquitin kann Proteine auch direkt, durch Mono-, Multi- oder Polyubiquitinierung, über einen nicht proteolytischen Signalweg regulieren (verändert nach Kaiser und Huang, 2005).

Polyubiquitinierte Proteine werden von extraproteasomalen Polyubiquitinrezeptoren zum Proteasom eskortiert. Es ist jedoch auch bekannt, dass mindestens zwei 19S Untereinheiten, Rpn10 und Rpn13, direkt mit polyubiquitinierten Proteinen interagieren können (Husnjak et al., 2008; Schreiner et al., 2008; van Nocker et al., 1996; Verma et al., 2004). Extraproteasomale Polyubiquitinrezeptoren gehören zur Familie der Ubiquitin-ähnlichen (*ubiquitin-like*, UBL) und Ubiquitin-assoziierten (*ubiquitin-associated*, UBA) Proteine. Viele dieser Proteine tragen gleichzeitig eine N-terminale UBL-Domäne und eine C-terminal lokalisierte UBA-Domäne. Die UBL-Domäne interagiert hierbei mit dem Ubiquitin-interagierenden-Motiv (*ubiquitin interacting motif*, UIM) der proteasomalen Untereinheiten, wobei die UBA-Domäne an polyubiquitinierte Proteine bindet. Interessanterweise binden diese extraproteasomalen Polyubiquitinrezeptoren an proteasomale Untereinheiten, wie z.B. Rpn1, die selber nicht mit ubiquitinierten Proteinen interagieren (Elsasser et al., 2002; Kim et al., 2004; Li et al., 2008). Dadurch können sie als Adaptoren zwischen der Ubiquitinierung von Proteinen und deren proteasomaler Degradierung dienen.

Proteinmodifikation und -degradierung wird jedoch nicht nur durch Ubiquitin vermittelt. Es sind eine Reihe von Ubiquitin-ähnlichen Proteinen (*ubiquitin like proteins*, UBL) bekannt, die ähnliche Prozesse steuern. Die zwei am besten untersuchten Proteine sind SUMO (*small ubiquitin-related modifier*) und Nedd8 (*neural-precursor-cell-expressed developmentally down-regulated 8*). SUMO besitzt 18% identische Aminosäuren mit Ubiquitin und kann als reversible Proteinmodifikation die Lokalisierung von Zielproteinen durch veränderte Protein-Protein-Interaktionen beeinflussen (Geiss-Friedlander und Melchior, 2007; Melchior, 2000). Nedd8 weist von den bekannten UBLs die höchste Aminosäureidentität (55%) mit Ubiquitin auf (Hochstrasser, 2009). Nedd8 interagiert mit Cullin-Proteinen, die Gerüstproteine des SCF-(Skp1/cullin/F-box) Ubiquitin-Ligase-Komplexes sind. Dieser Komplex reguliert die Ubiquitinierung und Degradierung von Proteinen und ist in Prozessen wie z.B. Zellzyklusregulierung, transkriptionelle Regulierung, Signaltransduktion und Modifikation des Zytoskeletts beteiligt (Bloom et al., 2003; Karin und Ben-Neriah, 2000; Kondo und Kaelin, 2001; Kurz et al., 2002; Ohh et al., 2002).

1.5 *Ddi1/Vsm1*, das Homolog von *CG4420* in *Saccharomyces cerevisiae*

CG4420 ist ein evolutionär hoch konserviertes Protein, von dem Homologe in allen Eukaryoten existieren. Das am besten charakterisierte Homolog ist *Ddi1/Vsm1* (DNA-damage-inducible 1/v-SNARE master 1) aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. *Ddi1/Vsm1* wurde als transkriptioneller Regulator als Reaktion auf genotoxischen Stress in der Hefe identifiziert (Liu und Xiao, 1997). *Ddi1/Vsm1* besteht aus mindestens drei Protein-Domänen: einer N-terminalen UBQ-Domäne, einer C-terminalen UBA-Domäne und einer retroviralen Aspartatprotease-Domäne (RVP), die zwischen der UBQ und UBA-Domäne positioniert ist. Die UBQ-Domäne interagiert mit dem Proteasom, während die UBA-Domäne an ubiquitinierte Proteine bindet (Ivantsiv et al., 2006; Kaplun et al., 2005). Dadurch wurde *Ddi1/Vsm1* zusammen mit anderen UBQ-UBA-Proteinen (*Rad23* und *Dsk2*) als extraproteasomaler Polyubiquitinrezeptor beschrieben, der die Degradierung von ubiquitinierten Proteinen durch das 26S Proteasom vermittelt (Clarke et al., 2001; Elsasser und Finley, 2005; Hartmann-Petersen und Gordon, 2004). *Ddi1/Vsm1* bildet Heterodimere mit *Rad23* über die UBA- und UBQ-Domänen der beiden Proteine (Kang et al., 2006; Rao und Sastry, 2002). Zusätzlich bildet *Ddi1/Vsm1* Homodimere über die RVP-Domäne, wobei die biologische Funktion dieser Domäne noch nicht geklärt ist (Gabriely et al., 2008). *Ddi1/Vsm1* kann Monoubiquitin und Polyubiquitinketten über die UBA-Domäne binden. Lysin48-verknüpfte Tetraubiquitinketten werden von der UBA-Domäne von *Ddi1/Vsm1* und *Rad23* erkannt, wobei das *Ddi1/Vsm1*-*Rad23*-Heterodimer erst dissoziieren muss, um an diese Ketten binden zu können. Es wird angenommen, dass durch diesen Mechanismus die UBQ-UBA-Proteine eine unnötige Verlängerung von Polyubiquitinketten an Zielproteinen und deren Deubiquitinierung verhindern können, während diese zum Proteasom transportiert werden. *Ddi1/Vsm1* und *Rad23* können über ihre UBA-Domäne z.B. an ubiquitiniertes *Pds1* binden. *Pds1* ist ein Zellzyklus Checkpoint Faktor, der die Separierung der Schwesterchromatiden reguliert. *Ddi1/Vsm1* verhindert die Polyubiquitinierung von *Pds1*, welche das Signal für die Degradierung im 26S Proteasom darstellen würde und somit wird *Pds1* stabilisiert (Bertolaet et al., 2001).

Ddi1/Vsm1 besitzt als einziges der UBQ-UBA-Proteine eine evolutionär konservierte retrovirale Aspartatprotease-Domäne (RVP), deren katalytische Aktivität bis jetzt nicht beschrieben wurde. Die DSTG (Aspartat-Serin/Threonin-Glycin)-Signatur dieser Domäne ist ein Merkmal für Aspartatproteasen und ist konserviert in allen Eukaryoten. Alle charakterisierten Aspartatproteasen weisen eine zweilobige Struktur auf, bei der zwei katalytische Aspartate zwischen den Loben lokalisiert sind. Diese tragen ein aktiviertes Wassermolekül, welches für die Peptidhydrolyse benötigt wird (Davies, 1990). Bei retroviralen Aspartatproteasen bestehen die zwei Loben aus zwei einzelnen Untereinheiten, die nach der Homodimerisierung gebildet werden. Die Kristallstruktur der homodimerisierten RVP-Domäne von Ddi1/Vsm1 zeigt eine hohe Ähnlichkeit zu anderen retroviralen Aspartatproteasen. Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass auch Ddi1/Vsm1 eine proteolytische Funktion in *Saccharomyces cerevisiae* hat (Sirkis et al., 2006).

Ddi1/Vsm1 wurde in einem Hefe zwei-Hybrid-Screen als Interaktionspartner vom v-SNARE Snc1 und Snc2 ermittelt. Bindeversuche haben ergeben, dass Ddi1/Vsm1 eine höhere Affinität zu Snc2 hat (Lustgarten und Gerst, 1999). Ddi1/Vsm1 bindet gleichzeitig auch an t-SNARE Sec9 wodurch kein SNARE-Komplex von v- und t-SNAREs entstehen kann und so Vesikel nicht mit der Plasmamembran verschmelzen. Eine Überexpression von Ddi1/Vsm1 in der Hefe führt daher zu einer Akkumulation von Vesikeln an der Plasmamembran. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Ddi1/Vsm1 auch mit dem t-SNARE Sso1 in einem phosphorylierungsabhängigen Verhältnis interagiert. Die Bindung von Sso1 und Ddi1/Vsm1 verhindert die Assoziation von Sso1 mit dem verwandten t-SNARE Partner Sec9, was wiederum auf eine Rolle von Ddi1/Vsm1 in der Exozytose schließen lässt (Marash und Gerst, 2003).

1.6 Themenstellung

In der vorliegenden Arbeit sollte die molekulare Kontrolle des polarisierten Vesikeltransports durch den PAR/aPKC-Komplex in *Drosophila melanogaster* untersucht werden. Neuroblasten sowie Epithelien besitzen eine ausgeprägte Zellpolarität. Sie sind in eine apikale und eine basolaterale Domäne unterteilt. Die Etablierung dieser Polarität hängt von vielen Faktoren und Proteinen ab. Der PAR/aPKC-Komplex spielt in diesem Prozess eine Schlüsselrolle, da Mutationen in Genen dieses Komplexes mit einem Verlust der apiko-basolateralen Zellpolarität einhergehen. Es ist bis jetzt aber noch nicht bis ins Detail bekannt, wie sich die Unterteilung in verschiedene Plasmamembran-Domänen und der Transport dieser polar verteilten Proteine vollzieht. In einem Hefe zwei-Hybrid-Sceen mit Bazooka (Baz), einer Hauptkomponente des PAR/aPKC-Komplexes, wurde CG4420 als potentieller Interaktionspartner von Baz identifiziert. CG4420 ist evolutionär hoch konserviert und es existieren Homologe in nahezu allen Eukaryoten. Das Homolog von CG4420 aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, Ddi1/Vsm1, könnte einen Hinweis auf die Funktion von CG4420 in *Drosophila melanogaster* geben. Ddi1/Vsm1 kontrolliert als v-SNARE master 1 die Fusion von exozytotischen Vesikeln an der Plasmamembran und reguliert die Trennung der Schwesterchromatiden im Zellzyklus. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die Funktion des Proteins CG4420 untersucht werden. Hierfür wurde ein Null-Allel von *CG4420* verwendet, welches eine P-Element-Insertion (GE3956) stromabwärts des ATG-Startcodons besitzt und so kein Genprodukt von *CG4420* mehr exprimiert. Das Hauptaugenmerk lag darauf, auftretende Phänotypen in verschiedenen Geweben zu charakterisieren. Zusätzlich wurden transgene Fliegen hergestellt, welche ein GFP-Fusionsprotein von CG4420 exprimieren. Dadurch sollte in Rettungsexperimenten gezeigt werden, dass die Letalität des Null-Alles nur auf die Mutation in *CG4420* zurückzuführen ist. Durch die Generierung von Deletionskonstrukten der konservierten Proteindomänen von CG4420 sollte in proteinbiochemischen Experimenten eine weitere Aussage über die Funktion von CG4420 in der Entwicklung von *Drosophila melanogaster* getroffen werden. Da ein Phänotyp von Keimbahnklonen des mutanten *CG4420*³⁹⁵⁶-Allels ein Verlust von Ringkanälen während der Oogenese ist, wurde dem annotierten Gen *CG4420* der Name *rings lost* (*rngo*) verliehen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und sonstige Reagenzien

Alle Chemikalien wurden in der Qualität *pro analysis* von folgenden Firmen bezogen: *Biomol*, Hamburg; *Bio-Rad*, München; *Fluka*, Buchs, Schweiz; *Merk*, Darmstadt; *Carl Roth*, Karlsruhe; *Serva*, Heidelberg; *Sigma-Aldrich*, Steinheim.

Sämtliche Lösungen wurden mit demineralisiertem H₂O angesetzt und gegebenenfalls autoklaviert oder sterilfiltriert.

Enzyme für molekularbiologisches Arbeiten wurden, wenn nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen:

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

Folgende Kit-Systeme wurden in dieser Arbeit verwendet:

- pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit, *Invitrogen*, Groningen, NL
- Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix, *Invitrogen*, Groningen, NL
- FuGENE® HD Transfection Reagent, *Roche Diagnostics*, Mannheim
- Nucleobond AX, *Machery-Nagel*, Düren
- Nucleospin Extract Kit, *Machery-Nagel*, Düren
- In Situ Cell Death Detection Kit TUNEL, *Roche Diagnostics*, Mannheim
- BM Chemiluminescence Blotting Substrate, *Roche Diagnostics*, Mannheim
- QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit, *Stratagene*, LaJolla, USA
- GFP-Trap®, *Chromotek*, Planegg-Martinsried
- Protease Fluorescent Detection Kit, PF0100, *Sigma-Aldrich*, Steinheim

2.1.1 Fotoarbeiten und Bildbearbeitung

- Fotolichtmikroskop AxioImager, *Zeiss*, Jena
- Konfokales Mikroskop Zeiss LSM 510 Meta, *Zeiss*, Jena
- Röntgenfilm Fuji SuperRX, *Fuji*, Tokyo, Japan
- Röntgenfilm-Entwickler Tenetal Roentogen, *Tenetal*, Norderstedt
- Röntgenfilm-Fixierer Tenetal Roentogen Superfix, *Tenetal*, Norderstedt
- Computersystem Macintosh iMAC, *Apple*, Ismaning, USA
- Bildverarbeitung Adobe Photoshop CS2, *Adobe Systems*, San Jose, USA

2.1.2 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Verwendung
DH5 α	ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ ,m _k ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Standardwirt für diverse Plasmide
BL21	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , λ (DE3)	Bakterienstamm für die Expression von rekombinanten Proteinen
TOP10	F ⁻ , <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>), ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697, <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (strr), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Bakterienstamm für Klonierung von PCR-Fragmenten in pENTR

2.1.3 Plasmide/Vektoren

Plasmid-Vektor	Verwendung	Quelle
pGEX-4T-1	Vektor für die Expression von GST-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	<i>Amersham Pharmacia Biotech</i> , Buckinghamshire, England
pENTR	Ausgangsvektor für Gateway Klonierung	Gateway pENTR/D-TOPO Cloning Kit, <i>Invitrogen</i>
pUAS _{St} GW	Destinationsvektor mit einem N-terminalen GFP-Tag	<i>Drosophila</i> Gateway Vector Collection, Murphy Labor
pUAS _{St} WG	Destinationsvektor mit einem C-terminalen GFP-Tag	<i>Drosophila</i> Gateway Vector Collection, Murphy Labor
pUAS _p WG	Destinationsvektor mit einem C-terminalen GFP-Tag	<i>Drosophila</i> Gateway Vector Collection, Murphy Labor
pUAS _p WH	Destinationsvektor mit einem C-terminalen HA-Tag	<i>Drosophila</i> Gateway Vector Collection, Murphy Labor
pMGWA	Vektor für die Expression von MBP-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	<i>Drosophila</i> Gateway Vector Collection, Murphy Labor
pGGWA	Vektor für die Expression von GST-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	<i>Drosophila</i> Gateway Vector Collection, Murphy Labor
Actin5C-Gal4	Kotransfektion in S2-Zellen	Vektorsammlung A. Wodarz

2.1.4 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Verwendung
GE3956A	GAGGCGGCGTTTTTCGTTGT TGTGTCA	Lokalisierung des P-Elements GE3956
GE3956B	CACCTGCTGCTGCTCCTCC ACT	Lokalisierung des P-Elements GE3956
UP-Primer	GACGGGACCACCTTATGTT ATTCATCATG	Lokalisierung des P-Elements GE3956

FRT0.7for	GCGAAAGGTGGATGGGTA GGT	Nachweis der FRT9- 2-Rekombinanten
FRT0.7rev	AGGAGTGGCAGCATATAG AACAGC	Nachweis der FRT9- 2-Rekombinanten
GFP for	CACAAGTTCAGCGTGTCCG	Charakterisierung der zygotischen Mutante
GFP rev	CTTCTCGTTGGGGTCTTTG	Charakterisierung der zygotischen Mutante
vsm1-N-for	CACCAAATCACAGTGACG	Klonierung von <i>rngo</i> in pENTR
vsm1-N-rev	TCAGCTGAGTTCGCTCCCC GAG	Klonierung von <i>rngo</i> in pENTR
vsm1-C-for	CACCATGAAAATCACAGTG ACG	Klonierung von <i>rngo</i> in pENTR
vsm1-C-rev	GCTGAGTTCGCTCCCCGAG	Klonierung von <i>rngo</i> in pENTR
EGFP-C-for	CAAAGACCCCAACGAGAA G	Sequenzierung von Destinatinsvektoren
EGFP-N-rev	CGGACACGCTGAACTTG TG	Sequenzierung von Destinatinsvektoren
MBP for	GCGTGCTGAGCGCAGGTAT TAACGCCGC	Sequenzierung von Destinatinsvektoren
GWA rev	GCGTCCCATTCGCCAATCC GGATATAGTTCCTC	Sequenzierung von Destinatinsvektoren
GST for	CAGCAAGTATATAGCATGG C	Sequenzierung von Destinatinsvektoren
UASPf	GGCAAGGGTCGAGTCGATA G	Sequenzierung von Destinatinsvektoren
pPtagWrev	GCTATAATGTTATCAAGCT C	Sequenzierung von Destinatinsvektoren

M13 for	GTAAAACGACGGCCAG	Sequenzierung von pENTR-Konstrukten
M13 rev	CAGGAAACAGCTATGAC	Sequenzierung von pENTR-Konstrukten
Twinstar in pENTR for	CACCATGGCTTCTGGTGTA AC	Klonierung von <i>Twinstar</i> in pENTR
Twinstar in pENTR rev	TTGGCGGTTCGGTGGCCCGG AG	Klonierung von <i>Twinstar</i> in pENTR
Rpn10 in pENTR for	CACCATGGTTCTGGAGAGT AC	Klonierung von <i>Rpn10</i> in pENTR
Rpn10 in pENTR rev lang	TTTTTTTTGCGAGTCCTTGC CGTCGCTCTTTTTG	Klonierung von <i>Rpn10</i> in pENTR
RVPD257mutzuA for	GAAGGCCTTTGTGGCCTCT GGCGCCAGAC	Mutagenese von Aspartat 257 zu Alanin
RVPD257mutzuA rev	GTCTGGGCGCCAGAGGCCA CAAAGGCCTTC	Mutagenese von Aspartat 257 zu Alanin
UBA_EcoRImutCterm_for	AGAACGATTCACCGAATTC AGGATGTCACCGA	Deletion der UBA Domäne
UBA_EcoRImutCterm_rev	TCGGTGACATCCTGAATTC GGTGAATCGTTCT	Deletion der UBA Domäne
UBA_EcoRImutNterm_for	TCCGTGCTGCTCCGAATTC CGCAACGATGCCG	Deletion der UBA Domäne
UBA_EcoRImutNterm_rev	CGGCATCGTTGCGGAATTC GGAGCAGCACGGA	Deletion der UBA Domäne
UBQ_EcoRImutCterm_for	CCCTTCACCATGAGAATTC ACAGTGACGACCA	Deletion der UBQ Domäne
UBQ_EcoRImutCterm_rev	GGTCGTCACTGTGAATTCT CATGGTGAAGGG	Deletion der UBQ Domäne
UBQ_EcoRImutNterm_for	GACTTCATCATGCTGGAAT TCGACGCAGGAGC	Deletion der UBQ Domäne

UBQ_EcoRImutNterm_rev	GCTCCTGCGTCGAATTCCA GCATGATGAAGTC	Deletion der UBQ Domäne
RVP_EcoRImutCterm_for	CCAGAGATCTTTGGAATTC GGTTACAATGCTC	Deletion der RVP Domäne
RVP_EcoRImutCterm_rev	GAGCATTGTAACCGAATTC CAAAGATCTCTGG	Deletion der RVP Domäne
RVP_EcoRImutNterm_for	ACATCAGTGCCTGAATTCC GGACTTGCAGCGT	Deletion der RVP Domäne
RVP_EcoRImutNterm_rev	ACGCTGCAAGTCCGGAATT CAGGCACTGATGT	Deletion der RVP Domäne
GATE_deltaUBQ_for	CACCATGAGGAGCGCCAAT CGC	Deletion der UBQ und RVP Domäne
Vsm1_C_rev	GCTGAGTTCGCTCCCCGAG	Deletion der UBQ und RVP Domäne
GATE_deltaUBQ_for	CACCATGAGGAGCGCCAAT CGC	Deletion der UBQ und UBA Domäne
Vsm1_C_rev	GCTGAGTTCGCTCCCCGAG	Deletion der UBQ und UBA Domäne
Deletion_EcoRI_mut_for	AGAACGATTCACCGAGTTC CGCAACGATGCCG	Deletion der UBA und RVP Domäne
Deletion_EcoRI_mut_rev	CGGCATCGTTGCGGAACTC GGTGAATCGTTCT	Deletion der UBA und RVP Domäne
RVP_EcoRImutCterm_for	CCAGAGATCTTTGGAATTC GGTTACAATGCTC	Deletion der UBA und RVP Domäne
RVP_EcoRImutCterm_rev	GAGCATTGTAACCGAATTC CAAAGATCTCTGG	Deletion der UBA und RVP Domäne
RVP_EcoRImutNterm_for	ACATCAGTGCCTGAATTCC GGACTTGCAGCGT	Deletion der UBA und RVP Domäne
RVP_EcoRImutNterm_rev	ACGCTGCAAGTCCGGAATT CAGGCACTGATGT	Deletion der UBA und RVP Domäne

2.1.5 Primärantikörper

Epitop	Organismus	Bezeichnung	Hersteller/Quelle
CG4420	Kaninchen	α -Vsm1-GST (DE01017)	von Stein (2005)
Bazooka	Kaninchen	Baz N-term DE99646	Wodarz et al. (1999)
Par6	Meerschweinchen	DE02639 SA172	Kim et al. (2009)
aPKC	Kaninchen	nPKC ζ (C20)	Santa Cruz
26S Proteasome	Maus	p54 F2807	Santa Cruz
Aktin	Kaninchen	A2066	Sigma-Aldrich
GST	Kaninchen	G7781	Sigma-Aldrich
Phosphotyrosin	Maus	PY P3300 Klon PT-66	Sigma-Aldrich
F-Aktin		Rhodamin-Phalloidin	Molecular Probes
GFP	Kaninchen	A11122	Molecular Probes
GFP	Maus	Kat.Nr.: 11814460001	Roche
HA	Maus	12C25	Roche
G-Aktin	Maus	Klon C4	MP-Biomedicals
MBP	Maus	E8032S	New England Biolabs
Ubiquitin	Maus	UW8630 Klon FK2	Biomol
Tropomyosin	Ratte	Klon Mac141	Babraham Institute Cambridge
Armadillo	Maus	N2-7A1	DSHB
alpha Catenin	Ratte	DCAT-1	DSHB
DE-Cadherin	Ratte	DCAD2	DSHB
Discs Large	Maus	4F3	DSHB
Hu-li tai shao Ring Kanal	Maus	Hts-RC	DSHB
Kelch	Maus	Kel1B	DSHB
Orb	Maus	4H8	DSHB
Tubulin alpha	Maus	12G10	DSHB
CyclinE	Maus	<i>Drosophila</i> CyclinE	H. Richardson
Filamin	Ratte	N-Filamin	Sokol und Cooley (1999)
Hu-li tai shao Fusom	Maus	Hts-F	Robinson et al. (1994)
Leathal giant larvae	Kaninchen	Lgl	Bretschinger et al. (2003)
Twinstar	Kaninchen	tsr	Niwa et al. (2002)
Zipper	Kaninchen	Myosin heavy chain	Foe et al. (2000)

2.1.6 Sekundäntikörper

Name	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
Esel- α -Kaninchen	Cy2, Cy3	1:200	Dianova
Ziege- α -Kaninchen	Alexa 647	1:200	Dianova
Esel- α -Ratte	Cy2, Cy3	1:200	Dianova
Ziege- α -Ratte	Alexa 647	1:200	Dianova
Esel- α -Maus	Cy2, Cy3	1:200	Dianova
Ziege- α -Maus	Alexa 647	1:200	Dianova
Esel- α -Meerschweinchen	Cy2, Cy3	1:200	Dianova
Ziege- α -Meerschweinchen	Alexa 647	1:200	Dianova
Ziege- α -Kaninchen	HRP	1:10000	Dianova
Ziege- α -Maus	HRP	1:10000	Dianova

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung von genomischer DNA aus Fliegen

Die Isolierung von genomischer DNA aus Fliegen erfolgt, wenn nicht anders beschrieben, auf Eis. 30 Fliegen werden in ein Eppendorf-Gefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Zugabe von 200 μ l Puffer A werden die Fliegen mit einem Bio-Vortexer (*Biospec Products*, Bartlesville, USA) homogenisiert. Nun werden erneut 200 μ l Puffer A hinzugegeben und anschließend wird das Homogenisat für 30min bei 65°C inkubiert. Zur Fällung der Proteine werden 800 μ l einer LiCl/KAc-Lösung hinzupipettiert, für 30min auf Eis inkubiert und dann bei RT für 15min und 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die DNA mit 600 μ l Isopropanol gefällt. Nach erneuter Zentrifugation bei RT für 15min und 13000rpm wird der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Die gewaschene DNA wird in 50 μ l TE-Puffer resuspendiert und bei 4°C gelagert.

Puffer A: 100mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM EDTA, 100mM NaCl, 0,5% SDS

LiCl/KAc Lösung: 1 Teil 5M KAc/2,5 Teile 6M LiCl

TE-Puffer: 10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA

2.2.2 Isolierung von genomischer DNA aus Embryonen mit Chelex

Nach der Sortierung von Embryonen, die entweder den FM7 *twist::GFP* Balancer tragen oder mutant sind und diesen nicht tragen, werden 10 Embryonen desselben Genotyps in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Hierbei sind die Embryonen, die keine GFP-Fluoreszenz zeigen, die hemizygot mutanten Tiere. Die Embryonen werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und 50µl Chelex-Lösung hinzugegeben. Chelex ist ein Kunstharz, welches zweiwertige Ionen wie Ca^{2+} oder Mg^{2+} bindet und so für die Deaktivierung von DNasen zuständig ist, da diese bivalente Ionen für ihre Aktivität benötigen. Die Embryonen werden anschließend mit einem Bio-Vortexer homogenisiert und für 10min in Wasser aufgeköcht. Durch Zentrifugation für 10min bei 4°C und 13000rpm werden Gewebereste und Chelex-Kugeln von der DNA getrennt und der Überstand bei -20°C gelagert.

Chelex-Lösung: 5% Gewicht/Volumen-Mischung mit dH₂O

2.2.3 Plasmid-DNA Präparation im kleinen Maßstab (Minipräp)

Die Minipräp ist ein Verfahren um schnell und im kleinen Maßstab Plasmid-DNA zu präparieren. Hierfür werden 1,5ml einer Übernachtskultur für 3min bei 13000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 200µl Puffer S1 resuspendiert. Nach Zugabe von 200µl Puffer S2 und 5 maligem Invertieren folgt eine Inkubation für 5min bei RT. Anschließend werden 200µl Puffer S3 zugegeben, 5-mal invertiert und dann 20min bei 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, die enthaltene DNA mit 400µl Isopropanol gefällt und bei 13000rpm für 30min zentrifugiert. Das DNA-Pellet wird mit 200µl kaltem 70% Ethanol gewaschen und anschließend bei 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das DNA-Pellet getrocknet und in 20µl dH₂O aufgenommen.

Die Präparation von Plasmid-DNA im größeren Maßstab (Midipräp) wurde mit dem Nucleobond AX Kit der Firma *Macheray-Nagel*, Düren, nach Herstellerangaben durchgeführt.

Puffer S1: 50mM Tris pH 8.0, 10mM EDTA, 100µg RNase A/ml

Puffer S2: 20mM NaOH, 1% SDS

Puffer S3: 3M KAc pH 5.5

2.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Bevor DNA für Klonierungen oder Sequenzierungen verwendet wird muss die Konzentration der DNA bestimmt werden. Dieses erfolgt in einem Photometer, wobei reine DNA bei einer Wellenlänge von 260nm ihr Maximum an Absorption hat. Proteine hingegen weisen ein Absorptionsmaximum bei 280nm auf. Aus dem Quotienten dieser beiden Werte kann man die Reinheit der DNA bestimmen. Vor der Messung wird als Referenz die Extinktion von 99 μ l dH₂O bei 260nm bestimmt und dieser Wert als Nullwert gesetzt. Nach Zugabe von 1 μ l DNA wird die Messung erneut durchgeführt und eine Extinktion von 1 entspricht einer DNA Konzentration von 50 μ g/ml. Nach Einbeziehung des Verdünnungsfaktors ergibt sich so die tatsächliche Konzentration der DNA in μ g/ml.

2.2.5 Sequenzierungen von Nukleinsäuren

Sequenzierungen von Nukleinsäuren werden durch den Sequenzier-Service der AG Pieler, Ernst-Caspari-Haus, Göttingen, durchgeführt. Vorher muss jedoch eine Sequenzierreaktion mit anschließender Aufreinigung der DNA erfolgen. Für die Sequenzierreaktion werden 300ng Plasmid-DNA mit 8pmol des jeweiligen Sequenzierprimers, 1,5 μ l Seq-Puffer und 1,5 μ l Seq-Mix (Big Dye Terminator v1.1 Kit, *Applied Biosystems*, Darmstadt) versehen und mit dH₂O auf 10 μ l aufgefüllt. Dem schließt sich die Sequenzierreaktion wie folgt an:

Tabelle 2.1: Programm der Sequenzierreaktion

Schritt	Dauer	Temperatur
1	2 min	96°C
2	20 sek	96°C
3	30 sek	55°C
4	4 min	60°C
5	gehe 26 Mal zu Schritt 2	
6	∞	12°C

Für die anschließende Aufreinigung wird der gesamte Reaktionsmix in ein 1,5ml Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zugabe von 1 μ l 125mM EDTA, 1 μ l 3M NaAc pH 5.3 und 50 μ l 100% Ethanol folgt eine Inkubation für 5min bei RT. Nach 15 minütiger

Zentrifugation bei 14000rpm wird der Überstand verworfen und 70µl 70%iger Ethanol hinzugefügt. Nach erneuter Zentrifugation von 5min bei 14000rpm wird der Überstand verworfen und das Pellet luftgetrocknet. Das DNA-Pellet wird in 15µl HiDi (HI-DI Formamide, *Applied Biosystems*, Darmstadt) gelöst, die Probe dem Sequenzier-Service übergeben und bis zur Behandlung bei -20°C eingefroren.

2.2.6 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Chemisch kompetente *E. coli* Zellen werden auf Eis aufgetaut und dann wie folgt transformiert. Zu ca. 100ng Plasmid-DNA werden 50µl Zellen hinzugegeben und 30min auf Eis inkubiert. Anschließend wird der Ansatz für 30sek bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen. Die Zellen werden danach kurz wieder auf Eis gestellt, dann in 500µl SOC-Medium resuspendiert und 1h bei 37°C und 180rpm inkubiert. Von diesem Ansatz werden 200µl auf einer LB-Agar-Platte mit dem benötigten Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

SOC-Medium: 2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 20mM Glukose
LB-Medium: 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1%NaCl
LB-Agar: LB-Medium, 1% Agar-Agar, 100µg/ml Ampicillin oder 50µg/ml Kanamycin

2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wird benutzt, um mit einer hitzebeständigen DNA-Polymerase spezifisch DNA Abschnitte zwischen zwei Oligonukleotid-Primern zu amplifizieren. Die Vervielfältigung der DNA verläuft dabei in mehreren Schritten. Zuerst wird die doppelsträngige DNA bei 95°C denaturiert, damit sich die Primer an die einzelsträngigen, komplementären DNA-Abschnitte anlagern können (*Annealing*). Die Annealing-Temperatur kann abhängig von den Primern zwischen 50 und 70°C liegen. Im nächsten Schritt bindet die DNA-Polymerase bei 72°C mit den Primern und verlängert diese, indem sie dNTPs an die 3'OH Enden der Primer anfügt (*Elongation*). Die Zeit für die Elongation hängt hierbei von der Größe des zu vervielfältigenden DNA-Abschnitts ab. Diese drei

Phasen der PCR werden zyklisch wiederholt, so dass die amplifizierten Fragmente am Ende in großer Molekülanzahl vorliegen. In dieser Arbeit wurde die Taq-Polymerase der Firma *Genecraft*, Köln (isoliert aus *Thermus aquaticus*) und die Pfu-Polymerase (isoliert aus *Pyrococcus furiosus*) von der Firma *Bioline*, Luckenwalde verwendet. Der Unterschied der beiden Polymerasen spiegelt sich in der Korrekturaktivität der Pfu-Polymerase wider. Die Pfu-Polymerase kann durch ihre 3'-5'-Exonuklease-Aktivität falsch eingebaute Nukleotide wieder entfernen und dann durch die korrekten Nukleotide ersetzen. Die Taq-Polymerase, welche keine Korrekturaktivität besitzt, amplifiziert DNA-Fragmente zwar besonders schnell, kann jedoch keine Fehler korrigieren. Die Eigenschaft des „Korrektur-Lesens“ ist gerade für Klonierungen unerlässlich, da fehlerhaft eingebaute Nukleotide zu Mutationen oder zu einer Verschiebung des Leserasters führen können.

Tabelle 2.2: PCR-Programm

Schritt	Dauer	Temperatur
1 Denaturierung	2 min	95°C
2 Denaturierung	30 sek	95°C
3 Annealing	30 sek	50-70°C
4 Elongation	30-60 sek pro kB (Taq) 1,5 min pro kB (Pfu)	72°C
5	wiederhole 30 mal Schritt 2-4	
6 finale Elongation	5 min	72°C
7	∞	4°C

Tabelle 2.3: Ansatz für eine Standard PCR

Reagenz	Menge
DNA	x µl
vorwärts Primer 50µM	0,5 µl
rückwärts Primer 50µM	0,5 µl
dNTP-Mix 10mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	1 µl
10x Polymerase Puffer	5µl
DNA-Polymerase (Taq bzw. Pfu)	1µl
auf 50µl mit dH ₂ O auffüllen	Σ 50µl

2.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente nach einer PCR oder einem Restriktionsverdau zu analysieren wird die Agarose-Gelelektrophorese benutzt. DNA ist durch das Phosphatrückgrat insgesamt negativ geladen und wandert daher in einem elektrischen Feld zur Anode. Die Auftrennung findet in einer Agarose-Matrix statt, welche wie ein Sieb wirkt. Kleinere Moleküle wandern schneller durch diese Matrix als große. In der Regel wird eine 1%ige Agaroselösung in 1xTAE-Puffer angesetzt um Bereiche von 200 bis 10000 Basenpaare aufzutrennen. Durch Erhitzen in der Mikrowelle wird die Agaroselösung flüssig. Nachdem dem Gemisch 1µl/ml einer 1% Ethidiumbromidlösung zugegeben wurde, lässt man das Agarosegel bei RT abkühlen bis das Gel erstarrt. Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basenpaaren der DNA und durch eine Anregung mit UV-Licht ($\lambda=312\text{nm}$) fluoresziert es und macht somit die DNA sichtbar. Vor dem Auftragen der DNA auf das Gel wird den Proben noch Probenpuffer zugegeben. Das im Probenpuffer enthaltene Glycerin lässt die Probe in der Tasche absinken und Bromphenolblau markiert die Probe, so dass verfolgt werden kann, wie weit die DNA im Gel gelaufen ist. Die Auftrennung der DNA erfolgt in der Regel für 30min bei 110V.

TAE-Puffer (50x): 2M Tris base, 0,5M EDTA

Probenpuffer: 0,09% Bromphenolblau, 60% Glycerin, 60mM EDTA

2.2.9 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

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

2.2.10 DNA-Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen bakteriellen Ursprungs, die Phosphodiesterbindungen beider Stränge eines DNA-Moleküls spalten. Ursprünglich dienen sie dem Organismus dazu, Fremd-DNA zu zerkleinern und diese dadurch zu

inaktivieren. Es sind bereits eine Vielzahl von Restriktionsenzymen bekannt, wobei jedes Enzym kurze DNA-Sequenzen spezifisch erkennt. Die Spaltung erfolgt einmal unter der Erzeugung eines 5' Überhanges von Nukleotiden und eines 3' Überhanges. Diese Gruppe von Restriktionsenzymen bildet „klebrige Enden“ an der DNA. Andere Enzyme spalten die DNA ohne Überhänge zu produzieren und erzeugen so „glatte Enden“.

Ein Ansatz für einen Standard Restriktionsverdau setzt sich wie folgt zusammen:

DNA (konz. abhängig)	x μ l
10x Puffer	1 μ l
Enzym	0,4 μ l
auf 10 μ l mit dH ₂ O auffüllen	x μ l

Der Ansatz wird für 1h bei 37°C inkubiert und danach mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.2.8) kontrolliert.

2.2.11 Ligation von linearisierter DNA

Nach der Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen können diese linearisierten DNA-Fragmente wieder verknüpft werden. Hier wird das 3'-Hydroxy-Ende und das 5'-Phosphat-Ende der DNA mit Hilfe der T4-DNA-Ligase über Phosphodiesterbindungen miteinander verbunden. Dieses findet bei der Herstellung von Deletionskonstrukten von *rngO* Anwendung (Kapitel 2.2.14). Der Ligationsansatz wird bei 16°C im Wasserbad über Nacht inkubiert und es schließt sich eine Transformation in chemisch kompetente Zellen an (Kapitel 2.2.6).

Ligationsansatz:

T4-DNA-Ligase	1 μ l
10x Ligationspuffer	1 μ l
DNA	x μ l
auf 10 μ l mit dH ₂ O auffüllen	x μ l

2.2.12 Gateway pENTR/D-TOPO Klonierung

Durch das Gateway System (*Invitrogen*, Groningen, NL) ist es möglich, ein spezifisches Gen vom pENTR-Vektor einfach in viele verschiedenen Destinationsvektoren zu klonieren. Dadurch hat man die Auswahl zwischen mehreren Promotoren sowie N-terminalen und C-terminalen Tags. Im Vergleich zum Klonieren mit Restriktionsenzymen und Ligasen beruht das Gateway System auf sequenzspezifischer Rekombination, die durch Enzyme des Phagen λ katalysiert wird.

2.2.12.1 TOPO Klonierung in den pENTR-Vektor

rngo wurde mit den Primern *vsm1-N-for* und *vsm1-N-rev* (ohne Start-Codon für N-terminale Tags) oder *vsm1-C-for* und *vsm1-C-rev* (ohne Stop-Codon für C-terminale Tags) amplifiziert. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde in den pENTR-Vektor mit Hilfe des pENTR/D-TOPO Kits, *Invitrogen*, Groningen, NL nach Angaben des Herstellers kloniert. Während der Klonierungsreaktion schneidet die Topoisomerase I den Ausgangsvektor und lässt dabei einen 5' Überhang entstehen, der komplementär zur CACC-Sequenz am 5' Ende des vorwärts gerichteten Primers ist. Dies dient dazu, dass das Gen in der richtigen Orientierung in den pENTR-Vektor eingefügt wird. Von dieser Klonierreaktion wird 1 μ l für die Transformation in chemisch kompetente Zellen (Kapitel 2.2.6) eingesetzt.

2.2.12.2 Gateway LR Rekombination in Destinationsvektoren

Um C-terminal und N-terminal markierte Fusionsproteine von *rngo* herzustellen, welche unter der Kontrolle von verschiedenen Promotoren stehen, wird *rngo* durch die LR Rekombination vom pENTR-Vektor in verschiedene Destinationsvektoren kloniert. Bei dieser Rekombination erkennen die Enzyme des Phagen λ die *attL1* und *attL2* Sequenzen des pENTR-Vektors und schneiden diesen Bereich aus dem Plasmid aus. Dieser DNA-Abschnitt wird in dem jeweiligen Destinationsvektor zwischen die *attR1* und *attR2* Sequenzen inseriert. Durch die Unterschiede der *attL1* und *attL2* bzw.

attR1 und *attR2* Sequenzen wird das Insert immer in der richtigen Orientierung eingefügt. Im selben Schritt wird das *ccdB* Gen vom Destinationsvektor zurück in den pENTR-Vektor transferiert, welches für ein toxisches Protein kodiert (siehe Abbildung 2.1). Nun werden die richtigen Expressionsvektoren durch eine Ampicillin-Resistenz selektiert.

LR-Rekombination Reaktionsansatz:

Ausgangsvektor (100-300ng)	1 μ l
Zielvektor (150ng)	0,5 μ l
TE-Puffer pH 8.0	0,75 μ l
Clonase Reaktions Mix	0,25 μ l

Anschließend erfolgt eine Transformation wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben.

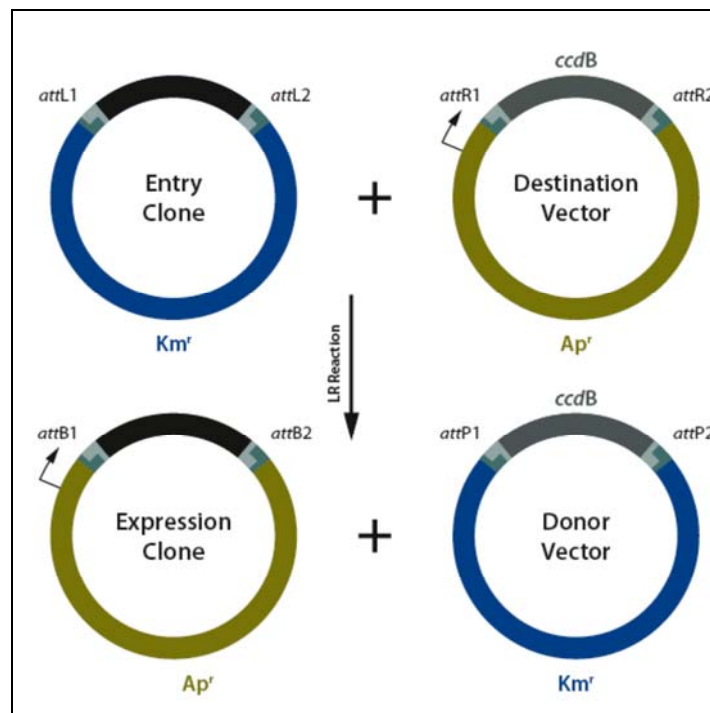


Abbildung 2.1: **Schematische Darstellung des Gateway LR Rekombinations-Systems.** Durch die sequenzspezifische Rekombination wird ein Zielgen (■=Zielgen) vom pENTR-Vektor, mit Beibehaltung des offenen Leserasters (*open reading frame*, ORF), in einen Destinationsvektor kloniert. Als Nebenprodukt erhält man das *ccdB*-Gen dessen Produkt jedoch toxisch ist und so ein Wachstum von leeren Destinationsvektoren auf LB_{amp}-Platten verhindert (Bild verändert nach *Invitrogen*).

2.2.13 Erzeugung von Punktmutationen in *rngo*

Die Erzeugung von Punktmutationen in *rngo* erfolgt durch das QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma *Stratagene*, LaJolla, USA. Diese Punktmutationen können zu einem Aminosäureaustausch auf Proteinebene führen und so die Funktion des Proteins beeinflussen. Durch eine PCR mit Primern, die die Mutation tragen wird der Ursprungsvektor und so auch die spätere Proteinexpression verändert. Das Template für die PCR ist *rngo* im pENTR-Vektor, welches die gesamte unveränderte cDNA enthält. Die PCR erfolgte mit den Primern RVPD257mutzuAfor und RVPD257mutzuArev (siehe Kapitel 2.1.4) nach folgendem Protokoll:

Tabelle 2.4: PCR Programm für Mutagenese-PCR

Schritt	Dauer	Temperatur
1 Denaturierung	30 sek	95°C
2 Denaturierung	30 sek	95°C
3 Annealing	30 sek	55°C
4 Elongation	90 sek	68°C
5	wiederhole 12 mal Schritt 2-4	
6 finale Elongation	5 min	72°C
7	∞	4°C

Um die noch vorhandene Ursprungs-DNA abzubauen, wird dem PCR-Ansatz 1µl DpnI zugegeben, welches die methylierte Template-DNA zerstört, und der Ansatz für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgt eine Transformation wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben.

2.2.14 Erzeugung von Deletionskonstrukten von *rngo*

Um eine Funktionsanalyse der vorhergesagten Proteindomänen von Rngo durchzuführen werden Deletionskonstrukte dieser Domänen hergestellt. Für Deletionen einzelner Domänen werden jeweils zwei EcoRI-Schnittstellen mittels Punktmutationen (Kapitel 2.2.13, Primer siehe Kapitel 2.1.4) in den gewünschten DNA-Abschnitt eingefügt und dieser Bereich dann mit EcoRI herausgeschnitten (siehe Kapitel 2.2.10). Anschließend wird der so linearisierte Vektor mit der T4-DNA-Ligase

wieder zirkularisiert, so dass das Protein nun ohne den herausgeschnittenen Abschnitt exprimiert werden kann. Für die Herstellung der Doppeldeletion wird analog verfahren, nur wird hier als Template die DNA verwendet, aus der schon eine Domäne deletiert wurde. Diese Konstrukte können nun weiter in die entsprechenden Destinationvektoren kloniert werden (Kapitel 2.2.12.2).

2.2.15 Zellkultur

Drosophila Schneider 2 Zellen (S2-Zellen) wurden aus embryonalem Gewebe gewonnen und werden für Arbeiten im Zellkultur System verwendet. S2-Zellen werden in S2-Medium bei 25°C gehalten. Mit Hilfe des FuGENE® HD Transfection Kit der Firma Roche Diagnostics, Mannheim, werden diese Zellen transient transfiziert. Hierfür werden 1Mio Zellen in 2ml S2-Medium in einer 6-well-Platte vorgelegt. Die Zellzahl wird mit einer Neubauer Zellzählkammer ermittelt. 2µg DNA werden mit 100µl sterilem dH₂O verdünnt und 4µl der FuGENE® HD Transfektions-Reagenz hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 15min wird der gesamte Reaktionsansatz zu den vorgelegten S2-Zellen gegeben und durch vorsichtiges Schütteln gleichmäßig verteilt. Falls DNA verwendet wird, die unter anderem für ein fluoreszierendes Tag kodiert, kann nach 24h mit einem Fluoreszenz-Mikroskop die Transfektion überprüft werden. Zur Gewinnung von großen Proteinmengen werden die transfizierten S2-Zellen nach 48h von der 6-well-Platte in eine Flasche mit einer Grundfläche von 25cm² überführt und mit 5ml frischem S2-Medium versehen. Die Zellernte und Herstellung von Proteinextrakten wird in Kapitel 2.3.1 beschrieben.

S2-Medium: Schneider's *Drosophila* Medium (Gibco), 10% FBS, 50U/ml Penicillin, 50µg/ml Streptomycin

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Herstellung von Proteinextrakten

Embryonen oder Larven werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren, mit Lysispuffer und Proteinaseinhibitoren versehen und auf Eis homogenisiert. S2-Zellen werden geerntet, für 5min bei 1000rpm zentrifugiert und 3x mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend werden auch die S2-Zellen mit Lysispuffer und Proteinaseinhibitoren versehen und 30min auf Eis inkubiert. Das Homogenisat der einzelnen Gewebe wird dann für 15min bei 4°C und 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand wird in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und der Proteingehalt gemessen. Für die Messung der Proteinkonzentration werden in einer 1ml Küvette 800µl dH₂O, 200µl RotiQant, der Firma *Carl Roth*, Karlsruhe und 2µl des Proteinextraktes gemischt und im Photometer bei OD₆₀₀ gemessen. Hierbei entspricht ein Wert OD₆₀₀=1 einem Gesamtprotein von 1mg/ml.

Lysispuffer:	150mM NaCl, 50mM Tris pH 8.0, 1% Triton X-100
Proteinaseinhibitoren:	je 2µg Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin, Pefabloc
PBS:	8g NaCl, 0,2g KCl, 1,44g Na ₂ HPO ₄ , 0,24g KH ₂ PO ₄ in 1l dH ₂ O auflösen und auf pH7.5 einstellen

2.3.2 Koimmunpräzipitation (Ko-IP)

Mit der Koimmunpräzipitation wird untersucht, ob Proteine einen Komplex bilden. Hierfür werden die hergestellten Proteinextrakte (Kapitel 2.3.1) auf einen Gesamtproteingehalt von 1mg verdünnt. Um eine unspezifische Bindung der Proteine zu verhindern, werden die Proteinextrakte mit 15µl Protein A/G Agarose Beads (*Roche Diagnostics*) für 2h bei 4°C präinkubiert. Nach einer Zentrifugation für 1min bei 13000rpm wird der Überstand in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 2h bei 4°C mit 20µl Protein A/G Agarose Beads und 2µl des spezifischen Antikörpers, durch den man ein Protein im Komplex nachweisen möchte, bei leichtem Schütteln inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wird entweder das Präimmenserum oder

ein unspezifischer Antikörper, der im selben Organismus generiert wurde, verwendet. Protein A und Protein G sind bakterielle Zellwandproteine, die spezifische Bindestellen für Immunglobuline verschiedener Spezies aufweisen. Nach der 2 stündigen Inkubation wird der Ansatz für 1min bei 13000rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Protein A/G Agarose Beads, an die nun die nachzuweisenden Proteine gekoppelt sind, werden 5x mit kaltem Lysispuffer gewaschen und in 20µl 2xSDS-Ladepuffer bei 95°C aufgeköcht, um die Proteine wieder von den Beads zu lösen. Anschließend wird der Ansatz wieder 1min bei 13000rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels Western-Blot (Kapitel 2.3.3) analysiert.

2.3.3 SDS-PAGE und Western-Blot

Die Auftrennung von Proteinen erfolgt durch die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE). Als Equipment dient hier das Mini-Protean 3 der Firma *Biorad*, München und wird nach Angaben des Herstellers verwendet. Die, wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben, hergestellten Proteinextrakte werden mit SDS-Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Durch das im SDS-Ladepuffer enthaltene SDS und β -Mercaptoethanol werden die Wasserstoff- und Disulfidbrücken gespalten und so die Proteine beim Aufkochen für 10min bei 95°C denaturiert. Je nach Größe der zu untersuchenden Proteine werden verschieden prozentige Gele gegossen und für 1h bei 200V in 1x SDS-Laufpuffer laufen gelassen. Hierbei bestimmt das Verhältnis von Acrylamid/Bisacrylamid zu dH₂O die Porengröße des Gels und somit den Bereich, in dem die Proteine aufgetrennt werden.

Der anschließende Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran der Firma *Whatman*, Dassel erfolgt mit dem Mini Trans-Blot (*Biorad*, München) nach Angaben des Herstellers. Im Anschluss wird der Transfer mit einer Ponceau S-Färbung kontrolliert und dann für 1h in Blockierlösung gegen unspezifische Bindungsstellen der Antikörper geblockt. Der erste Antikörper wird verdünnt in Blockierlösung für 1-2h bei RT oder bei 4°C über Nacht auf die Membran gegeben. Es folgt 3 maliges Waschen der Membran mit TBST für 5min bei RT. Anschließend wird der zweite Antikörper verdünnt in Blockierlösung auf die Membran gegeben und 2h bei RT

inkubiert. Nach weiteren drei Waschsritten erfolgt die Detektion durch die Chemilumineszenz-Lösung der Firma *Roche Diagnostics*, Mannheim.

10x SDS-Laufpuffer: 1,92M Glycin, 25mM Tris, 1% SDS

2x SDS-Ladepuffer: 10mM Tris pH 6.8, 4% Sodiumdodecylsulfat (SDS), 0,2% Bromphenolblau, 20% Glycerin, 200mM β -Mercaptoethanol

10% SDS-Gel: Trenngel: 2,1ml dH₂O, 2,8ml 1M Tris pH 8.8, 2,5ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 38 μ l 20% SDS, 30 μ l 30% APS, 8 μ l TEMED

Sammelgel: 1,3ml dH₂O, 235 μ l 1M Tris pH 6.8, 310 μ l 30% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 10 μ l SDS, 10 μ l APS, 5 μ l TEMED

Transferpuffer: 25mM Tris, 192mM Glycin, 20% Methanol

TBST: 20mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl, 0,2% Tween-20

Blockierlösung: 3% Milchpulver, 1% BSA in TBST

2.3.4 GFP-Trap[®] für die Analyse von Interaktionspartnern von Rngo mittels Massenspektrometrie

Für die Analyse von Interaktionspartnern von Rngo wurden transgene Fliegen hergestellt (Kapitel 2.5.5), die ein Rngo-Fusionsprotein exprimieren, welches ein GFP-Tag am C- oder N-Terminus trägt. Ausgehend von diesen Fliegenstämmen werden Proteinextrakte aus Ovarien, Embryonen und L3-Larven nach dem Protokoll aus Kapitel 2.3.1 angefertigt. Diese Proteinextrakte werden auf einen Gesamtproteingehalt von 1mg verdünnt und dann nach Angaben des Herstellers (*Chromotek*) weiter behandelt. Als Negativ-Kontrolle dienen w⁻-Fliegen. Anschließend werden die Proben im Labor von Dr. Olaf Jahn (Proteomics Group, Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen) massenspektrometrisch untersucht.

2.3.5 Herstellung von GST/MBP-Fusionsproteinen

Die cDNA eines beliebigen Gens wird *in frame* in bakterielle Expressionsvektoren kloniert. Diese Vektoren (Kapitel 2.1.3) können verschiedene Affinitäts-Tags wie z.B. Glutathion-S-Transferase (GST) oder das Maltose-Bindeprotein (MBP) tragen. Diese Expressionsvektoren werden in chemisch kompetente BL21 Zellen transformiert. Nach der Transformation wird eine Bakterien-Kolonie mit einer Pipettenspitze gepickt und eine 20ml LB_{amp}-Vorkultur angeimpft und diese über Nacht bei 37°C und 180rpm inkubiert. Diese Vorkultur wird in 200ml LB_{amp} auf eine OD₆₀₀ von 0,2 verdünnt und bei 37°C und 180rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-1 wachsen gelassen. Nun werden 400µl 0,5M IPTG hinzugefügt und die Bakterienkultur für 3h bei 30°C und 180rpm inkubiert. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation bei 5000rpm für 10min und der Überstand wird verworfen. Das Bakterienpellet wird für 30min bei -80°C weggefroren. Nach dem Auftauen wird das Pellets in 10ml Lysispuffer resuspendiert und dann 30min bei RT im Überkopftaumler inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation für 15min bei 10000rpm. Der Überstand enthält die exprimierten Proteine und wird weiter für die Aufreinigung verwendet. Zu den 10ml Überstand werden 500µl Glutathion Sepharose 4B Beads gegeben und 30min im Überkopftaumler bei RT geschüttelt. Die Probe wird für 15min bei 4°C und 10000rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Glutathion Sepharose 4B Beads mit dem gebundenen Fusionsprotein 3x mit kaltem PBS gewaschen. Für die Elution des Fusionsproteins von den Glutathion Sepharose 4B Beads wird 400µl Elutionspuffer zu den Beads gegeben und für 10min bei leichtem Schütteln inkubiert. Es schließt sich eine Zentrifugation für 1 min bei 5000rpm und 4°C an. Der Überstand enthält das eluierte Fusionsprotein und wird in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Dieser Schritt wird noch zwei Mal wiederholt und die Proben aus allen drei Elutionen werden vereint. Die Effizienz der Expression und der Reinheitsgrad der Probe werden mittels einer SDS-PAGE und anschließender Coomassie blue-Färbung analysiert.

Lysispuffer:	10ml PBS, 1% Triton X-100, Proteinaseinhibitoren (je 2µg Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin, Pefabloc)
Elutionspuffer GST:	20mM reduziertes Glutathion in PBS
Elutionspuffer MBP:	10mM Maltose in PBS

2.3.6 GST-Pulldown

Der GST-Pulldown ist eine *in vitro* Methode um physikalische Interaktionen zwischen zwei Proteinen zu untersuchen. Hierfür wird das GST-Fusionsprotein mit dem MBP-Fusionsprotein in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 500µl GST-Pulldownpuffer vermischt. Anschließend werden 20µl Glutathion-Sepharose-Beads zu dem Ansatz hinzupipettiert und die Probe 2h bei 4°C auf dem Taumler inkubiert. Als Negativ-Kontrolle dient aufgereinigtes GST welches zusammen mit dem MBP-Fusionsprotein und ebenfalls 20µl Glutathion-Sepharose-Beads für 2h bei 4°C inkubiert wird. Nach einer Zentrifugation von 1min bei 10000rpm wird der Überstand verworfen und die Glutathion-Sepharose-Beads 5x mit GST-Pulldownpuffer gewaschen. Die Elution der Proteine von den Beads erfolgt nach Zugabe von 20µl 2xSDS-Ladepuffer und Aufkochen für 10min bei 96°C. Eine erneute Zentrifugation für 1min bei 10000rpm pelletiert die Beads, so dass die sich im Überstand befindlichen Proteine mit der SDS-PAGE und Western-Blot (Kapitel 2.3.3) weiter analysiert werden können.

GST-Pulldownpuffer: 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,5% Triton X-100, Proteinaseinhibitoren (je 2µg Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin, Pefabloc)

2.3.7 Protease Aktivitätsassay

Um eine potentielle Proteaseaktivität von Rngo zu messen, wird das Protease Fluorescent Detection Kit, *Sigma* verwendet. Eine Proteaseaktivität resultiert in der Spaltung von FITC-markiertem Casein als Substrat, wobei kleinere, gespaltene Fragmente unter sauren Bedingungen nicht präzipitieren. Nach einer Inkubation mit der Protease (hier MBP-Rngo, MBP-ΔRVP, MBP-D257A und als Positiv-Kontrolle Trypsin) und des Substrats wird der Ansatz durch die Zugabe von Trichloressigsäure (TCA) in einen sauren pH verschoben. Anschließend wird die Probe zentrifugiert und das unverdaute Substrat bildet ein Pellet. Im Überstand befinden sich die gespaltenen, FITC-markierten Casein Fragmente, welche mit einem Fluorimeter gemessen werden können und so eine Aussage über die Aktivität der Protease geben. Das Kit wird nach Angaben des Herstellers verwendet und die Fluoreszenz mit dem Fluorimeter Twinkle LB970 (*Berthold Technologies*, Oak Ridge, USA) gemessen.

2.4 Histologische Methoden

2.4.1 Antikörperfärbungen an Ovarien

Die Ovarien werden in kaltem PBS präpariert und mit einer NHS abgesättigten 1000µl Spitze durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die vereinzelt Ovarien werden für 20min in 4% Formaldehyd fixiert und anschließend 3x 20min mit PBT gewaschen. Die Ovarien werden für 3h bei RT oder bei 4°C über Nacht in 5% NHS in 0,5% PBTX geblockt. Nach dem Blocken schließt sich die Inkubation mit dem ersten Antikörper für 2h bei RT oder 4°C über Nacht an. Nach 3maligem Waschen für 20min mit PBT erfolgt die Inkubation mit dem zweiten Antikörper für 2h bei RT. Falls bei der Färbung F-Actin nachgewiesen werden soll, werden 5µl Rhodamin-Phalloidin, *Molecular Probes*, in einer Vakuumzentrifuge eingedampft und in 500µl Blockierlösung resuspendiert, welche für die Inkubation mit dem sekundären Antikörper verwendet wird. Anschließend werden die Ovarien 3x mit PBT gewaschen und in Mowiol/DABCO eingedeckelt.

PBT: 1x PBS, 0,1% Tween 20

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

Mowiol: 5g Mowiol/Elvanol mit 20ml PBS 16h bei RT mischen, 10ml Glycerin zufügen und nochmals 16h bei RT mischen, bei 4000rpm 10min zentrifugieren und aliquotieren

DABCO: 1,4-Diazabicyclo(2.2.2)Octane

4% Formaldehyd-Lösung: 110µl 37% Formaldehyd, 890µl PBS

2.4.2 DNA-Fluoreszenz-Markierung

DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindole) ist ein DNA-Marker, der in kurzer Zeit bevorzugt an doppelsträngige DNA bindet, leicht durch die Zellmembran diffundiert und so auch gut für die Färbung in lebenden Zellen verwendet werden kann. Sein Emissionsmaximum liegt im kurzwelligen Bereich (460nm) weshalb kaum Überlagerungen mit anderen Fluoreszenzfarbstoffen auftreten, die ihr Emissionsmaximum im längerwelligen Bereich haben. Die DNA-Markierung mit

DAPI erfolgt bei Färbungen mit dem ersten Waschschrift nach der Inkubation mit dem zweiten Antikörper.

2.4.3 TUNEL-Färbung

Um Apoptose in Ovarien nachzuweisen, wird das In Situ Cell Death Detection Kit TUNEL, *Roche Diagnostics*, Mannheim nach Angaben des Herstellers verwendet. Beim programmierten Zelltod findet eine Fragmentierung der DNA durch Endonukleasen statt. Diese spalten die höher geordnete Chromatinstruktur in 50 bis 300kb Fragmente, welche dann anschließend weiter in ca. 200bp große Stücke zerkleinert werden. In einem TUNEL- Experiment (TdT-mediated dUTP nick end labeling) katalysiert TdT (terminale Desoxynukleotidyl-Transferase) die Anheftung von fluoreszierenden dUTP an das 3'OH-Ende von doppelsträngiger und einzelsträngiger DNA. Anschließend ist es möglich, mit einem Fluoreszenzmikroskop die Zellen zu detektieren, in denen Apoptose stattgefunden hat.

2.5 Genetische Methoden

2.5.1 Fliegenzucht

Die Fliegen werden auf einem Standardmedium (Ashburner, 1989) bei 18°C, RT und 25°C gehalten. Eiablagen werden auf Apfelsaft-Agarplatten angesetzt und zur Stimulation der Eiablage mit ein wenig Hefe bestrichen.

Standardmedium:	356g Maisschrot, 47,5g Sojamehl, 84g Trockenhefe, 225g Malzextrakt, 75ml 10% Nipagin, 22,5ml Propionsäure, 28g Agar, 200g Zuckerrübensirup und mit 4,9l dH ₂ O auffüllen
Apfelsaft-Agarplatte:	40g Agar und 340ml Apfelsaft (100%) mit dH ₂ O auf 1l auffüllen, aufkochen, nach Abkühlen auf 60°C mit 30ml 10% Nipagin versetzen und auf Platten gießen

2.5.2 Fliegenstämme

Im Folgenden sind alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Fliegenstämme aufgelistet.

Bezeichnung	Genotyp	Beschreibung	Referenz
Wildtyp	Wildtyp	Oregon R, rote Augen	Stammsammlung A. Wodarz
GE3956	P{w[+mC]=EP}EP[GE395] w[1118]/FM6	hemizygot letales Allel von <i>rngo</i>	Genexel alte Nr.: GE3956 neue Nr.: G17397
FM7c blue	y ¹ arm ⁴ w*/FM7c, P{ftz/lacC} YH1	trägt FM7c Balancer auf dem 1. Chromosom	Bloomington #616
GE3956/FM7c blue	P{w[+mC]=EP}EP[GE395] w[1118]/FM7c[ftz::LacZ]	hemizygot letales Allel von <i>rngo</i>	generiert aus GE3956 und #616
w, FRT9-2	w[*] f[1] P{w[+mW.hs]=FRT(w[hs])}9-2	trägt FRT9-2 Sequenzen	Bloomington #5749
GE3956, FRT9-2 4	P{w[+mC]=EP}EP[GE395] w[1118],P{w[+mW.hs]=FRT(w[hs])}9-2 /FM7c	hemizygot letales Allel von <i>rngo</i> rekombiniert mit FRT9-2	generiert aus GE3956 und #5749

w; Gla/Cyo, P{ftz::lacC}	w; Gla/Cyo, P{ftz::lacC}	trägt Glaced Marker über einem CyO- Balancer	Stammsammlung A. Wodarz
FM7 {twi::GFP}	FM7 {twi::GFP}	trägt FM7 Balancer, welcher GFP im Muster des <i>twist</i> -Gens exprimiert	Benni Shilo, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel
hsFLP	ovo[D2] v[24] P{FRT(w[hs])}9- 2/C(1)DX, y[1] f[1]/Y; P{hsFLP}38	trägt hsFLP auf dem 2. Chromosom	Bloomington #1843
P[w ⁺ FRT9-2]GFP	y[1]w[1118];P{Ubi- GFP.nls}X1 P{FRT(w[hs])}9-2; Kr[If-1]/CyO	trägt Ubi-GFP und FRT9-2 auf dem 1. Chromosom	Bloomington # 5832
GFP FRT9-2; hsFLP38	y[1]w[1118];P{Ubi- GFP.nls}X1 P{FRT(w[hs])}9-2; P{hsFLP}38	trägt Ubi-GFP und FRT9-2 auf dem 1. Chromosom, hsFLP auf dem 2. Chromosom	generiert aus #5832 und #1842
<i>daughterless</i> Gal4	w[*]; P{w[+mW.hs]=GAL4- da.G32}UH1	treibt Gal4 Expression im Muster des <i>daughterless</i> Gens; auf dem 3. Chromosom	Bloomington #5460
TM3/TM6	w* ¹ ; TM3, Sb ¹ Ser ¹ /TM6B, Tb ¹	trägt TM3 und TM6 Balancer auf dem 3. Chromosom	Bloomington #2537
w	w[1118]	weiße Augen	Bloomington #5905

2.5.3 Das UAS-GAL4-System

Durch das entwickelte UAS-GAL4-System ist es möglich, die Genexpression zeitlich und räumlich zu beeinflussen (Brand und Perrimon, 1993). Hierbei exprimiert ein als Aktivator bezeichneter Fliegenstamm (siehe Abbildung 2.2) den Hefe-Transkriptionsfaktor GAL4, welcher normalerweise nicht in der Fliege vorkommt. In einem zweiten Fliegenstamm, dem Effektor, steht ein zu untersuchendes Zielgen unter

der Kontrolle von sogenannten UAS-Sequenzen (*upstream activating sequences*). Diese UAS-Sequenzen besitzen Bindungsstellen für GAL4. Durch die Kreuzung von Aktivator und Effektor gelangen beide Komponenten des Systems in eine Fliege und führen so zur UAS-GAL4 vermittelten Expression des Zielgens unter der Kontrolle des Enhancers.

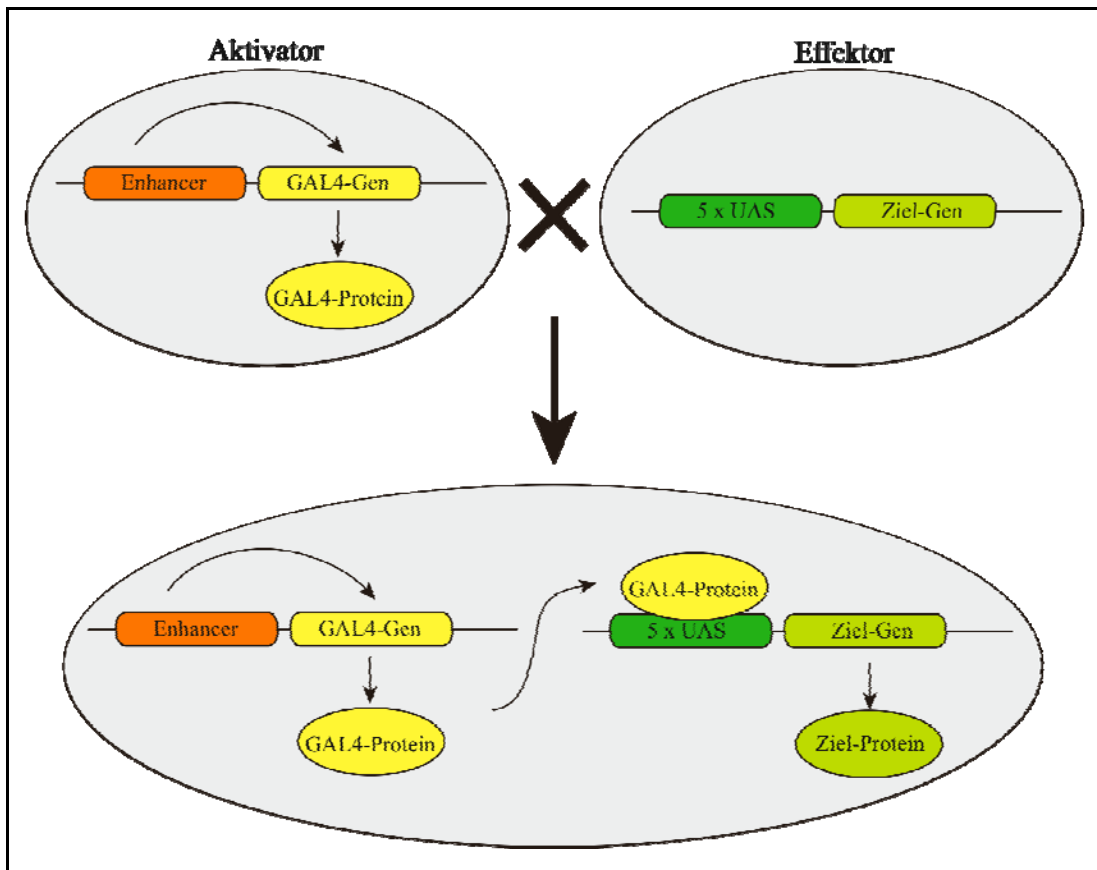


Abbildung 2.2: **Schematische Darstellung des UAS-GAL4-Systems.** Das System wird benutzt, um ein bestimmtes Gen (bzw. Zielprotein) zeit- und gewebespezifisch zu exprimieren. Hierfür wird ein Aktivatorstamm mit einem Effektorstamm verkreuzt und dadurch in der nächsten Generation die Expression des Zielproteins durch den Transkriptionsfaktor GAL4 gesteuert.

2.5.4 Kreuzungen zur Rettung der Letalität von *rngo*-mutanten Fliegen mittels des UAS-GAL4-Systems

Das mutante Allel von *rngo* ist pupal letal. Man kann, wenn die Embryonen vorsortiert werden, einen sehr geringen Prozentsatz an Escaper-Fliegen bekommen, die aber nicht fertil sind und nach kurzer Zeit sterben. Um zu überprüfen, ob die Letalität wirklich

nur auf das mutante Allel von *rngo* zurückzuführen ist, werden Rettungskreuzungen mit Fliegen durchgeführt, die ein über das UAS-GAL4-System exprimiertes Transgen tragen. Bei diesen Transgenen handelt es sich um das wildtypische Vollängen-Gen, welches ein C-terminales oder N-terminales GFP-Tag trägt. Dadurch kann zeitgleich die Funktionalität der Transgene getestet werden. Hierzu werden Kreuzungen von Jungfrauen angesetzt, die das mutante Allel von *rngo* (GE3956) über dem FM7c-Balancer tragen. Zu diesen Weibchen werden Männchen gesetzt, die auf dem dritten Chromosom das UAS-Konstrukt tragen. Dieses Konstrukt wurde mit einem GAL4-Treiber (hier *daughterless*-GAL4) rekombiniert und über TM3 balanciert.

2.5.5 Keimbahntransformation von *Drosophila melanogaster*

Durch die Keimbahntransformation können auf einfache Weise transgene Fliegen erzeugt werden. Hierbei wird der Gentransfer durch transponierbare Elemente, die sogenannten P-Elemente, erreicht. Diese benötigen flankierende Erkennungssequenzen (*inverted repeats*) und eine Transposase, um in ein Genom inserieren zu können. Im P-Element-Transformationsvektor lokalisiert die zu übertragende DNA zwischen den *inverted repeats* während auf einem gesonderten Helferplasmid die Transposase zur Verfügung gestellt wird. Beide Plasmide werden in Embryonen von *Drosophila melanogaster* injiziert und können so zufällig in das Genom inserieren. Die Injektion der Plasmide, sowie das anschließende Auskreuzen der Fliegen, zur Bestimmung des Insertionsortes, werden wie in Kapitel 4 des Buches *Drosophila Methods and Protocols* von A. Bachmann und E. Knust beschrieben, durchgeführt (Bachmann und Knust, 2008).

2.5.6 Erzeugung von GFP-Keimbahnklonen mittels des FRT-FLP-Systems

Die Erzeugung von Keimbahnklonen kommt oft zur Anwendung, wenn homozygot mutante Tiere nicht lebensfähig sind und eine maternale Komponente besitzen, die mögliche Phänotypen in der Oogenese oder Embryogenese maskiert. Hierbei wird in heterozygot mutanten Tieren eine homozygot mutante Keimbahn erzeugt und so die maternale Komponente ausgeschaltet. So können Aussagen darüber gemacht werden, ob und in wieweit das Gen für die Oogenese oder die Entwicklung des Embryos

notwendig ist. Für die Induzierung von Klonen in der Keimbahn wird das FRT (*flipase recombination target*)-FLP (*Flipase*)-System verwendet (Chou und Perrimon, 1992). Die Flipase unterliegt der Kontrolle eines Hitzeschockpromotors und katalysiert eine spezifische Rekombination der FRT-Sequenzen, welche aus 599bp invertierten Sequenzwiederholungen bestehen. So kann in heterozygoten Fliegen, welche diese FRT-Sequenzen tragen, mit Hilfe der Flipase eine mitotische Rekombination zwischen diesen Chromosomen stattfinden und homozygot mutante Zellen entstehen (Golic und Lindquist, 1989).

Für die Erzeugung von GFP-Keimbahnklonen werden Jungfrauen, die das mutante Allel von *rngo* mit einer FRT Sequenz tragen, mit Männchen gekreuzt, die auf dem ersten Chromosom ein GFP-Konstrukt als Marker aufweisen und auf dem zweiten Chromosom die Flipase tragen. Die Flipase auf dem zweiten Chromosom katalysiert dann während des zweiten Larvenstadiums die mitotische Rekombination zwischen den FRT-Sequenzen (Abbildung 2.3). Der Hitzeschock für die Aktivierung der Flipase erfolgt im zweiten Larvenstadium an zwei aufeinanderfolgenden Tagen für jeweils 2h bei 37°C im Wasserbad.

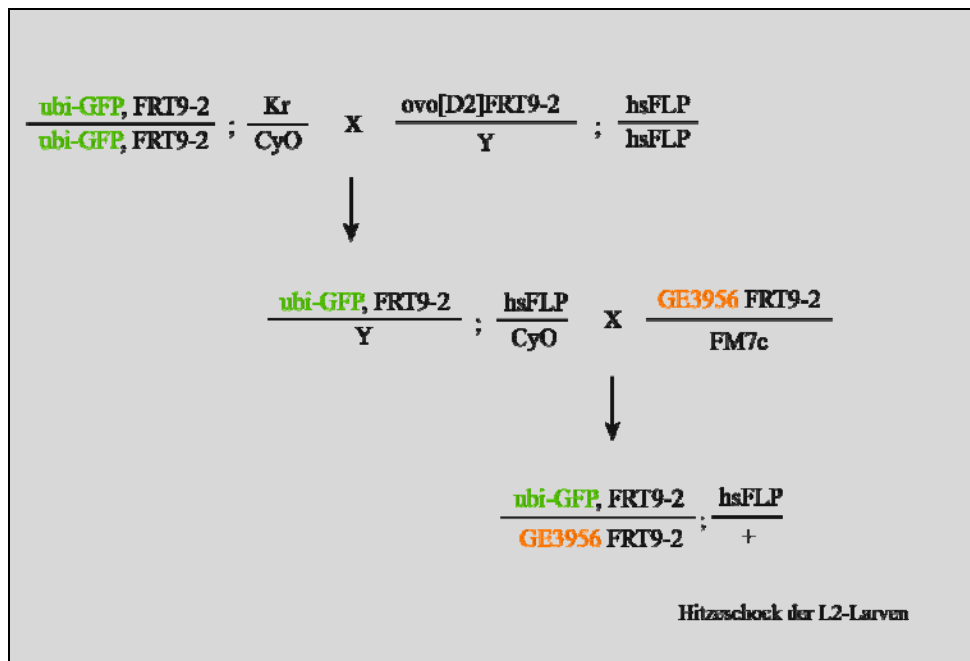


Abbildung 2.3: **Kreuzung zur Herstellung von GFP-Keimbahnklonen.** Für die Generierung von Keimbahnklonen wird ein GFP-Markerkonstrukt zusammen mit dem mutanten Allel für *rngo*, mit FRT Sequenzen und einer Flipase in eine Fliege eingekreuzt. Nach einem Hitzeschock vermittelt die Flipase eine mitotische Rekombination zwischen den FRT Sequenzen, so dass homozygot mutante Keimzellen entstehen.

In den sich entwickelnden heterozygoten Tieren entsteht eine für das *rngo* Allel homozygot mutante Keimbahn. Als Marker wird hierfür GFP verwendet. Eikammern, die homozygot oder heterozygot für das GFP-Konstrukt sind, tragen noch eine wildtypische Kopie des *rngo* Allels. Eikammern, die kein GFP exprimieren sind homozygot mutant und können so von den heterozygoten unterschieden werden.

2.5.7 Erzeugung von GFP-Follikelzellklonen mittels des FRT-FLP-Systems

Follikelzellen umgeben die Keimzellen, sind somatischen Ursprungs und besitzen eine ausgeprägte apiko-basolaterale Polarität. Deshalb kann man in diesem Zelltyp gut die Auswirkungen von mutanten Allelen auf die Zellpolarität untersuchen. Für die Erzeugung von Follikelzellklonen wird das FRT-FLP-System in ähnlicher Weise wie bei der Erzeugung von Keimbahnklonen verwendet, nur wird hier der Hitzeschock bei 3-5 Tage alten Fliegen für jeweils 1h bei 37°C vorgenommen und die Ovarien nach weiteren 3-5 Tagen präpariert.

3 Ergebnisse

3.1 Die Annotierung von *rings lost (rngo)*

rings lost (rngo) ist auf dem X-Chromosom lokalisiert und seine genomische Struktur umfasst vier Exons und drei Introns, wobei der vorhergesagte Translationsstart im ersten Exon und der Translationsstop im vierten Exon liegen (Abbildung 3.1). Die Daten der Annotierung von *rngo* sind der Internetseite von FlyBase (www.flybase.org, Stand 2010) zu entnehmen.

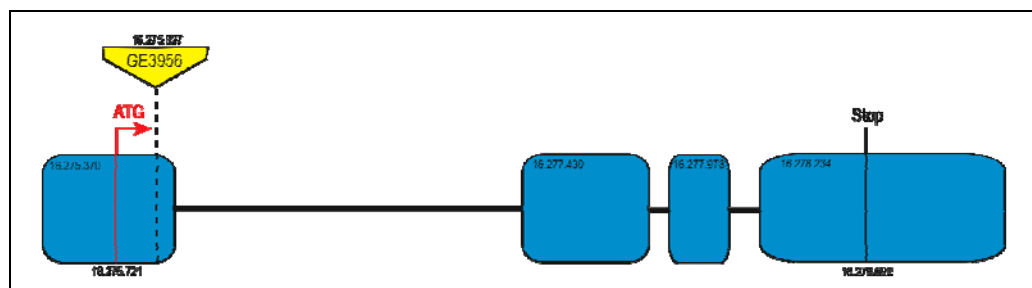


Abbildung 3.1: **Die genomische Struktur von *rngo*.** Das Schema zeigt maßstabsgetreu die genomische Annotierung von *rngo*. *rngo* liegt auf dem X-Chromosom und besitzt vier Exons (blaue Kästen) und drei Introns (schwarze Balken). Im ersten Exon befindet sich das Startcodon (roter Pfeil) und im vierten Exon das Stopcodon (schwarzer Strich). Eine P-Element-Insertionslinie (GE3956) aus der Genexel Datenbank (Kapitel 2.2.5) trägt ein P-Element stromabwärts des ATG-Startcodons und führt so zu einem Abbruch der Translation und in Folge dessen zu einem Null-Allel von *rngo*.

rngo kodiert für ein 458 Aminosäuren langes Protein. Um die Funktion dieses Proteins zu untersuchen, wurde durch Datenbankanalysen eine P-Element-Insertionslinie (GE3956) in der Genexel Datenbank identifiziert, die eine P-Element-Insertion stromabwärts des ATG-Startcodons trägt. Diese Insertion führt zum Abbruch der Translation und so zu einem Null-Allel von *rngo*. Fliegen, die hemizygot diese P-Element-Insertion tragen, sind pupal letal, was auf die essentielle Funktion des Gens während der Entwicklung von *Drosophila* hindeutet. Diese späte Letalität lässt sich auf eine maternale Komponente von Rngo zurückführen. Um zu überprüfen, ob die Letalität nur auf der Mutation in *rngo* beruht und ob Rngo-GFP-Fusionsproteine, die von transgenen Fliegen exprimiert werden, funktional sind, wurden Rettungsexperimente durchgeführt.

3.2 Rettungsexperimente

Die Rettungsexperimente wurden wie in Kapitel 2.5.4 beschrieben durchgeführt. Anschließend erfolgte die Auszählung der erhaltenen Genotypen. Hierbei wurde unterschieden, ob die Fliegen das Balancer-Chromosom tragen oder zur Gruppe der geretteten Tiere gehören. Da das mutante Allel von *rngo* auf dem X-Chromosom lokalisiert ist und daher nur hemizygot mutante Männchen gerettet werden können, wurden hier nur männliche Tiere berücksichtigt. Die Kreuzung für die Rettungsexperimente wurde wie folgt angesetzt:

$$\frac{\text{GE3956}}{\text{FM7}} \text{ X } \frac{\text{FM7}}{\text{Y}} ; \frac{\text{UAS::GFP-rings lost, daughterless Gal4}}{\text{TM3}}$$

bzw.

$$\frac{\text{GE3956}}{\text{FM7}} \text{ X } \frac{\text{FM7}}{\text{Y}} ; \frac{\text{UAS::rings lost-GFP, daughterless Gal4}}{\text{TM3}}$$

Für die Rettungsexperimente werden transgene Fliegen verwendet, die auf dem dritten Chromosom ein *rngo*-Transgen tragen, welches entweder ein N-terminales oder C-terminales GFP-Tag aufweist und unter der Kontrolle eines UAS-Promotors steht. Auf dieses Chromosom wurde zusätzlich ein *daughterless*-Gal4-Treiber rekombiniert, so dass dieses GFP-*rngo*-Transgen ständig im Muster des *daughterless*-Gens abgelesen wird. Die möglichen F1-Genotypen ergeben sich aus dem folgenden Kreuzungsschema (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: **Kreuzungsschema für die Rettungsexperimente.** Dieses Kreuzungsschema gibt eine Übersicht über die theoretisch erhaltenen Genotypen der Männchen innerhalb der F1-Generation. Der gelb hinterlegte Genotyp stellt die geretteten Fliegen dar und der grau hinterlegte Genotyp ist letal. Abkürzung: UAS::*rngo*-GFP = UAS::*rngo*-GFP, *daughterless* Gal4 bzw. UAS::*GFP-rngo*, *daughterless* Gal4

♀ +	♂	Y ; TM3	Y ; UAS:: <i>rngo</i> -GFP
GE3956		GE3956/Y ; TM3/+	GE3956/Y ; UAS:: <i>rngo</i> -GFP/+
FM7		FM7/Y ; TM3/+	FM7/Y ; UAS:: <i>rngo</i> -GFP/+

Im Kreuzungsschema der Tabelle 3.1 stellt der gelb markierte Genotyp die geretteten Tiere dar. Männchen des grau hinterlegten Genotyps sind letal. Statistisch gesehen sollten 1/3 aller männlichen, lebenden Nachkommen in der F1-Generation gerettete Tiere sein. Dieses entspricht 33,33% der geschlüpften Männchen. Tabelle 3.2 fasst die Ergebnisse der Rettungskreuzungen mit N- und C-terminal markierten GFP-Fusionsproteinen zusammen.

Tabelle 3.2: **Ergebnisse der Rettungskreuzungen.** Die Tabelle zeigt die zu erwartenden und erhaltenen männlichen Nachkommen in der F1-Generation der Rettungskreuzungen.

transgene Fliegenlinie	Gesamtzahl F1	Anzahl erwarteter geretteter Tiere		Anzahl erhaltener geretteter Tiere	
		relativ	absolut	relativ	absolut
GFP-Rngo 6.1 N- terminales Tag	604	33,33%	201	43%	260
Rngo-GFP 3.1 C- terminales Tag	1082	33,33%	360	45%	489

Sowohl das N- als auch das C-terminal GFP markierte Rngo-Fusionsprotein retteten die Letalität des mutanten *rngo*-Allels. Beide Rettungskreuzungen ergaben sogar mehr gerettete Fliegen (43% bzw. 45% anstatt 33,33%), als normalerweise erwartet wird. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die Letalität des mutanten Alleles nur auf die P-Element-Insertion und somit auf ein Fehlen von Rngo zurückzuführen ist. Außerdem wurde bewiesen, dass die beiden GFP-Fusionsproteine funktional sind und somit die Funktion des wildtypischen Proteins ersetzen können.

3.3 Die wildtypische Expression von Rngo

Zu Beginn dieser Arbeit stand ein affinitätsgereinigter Antikörper gegen Rngo zur Verfügung (Kapitel 2.1.5). Hierfür wurden Kaninchen gegen ein Volllängen GST-Fusionsprotein von Rngo immunisiert. Der Antikörper detektiert in Färbungen spezifisch Rngo, da in mutanten Zellen (Abbildungen 3.6 und 3.20) kein Signal für Rngo erkennbar ist. Während der gesamten Entwicklung von *Drosophila melanogaster* kann die subzelluläre Verteilung von Rngo als zytoplasmatisch und nukleär bezeichnet werden. Außerdem ist Rngo ubiquitär exprimiert. Abbildung 3.2 veranschaulicht die Verteilung von Rngo während der Oogenese. In den Abbildungen 3.2A-D sind zwei Eikammern in unterschiedlichen Stadien dargestellt. Abbildung 3.2A'-D' zeigt eine Vergrößerung der jüngeren Eikammer. Die Kernlokalisierung von Rngo spiegelt sich in der Färbung der Nährzellkerne, aber auch in einer Färbung, die den Oozytenkern umgibt, wider.

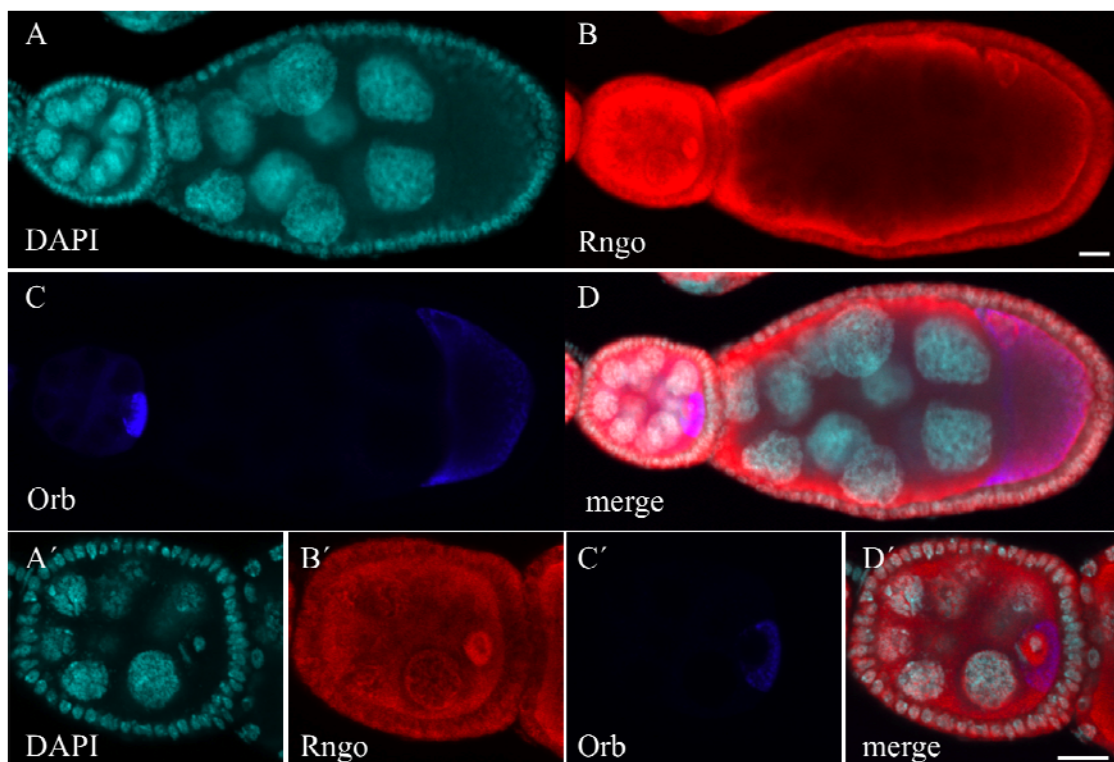


Abbildung 3.2: **Wildtypische Expression von Rngo in Ovarien.** Gezeigt ist DAPI in türkis (A und A'), Rngo in rot (B und B'), Orb in blau (C und C') und die Überlagerung der einzelnen Kanäle (D und D'). Rngo ist in Ovarien zytoplasmatisch und nukleär exprimiert. Die Lokalisierung von Rngo in den Zellkernen zeigt sich in der Färbung der Nährzellkerne, aber auch in einer Färbung, die den Oozytenkern umgibt. Anterior ist links. Die Maßstäbe entsprechen 10µm.

Da die Oozyte während der gesamten Oogenese transkriptionell inaktiv ist, handelt es sich hierbei wahrscheinlich um Rngo-Protein, welches von den Nährzellen durch die Ringkanäle in die Oozyte transportiert wurde. Die Oozyte wird in C' und D' durch die Orb-Färbung markiert (Christerson und McKearin, 1994). Bei der älteren Eikammern in Abbildungen 3.2B ist zu erkennen, dass der Antikörper gegen Rngo ein Penetrationsproblem bei größeren Eikammern hat. Die weiter innen liegenden Keimbahnzellen zeigen ein schwächeres Signal für Rngo, jedoch ist immer noch eine spezifische Färbung der Nährzellkerne und des Bereichs, der das Karyosom umgibt, zu erkennen.

Auch in Embryonen ist Rngo zytoplasmatisch sowie nukleär exprimiert. Abbildung 3.3A-C zeigt die Expression von Rngo in einem Embryo, der sich im Stadium 4 der Embryogenese, dem synzytialen Blastoderm befindet.

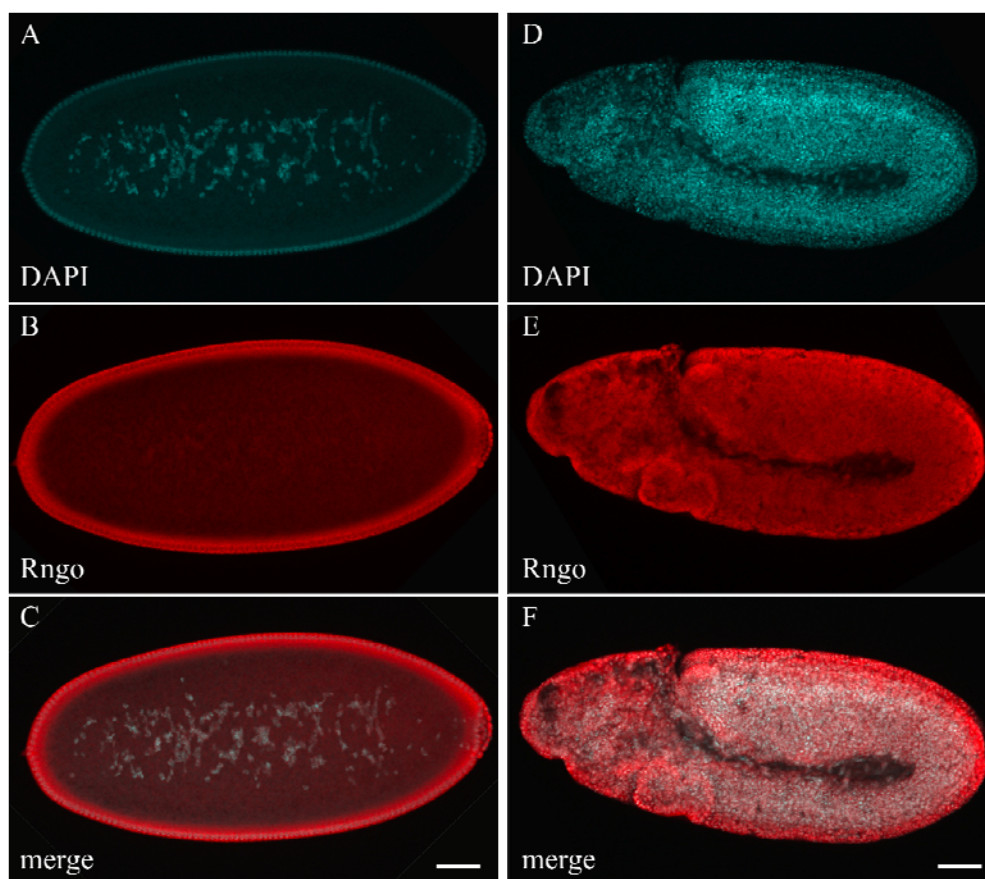


Abbildung 3.3: **Wildtypische Expression von Rngo in Embryonen.** Gezeigt ist DAPI in türkis (A und D), Rngo in rot (B und E) und die Überlagerung der beiden Kanäle (C und F). Die Expression von Rngo kann in Embryonen, die sich im synzytialen Blastoderm (A-C) oder im Stadium 11 (A'-C') der Embryogenese befinden, als zytoplasmatisch und nukleär bezeichnet werden. Anterior ist links. Die Maßstäbe entsprechen 50µm.

In Abbildung 3.3D-F ist ein Embryo im Stadium 11 der Embryogenese abgebildet. Auch hier ist die Expression von Rngo zytoplasmatisch und nukleär und es können keine Bereiche ausgemacht werden, in denen Rngo stärker oder schwächer exprimiert ist.

Als ein Beispiel für die Verteilung von Rngo in larvalen Geweben kann das Protein auch in Gehirnen von L3-Larven in allen Zellen beobachtet werden (Abbildung 3.4A-C). Die Abbildungen 3.4A'-D zeigen die Vergrößerung des mit einer weißen, gestrichelten Linie markierten Bereichs in B. In der Überlagerung in D kann man eine Kolokalisierung (gelb) von F-Aktin und Rngo an der Plasmamembran erkennen. Die subzelluläre Verteilung von Rngo ist auch in Gehirnen von L3-Larven zytoplasmatisch und nukleär. Rngo ist auch in den am Gehirn anhängenden Imaginalscheiben exprimiert.

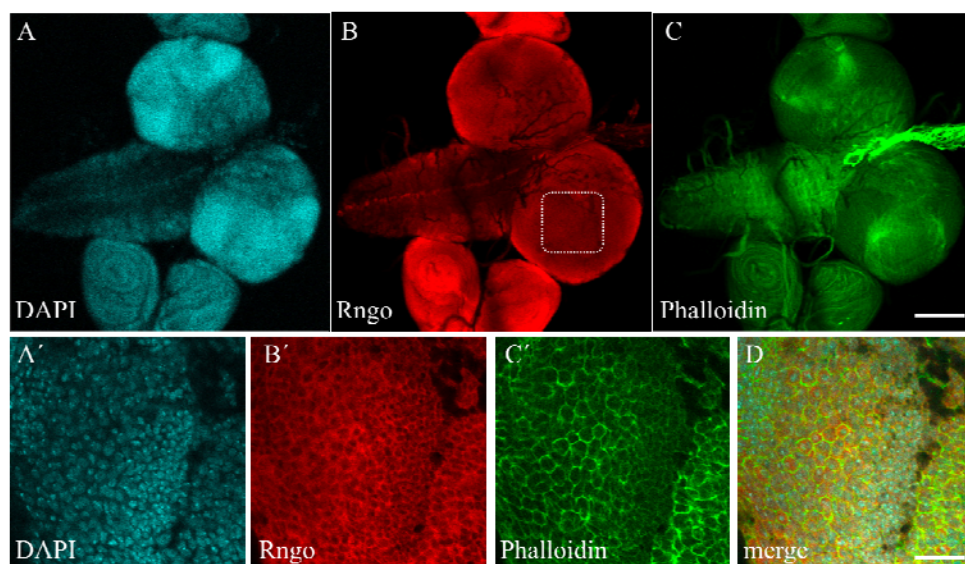


Abbildung 3.4: **Wildtypische Expression von Rngo in Gehirnen von L3-Larven.** Gezeigt ist DAPI in türkis (A und A'), Rngo in rot (B und B'), Phalloidin in grün (C und C') und die Überlagerung von A'-C' (D). A'-D repräsentieren die Vergrößerung des Bereichs, der in B mit einer weißen, gestrichelten Linie markiert wurde. In Gehirnen von L3-Larven ist Rngo zytoplasmatisch und nukleär exprimiert und die Überlagerung in D zeigt eine Kolokalisierung (gelb) von F-Aktin und Rngo an der Plasmamembran. Der Maßstab A-C entspricht 100µm. Der Maßstab A'-D entspricht 20µm.

Der Antikörper gegen Rngo erkennt das wildtypische Protein auch spezifisch im Western Blot mit einer Bande bei ca. 60kDa. Wie später in Abbildung 3.38 gezeigt wird, kann ein Signal für Rngo nur in den Kontrollen, nicht aber in Proteinextrakten von zygotisch mutanten L3-Larven detektiert werden.

3.4 Untersuchung des Follikelepithels in *rngo*-mutanten Fliegen

Rngo wurde in einem Hefe zwei-Hybrid-Screen als Interaktionspartner von Bazooka (Baz) identifiziert. Baz ist eine Schlüsselkomponente des Par/aPKC-Komplexes. Dieser Komplex wiederum ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Zellpolarität in verschiedenen Zelltypen und Geweben. Um zu untersuchen, ob Zellklone für *rngo* eine Auswirkung auf die Polarität von Epithelzellen haben, wurden unter anderem Follikelzellklone für *rngo* induziert.

Follikelzellen der Eikammern stellen eine Sonderform der Epithelzellen dar, da die apikale Membran nicht an ein Lumen grenzt, sondern im Kontakt mit den Zellen der Keimbahn steht. Signale zwischen den Follikelzellen und der Oozyte sind für die korrekte Achsenorientierung der Oozyte notwendig. Aber genau wie andere Epithelien gliedert sich das Follikelepithel in eine apikale und eine basolaterale Membran (Abbildung 3.5). Apikal lokalisieren Proteine der subapikalen Region (SAR, rot) wie z.B. Baz, Par6 und aPKC. In der sich anschließenden Zonula adherens (ZA, grün) befinden sich das Transmembranprotein DE-Cadherin und die Gerüstproteine Armadillo und α -Catenin. An der basolateralen Membrandomäne, welche die Septate Junctions (SJ, blau) beinhaltet, lokalisieren die Proteine Discs large und Lethal giant larvae.

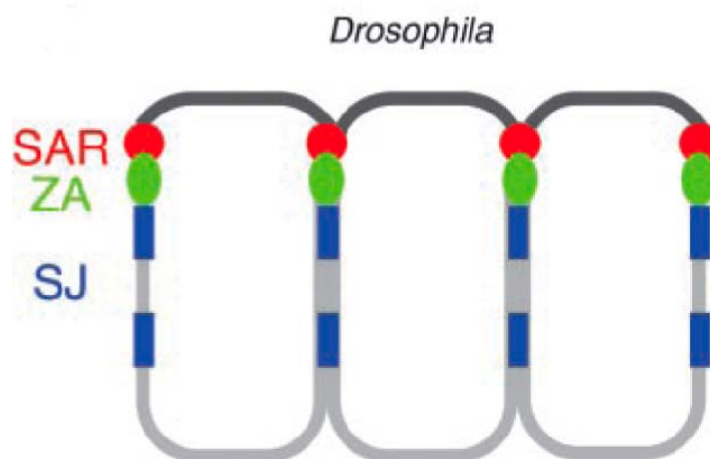


Abbildung 3.5: **Organisation von Epithelzellen in *Drosophila melanogaster*.** Epithelien gliedern sich in *Drosophila* in definierte Membrandomänen. In der apikalen Membrandomäne befindet sich die subapikale Region (SAR, rot) und darunter die Zonula adherens (ZA, grün). Daran schließt sich die basolaterale Domäne an, welche die Septate Junctions (SJ, blau) beinhaltet (verändert nach Knust und Bossinger, 2002).

3.4.1 Die Polarität des Follikelepithels von *rngo*-mutanten Fliegen ist nicht verändert

Als Polaritätsmarker wurden die in Tabelle 3.3 aufgelisteten Proteine auf ihre Verteilung im Follikelepithel hin untersucht.

Tabelle 3.3: **Durchgeführte Antikörperfärbungen gegen die aufgelisteten Proteine, als Marker für die Zellpolarität in Follikelzellen.** In der subapikale Region lokalisieren Baz, Par6 und aPKC, in der Zonula adherens Armadillo, α -Catenin und DE-Cadherin und an der basolateralen Membran Discs large und Lethal giant larvae.

subapikale Region	Zonula adherens	Septate Junction
Bazooka	Armadillo	Discs large
Par6	α -Catenin	Lethal giant larvae
aPKC	DE-Cadherin	

Abbildung 3.6 zeigt exemplarisch die Verteilung von Baz in *rngo*-mutanten und wildtypischen Follikelzellen. Das Fehlen der Färbung für Rngo in den *rngo*-mutanten Follikelzellklonen, im Vergleich zu den benachbarten wildtypischen Zellen verdeutlicht die Spezifität des Antikörpers, da in den mutanten Zellen keine Färbung detektiert werden kann.

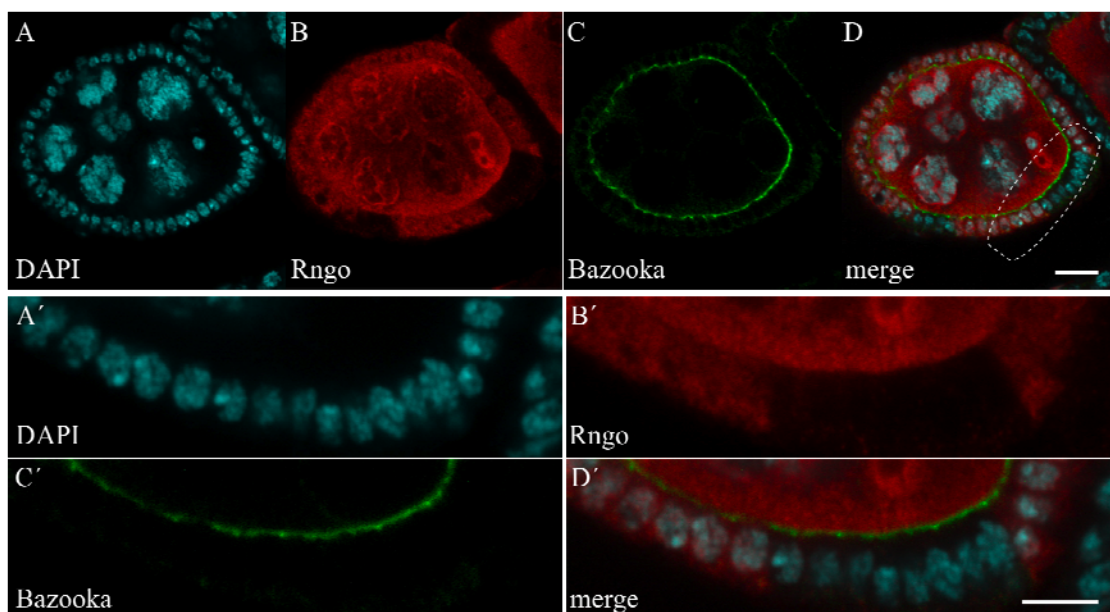


Abbildung 3.6 (vorherige Seite, 55): **Der Verlust von Rngo in Follikelzellen führt nicht zu einem Verlust der Zellpolarität.** DAPI ist in A und A' in türkis dargestellt. In Zellklonen für *rngo* kann kein Rngo mehr detektiert werden (rot in B und B'), die Verteilung von Baz (grün in C und C') verändert sich jedoch nicht. D und D' zeigen die Überlagerungen der einzelnen Kanäle. A'-D' zeigen vergrößert die Follikelzellen, die in D mit einer weißen, gestrichelten Linie markiert wurden. Anterior ist links. Der Maßstab A-D entspricht 10µm. Der Maßstab A'-D' entspricht 5µm.

In *rngo*-mutanten Follikelzellklonen konnte, verdeutlicht durch eine unveränderte Lokalisierung von Baz, keine Veränderung der Polarität im Epithel festgestellt werden. Die anderen Polaritätsmarker, die in Tabelle 3.3 aufgelistet sind, zeigen ebenfalls eine wildtypische Lokalisierung und sollen daher hier nicht weiter aufgeführt werden. Ebenfalls untersuchte Imaginalscheibenklone für *rngo* und Neuroblasten in Gehirnen von zygotisch mutanten L3-Larven ließen keine Veränderung der Zellpolarität erkennen. Zusätzlich wurden Koimmunpräzipitationen von Rngo und Baz durchgeführt, aber da auch hier keine Interaktion zwischen Rngo und Baz festgestellt werden konnte, werden die Ergebnisse hier nicht präsentiert.

3.5 Untersuchung der Ovarien von Keimbahnklonen des mutanten *rngo*-Allels

Da Rngo, wie in Kapitel 3.1 beschrieben, eine maternale Komponente besitzt, kann dieses maternal bereitgestellte Protein mögliche Phänotypen in der Entwicklung der Fliege maskieren. Wenn eine Mutation in *rngo* homozygot zur Letalität der Fliege führt, ist es nicht möglich, homozygot mutante Tiere zu erhalten, deren Keimbahn das maternale Genprodukt fehlt. Es ist jedoch möglich, heterozygot mutante Fliegen zu erzeugen, die eine homozygot mutante Keimbahn aufweisen. Eine durch einen Hitzeschock aktivierte Flipase induziert die mitotische Rekombination an FRT-Sequenzen und erzeugt dadurch homozygot mutante Keimzellen in einem genetisch heterozygoten Hintergrund (Kapitel 2.5.6). Erfolgt der Hitzeschock bei der Teilung der Keimbahnstammzellen, entstehen homozygot mutante Zystoblasten, die im Verlauf der Oogenese komplett mutante Eikammern hervorbringen. Wurden Zellen erst im Zystozyten-Stadium während der Mitose homozygot mutant, können auch Mosaik-Eikammern entstehen. Für die Erzeugung von Keimbahnklonen wurde das mutante

Allel von *rngo*, welches eine P-Element-Insertion (GE3956) stromabwärts des ATG-Startcodons trägt, verwendet. Als Kontrolle dienten Fliegen, die ein Chromosom mit FRT-Sequenz ohne Mutation, sowie das FRT-Chromosom mit GFP tragen. Bei diesen Klonen wird keine Veränderung gegenüber dem Wildtyp erwartet, wodurch ausgeschlossen werden kann, dass gezeigte Phänotypen auf die Rekombination des FRT-Chromosoms zurückzuführen sind.

3.5.1 Keimbahnklone des mutanten *rngo*-Allels zeigen verschiedene Phänotypen während der Oogenese

Für die Identifizierung der induzierten Keimbahnklone des mutanten *rngo*-Allels wurden GFP-Konstrukte als Marker verwendet (Kapitel 2.5.6). Eikammern bzw. Embryonen, die homozygot oder heterozygot für das GFP-Konstrukt sind, tragen auch mindestens eine wildtypische Kopie des *rngo*-Allels. Nur Eikammern bzw. Embryonen, die das GFP nicht exprimieren, sind homozygot für das mutante *rngo*-Allel und können auf diese Weise selektiert werden.

Es wurde festgestellt, dass Weibchen, die Ovarien mit Keimbahnklonen tragen, keine Eier ohne GFP-Fluoreszenz legen. Dies bedeutet, dass die Eikammern, welche homozygot mutant für das *rngo*-Allel sind, die Oogenese nicht vollenden. Stattdessen degenerieren diese in unterschiedlichen Stadien der Oogenese. Die genaue Bestimmung des Eikammerstadiums von degenerierenden Eikammern ist jedoch schwierig, da durch die später beschriebenen Phänotypen, die Morphologie der Eikammern stark beeinträchtigt ist. Es konnten keine Keimbahnklone im Stadium 10 beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass die Entwicklung vorher abbricht. Keimbahnklone des mutanten *rngo*-Allels zeigen verschiedene Phänotypen, die im Folgenden näher beschrieben werden.

3.5.1.1 Keimbahnklone des mutanten *rngo*-Allels zeigen eine Fehllokalisierung von Ringkanal-assoziierten Proteinen, ektopische F-Aktin Akkumulationen und das Einwandern von Nährzellkernen in die Oozyte

Abbildung 3.7 zeigt die wildtypische Verteilung von F-Aktin und Hu-li tai shao-Ring Canal (Hts-RC) in FRT-Kontrollkeimbahnklonen (Petrella et al., 2007). F-Aktin lokalisiert zusammen mit Hts-RC an den gleichförmig großen Ringkanälen (Pfeile), welche die einzelnen Zellen miteinander verbinden. Außerdem zeigt die Färbung für Phalloidin (rot in B) eine Lokalisierung von F-Aktin an der Plasmamembran der Keimbahn- und Follikelzellen. Die Oozyte ist die Zelle, die sich am weitesten posterior befindet und den stark kondensierten Oozytenkern, das Karyosom aufweist (Pfeilkopf in E). Die übrigen Zellen sind die Nährzellen mit ihren polyploiden Nährzellkernen.

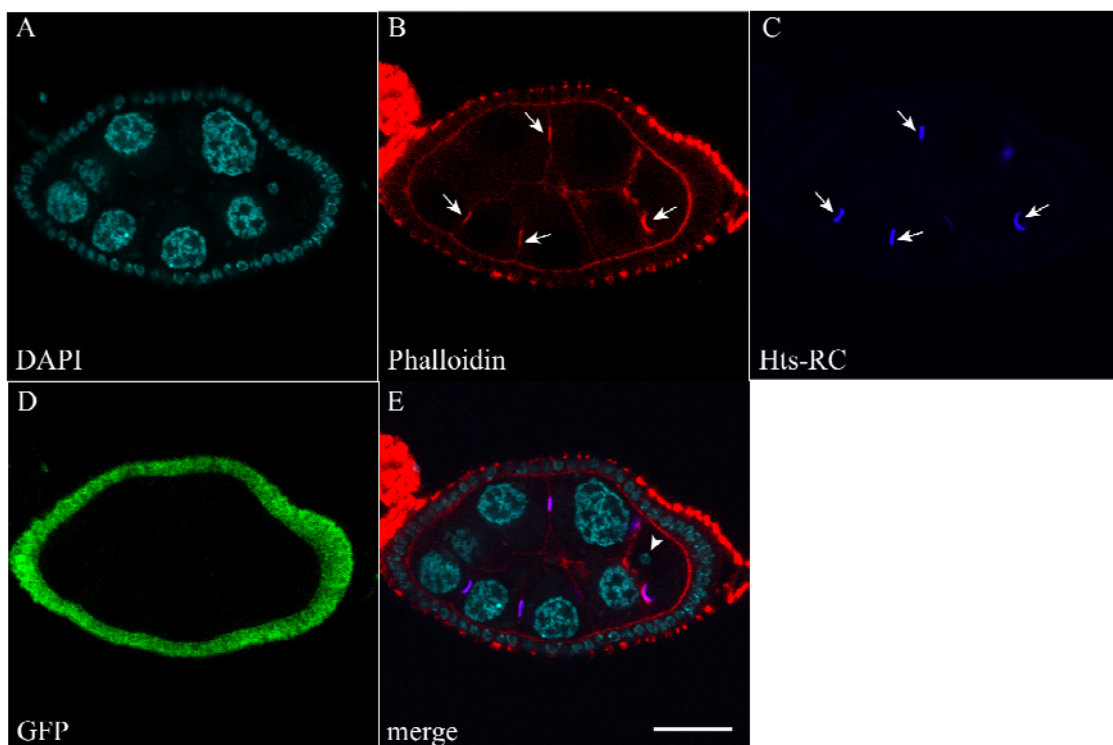


Abbildung 3.7: **Wildtypische Lokalisierung von F-Aktin und Hu-li tai shao-Ring Canal (Hts-RC) in FRT-Kontrollkeimbahnklonen.** Gezeigt ist DAPI in türkis (A), Phalloidin in rot (B), Hts-RC in blau (C), GFP in grün (D) und die Überlagerung der einzelnen Kanäle ohne GFP (D). FRT-Kontrollkeimbahnklone zeigen F-Aktin an den Ringkanälen (Pfeile in B) und an der Plasmamembran der Keimbahnzellen. Hts-RC ist ausschließlich an den Ringkanälen zu beobachten (Pfeile in C) und der Oozytenkern liegt in der sich am weitesten posterior befindenden Zelle (Pfeilkopf in E). Anterior ist links. Der Maßstab entspricht 20µm.

Im Gegensatz zu diesem Ergebnis zeigen die Keimbahnklone in Abbildung 3.8, die homozygot für das mutante *rngo*-Allel sind, eine Fehlverteilung von Hts-RC (blau in C und H). Hts-RC ist nicht mehr ausschließlich an den Ringkanälen lokalisiert, sondern über den gesamten Bereich der Plasmamembran der Keimbahnzellen verteilt. Zusätzlich kann ein Fehlen von Ringkanälen in einigen Bereichen der Eikammer beobachtet werden. Auch die Gleichförmigkeit der Ringkanäle ist in diesen Keimbahnklonen nicht mehr zu verzeichnen. So zeigt die Färbung für F-Aktin und Hts-RC in Abbildung 3.8B und C zwei Ringkanäle (Pfeile in B und C), deren Durchmesser unterschiedlich ist. Auch scheint die Plasmamembran von zwei Keimbahnzellen in diesen Keimbahnklonen zu degenerieren. Abbildung 3.8A und E zeigen den Oozytenkern (Stern) und einen Nährzellkern (Pfeilkopf) in ein und derselben Zelle. Dieser Prozess des Einwanderns von Nährzellkernen in die Oozyte kann auch in Abbildung 3.8F und J beobachtet werden. In dieser Abbildung sind sogar zwei Nährzellkerne (Pfeilköpfe) zusammen mit dem Oozytenkern (Stern) in einer Zelle zu beobachten. Hier scheint also von mehreren Keimbahnzellen die Plasmamembran degeneriert zu sein. Auch die Morphologie des Oozytenkerns ändert sich in *rngo*-Keimbahnklonen. Abbildung 3.7E zeigt einen FRT-Kontrollkeimbahnklon mit einem wildtypischen sphärischen Karyosom (Pfeilkopf). Im Gegensatz dazu weist der Oozytenkern in *rngo*-Keimbahnklonen (Abbildung 3.8F und J markiert durch einen Stern) eine längliche und nicht mehr so kompakte Struktur auf.

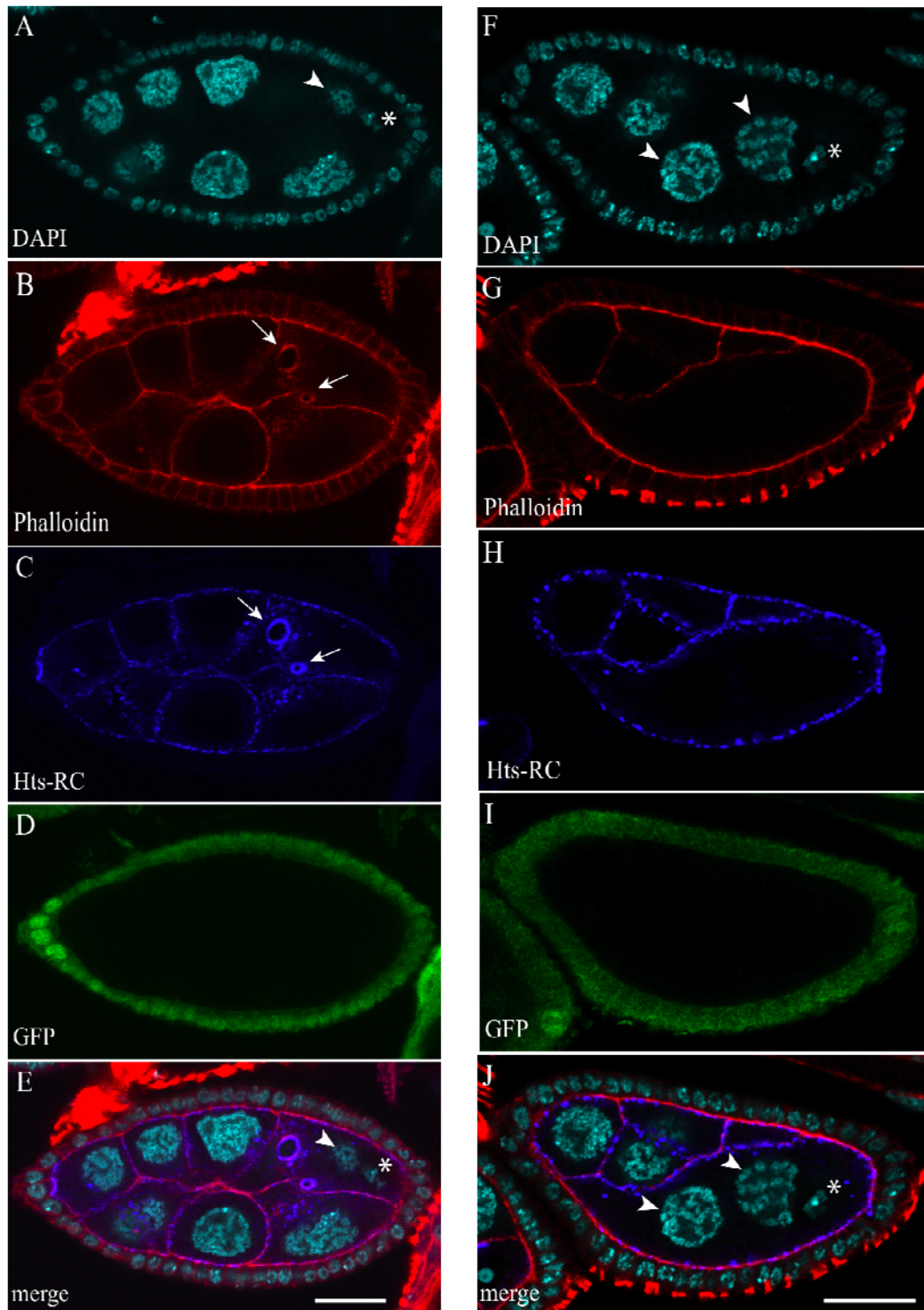


Abbildung 3.8: Keimbahnklone des mutanten *rngo*-Allels zeigen eine Fehllokalisierung von Hts-RC, unterschiedlich große bzw. fehlende Ringkanäle, eine Degenerierung der Plasmamembran von Keimbahnzellen, Nährzellkerne im Bereich der Oozyte, sowie eine veränderte Morphologie des Oozytenkerns. Gezeigt ist DAPI in türkis (A und F), Phalloidin in rot (B und G), Hts-RC in blau (C und H), GFP in grün (D und I) und die Überlagerung der einzelnen Kanäle ohne GFP (E und J). Nährzellkerne im Bereich der Oozyte sind mit Pfeilköpfen, der Oozytenkern mit einem Stern und ungleich große Ringkanäle mit Pfeilen markiert. Anterior ist links. Die Maßstäbe entsprechen 20µm.

Die Ringkanal-assoziierten Proteine Filamin und Kelch (Kel) lokalisieren in FRT-Kontrollkeimbahnklonen an den Ringkanälen (Hudson und Cooley, 2010; Sokol und Cooley, 1999). Abbildung 3.9 zeigt die Verteilung von Filamin (rot in B) und Kel (blau in C) markiert durch Pfeile.

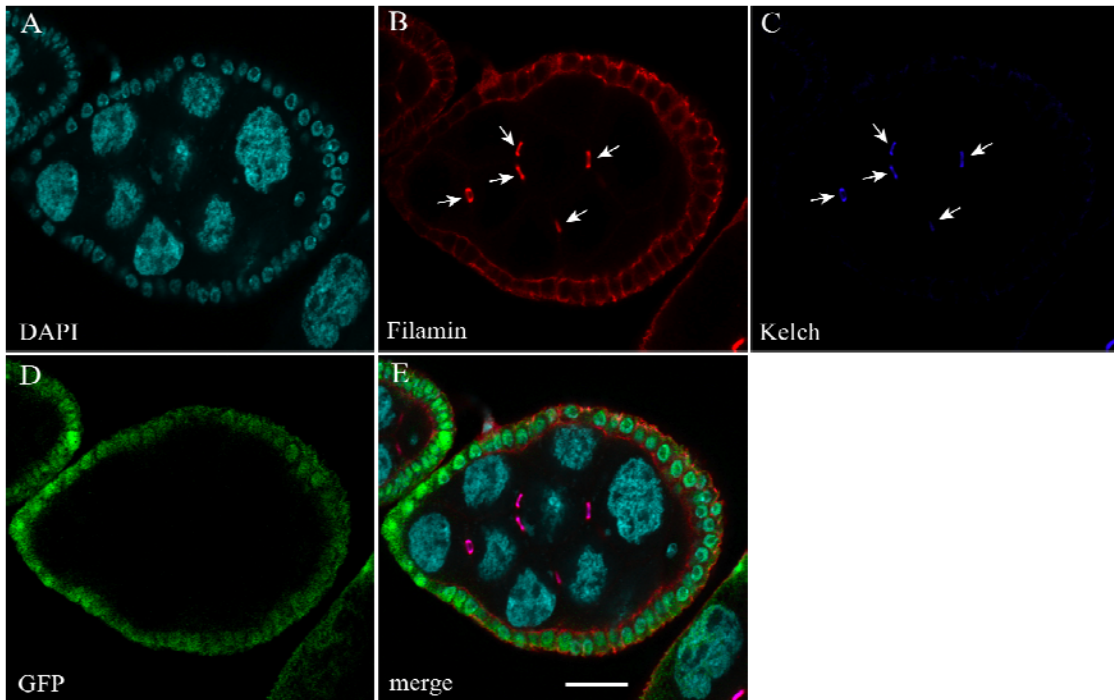


Abbildung 3.9: **Wildtypische Lokalisierung von Filamin und Kelch in FRT-Kontrollkeimbahnklonen.** Gezeigt ist DAPI in türkis (A), Filamin in rot (B), Kel in blau (C), GFP in grün (D) und die Überlagerung der einzelnen Kanäle (E). Pfeile weisen auf die spezifische Färbung der Ringkanäle in der Keimbahn hin. Anterior ist links. Der Maßstab entspricht 20 μ m.

In *rngo*-Keimbahnklonen weisen auch Filamin und Kelch eine Fehlverteilung im Vergleich zu FRT-Kontrollkeimbahnklonen auf. Die Färbung für Filamin in Abbildung 3.10B zeigt im Gegensatz zum Wildtyp (Abbildung 3.9) eine Verteilung von Filamin über den gesamten Bereich der Plasmamembran der Keimbahnzellen. Kel, welches im Wildtyp spezifisch die Ringkanäle anfärbt, ist zytoplasmatisch verteilt und zusammen mit Filamin an der Plasmamembran zu erkennen. Rudimentäre Ringkanäle sind in Abbildung 3.10B und C mit Pfeilen markiert und zeigen dort eine Kolokalisierung von Filamin und Kel (Abbildung 3.10E). Auch bei dieser mutanten Eikammer kann ein Nährzellkern (Pfeilkopf in A und E) zusammen mit dem Oozytenkern (Stern in A und E) in einer Zelle beobachtet werden. Der Nährzellkern weist zusätzlich eine abnormale Größe auf, da dieser viel größer ist als die

benachbarten Nährzellkerne. Zwar unterlaufen die Nährzellkerne, die sich weiter posterior in der Eikammer befinden, mehr Endozyklen als diejenigen, die weiter anterior liegen, jedoch ist der Größenunterschied in wildtypischen Eikammern (Abbildung 3.9A) weitaus geringer.

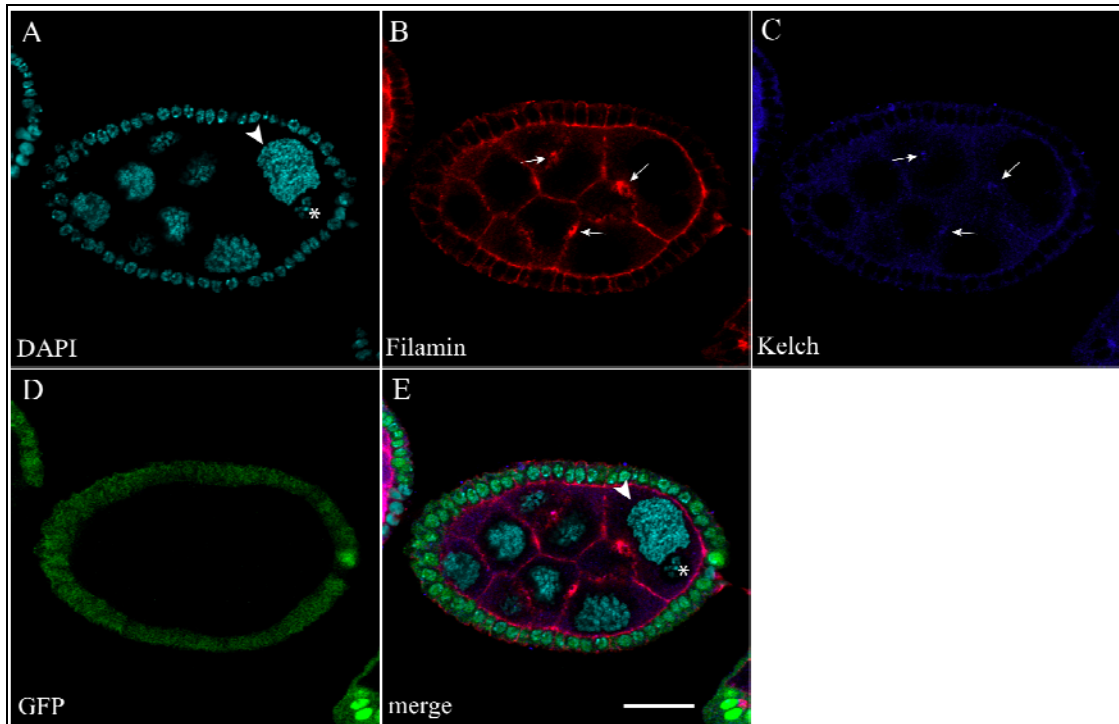


Abbildung 3.10: **Keimbahnklone des mutanten *rngo*-Allels zeigen eine Fehllokalisierung von Filamin und Kelch, Nährzellkerne im Bereich der Oozyte sowie eine veränderte Morphologie von Nährzellkernen.** Gezeigt ist DAPI in türkis (A), Filamin in rot (B), Kelch in blau (C), GFP in grün (D) und die Überlagerung der einzelnen Kanäle (E). Der Nährzellkern im Bereich der Oozyte ist mit einem Pfeilkopf, der Oozytenkern mit einem Stern und rudimentäre Ringkanäle sind mit Pfeilen markiert. Anterior ist links. Der Maßstab entspricht 20µm.

Auch die Detektion von Proteinen, die an Tyrosinen phosphoryliert sind, zeigt in FRT-Kontrollkeimbahnklonen, genau wie in der Literatur beschrieben (Lu et al., 2004), eine spezifische Färbung der Ringkanäle in der Keimbahn. In Abbildung 3.11B sind diese Proteine in blau dargestellt und durch Pfeile markiert.

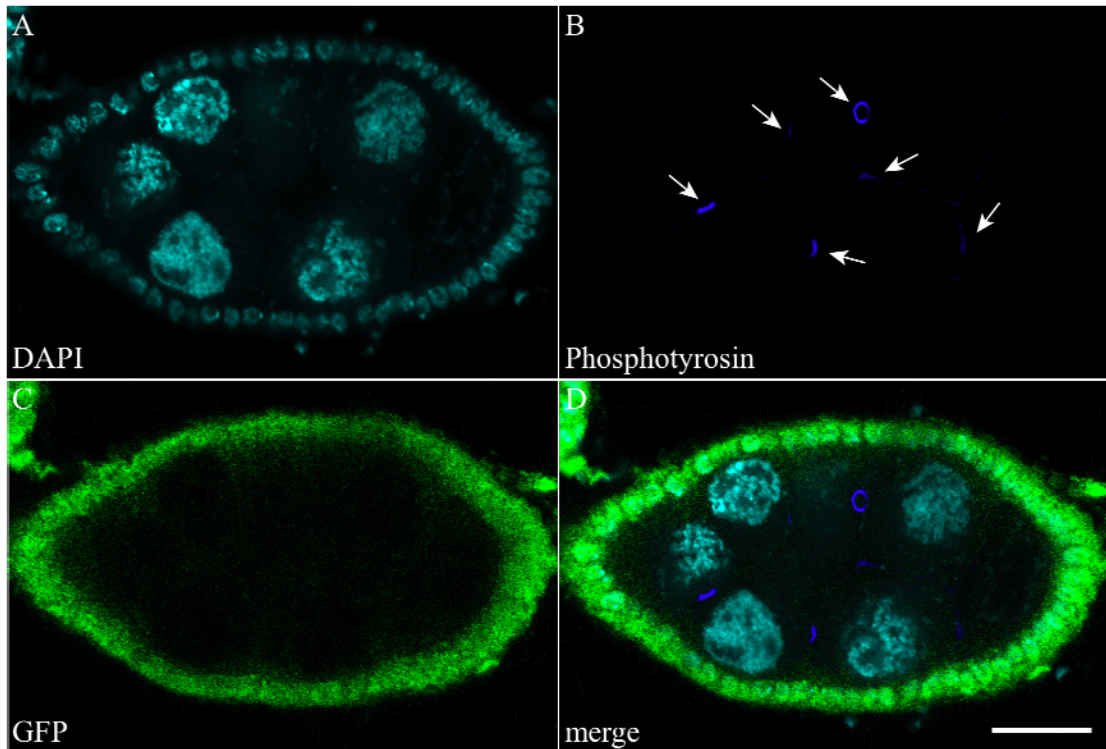


Abbildung 3.11: **Wildtypische Lokalisierung von Tyrosin-phosphorylierten Proteinen in FRT-Kontrollkeimbahnklonen.** Gezeigt ist DAPI in türkis (A), Phosphotyrosin in blau (B), GFP in grün (C) und die Überlagerung der einzelnen Kanäle (D). Pfeile weisen auf die spezifische Färbung der Ringkanäle in der Keimbahn hin. Anterior ist links. Der Maßstab entspricht 20 μ m.

Im Gegensatz zu den FRT-Kontrollkeimbahnklonen sind in den Keimbahnklonen für das mutante *rngo*-Allel Proteine, die an Tyrosinen phosphoryliert sind, fehllokalisiert. Die sich sonst auf die Ringkanäle beschränkende Färbung ist, wie in Abbildung 3.12B zu erkennen, über die gesamte Plasmamembran der Keimbahnzellen verteilt. Auch hier können nur noch rudimentäre Ringkanäle beobachtet werden (Pfeile in B).

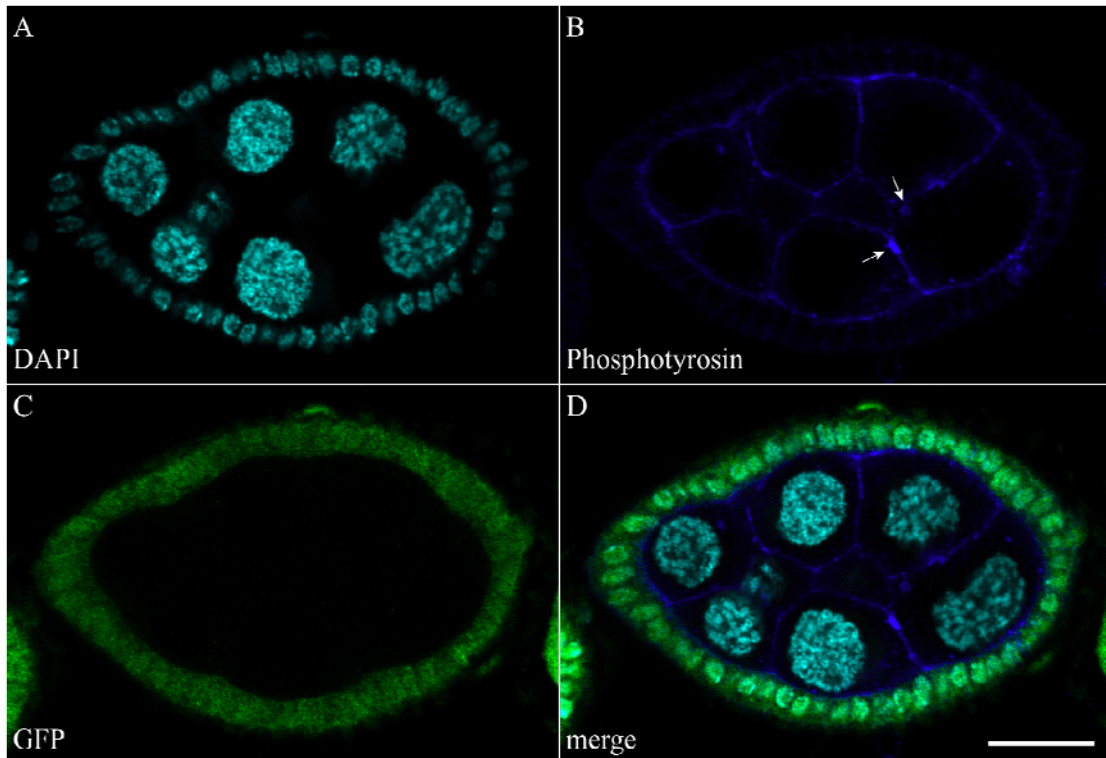


Abbildung 3.12: Keimbahnklone des mutanten *rngo*-Allels zeigen eine Fehllokalisierung von Proteinen, die an Tyrosinen phosphoryliert sind, sowie rudimentäre Ringkanäle. Gezeigt ist DAPI in türkis (A), Phosphotyrosin in blau (B), GFP in grün (C) und die Überlagerung der einzelnen Kanäle (D). Die Färbung von Phosphotyrosin beschränkt sich nicht nur auf die Ringkanäle, sondern ist über die gesamte Plasmamembran der Keimbahnzellen verteilt. Rudimentäre Ringkanäle sind in B mit Pfeilen markiert. Anterior ist links. Der Maßstab entspricht 20µm.

Da sich in *rngo*-Keimbahnklonen mehrere Nährzellkerne im Bereich der Oozyte befinden, sollte untersucht werden, ob bei diesen Klonen die initiale Determinierung der Oozyte korrekt verläuft, oder ob sich von Anfang an mehrere Zellkerne in der Oozyte befinden. Abbildung 3.13 zeigt einen Kontrollkeimbahnklon, in dem die Orb-Färbung spezifisch die Oozyte anfärbt (blau in B) (Christerson und McKearin, 1994). In der Überlagerung lokalisiert Orb nur in dem Bereich, der das Karyosom enthält.

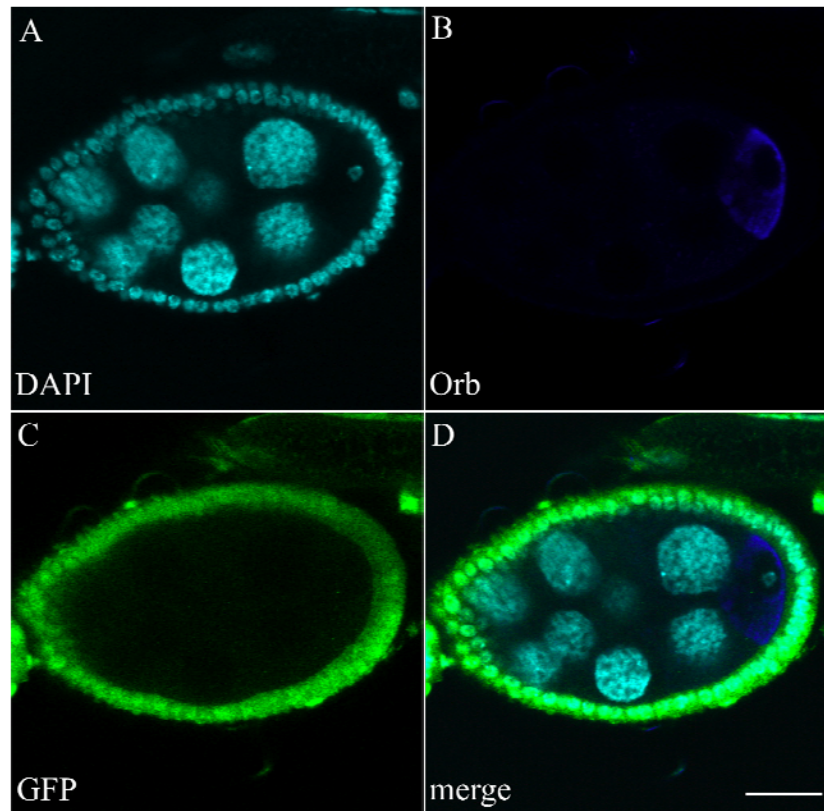


Abbildung 3.13: **Wildtypische Lokalisierung von Orb in FRT-Kontrollkeimbahnklonen.** Gezeigt ist DAPI in türkis (A), Orb in blau (B), GFP in grün (C) und die Überlagerung der einzelnen Kanäle (D). Ein Kontrollkeimbahnklon zeigt eine spezifische Färbung für Orb, welche ausschließlich die Oozyte markiert. Anterior ist links. Der Maßstab entspricht 20µm.

Auch in Keimbahnklonen für das mutante *rngo*-Allel wurde die Oozyte korrekt determiniert (Abbildung 3.14). In Abbildung 3.14A-E ist eine junge Eikammer abgebildet, bei der sich die Orb-Färbung wie im Wildtyp auf die Oozyte beschränkt (B). Der Oozytenkern ist durch einen Stern markiert. Die Färbung für F-Aktin in C zeigt einen Bereich der Plasmamembran, in dem sich kein Signal für F-Aktin detektieren lässt (Pfeil). Hier beginnt vermutlich die Degenerierung der Plasmamembran, welche die Oozyte von der daneben liegenden Nährzelle trennt. Abbildung 3.14F-J zeigt eine ältere Eikammer, bei der sich im Bereich der Oozyte zusätzlich zum Oozytenkern (Stern) ein Nährzellkern befindet (Pfeilkopf), sowie eine weitere Nährzellen-Fusion im anterioren Teil der Eikammer (Pfeilkopf in F und J). Der posteriore Bereich, in dem eine Zellfusion stattgefunden hat, stellt die ehemalige Oozyte dar, da dieser ebenfalls die Orb-Färbung (G) aufweist. In H sind zwei Zellen markiert (Pfeile), die nicht mehr durch eine Plasmamembran getrennt sind, da hier keine Färbung für F-Aktin erkennbar ist.

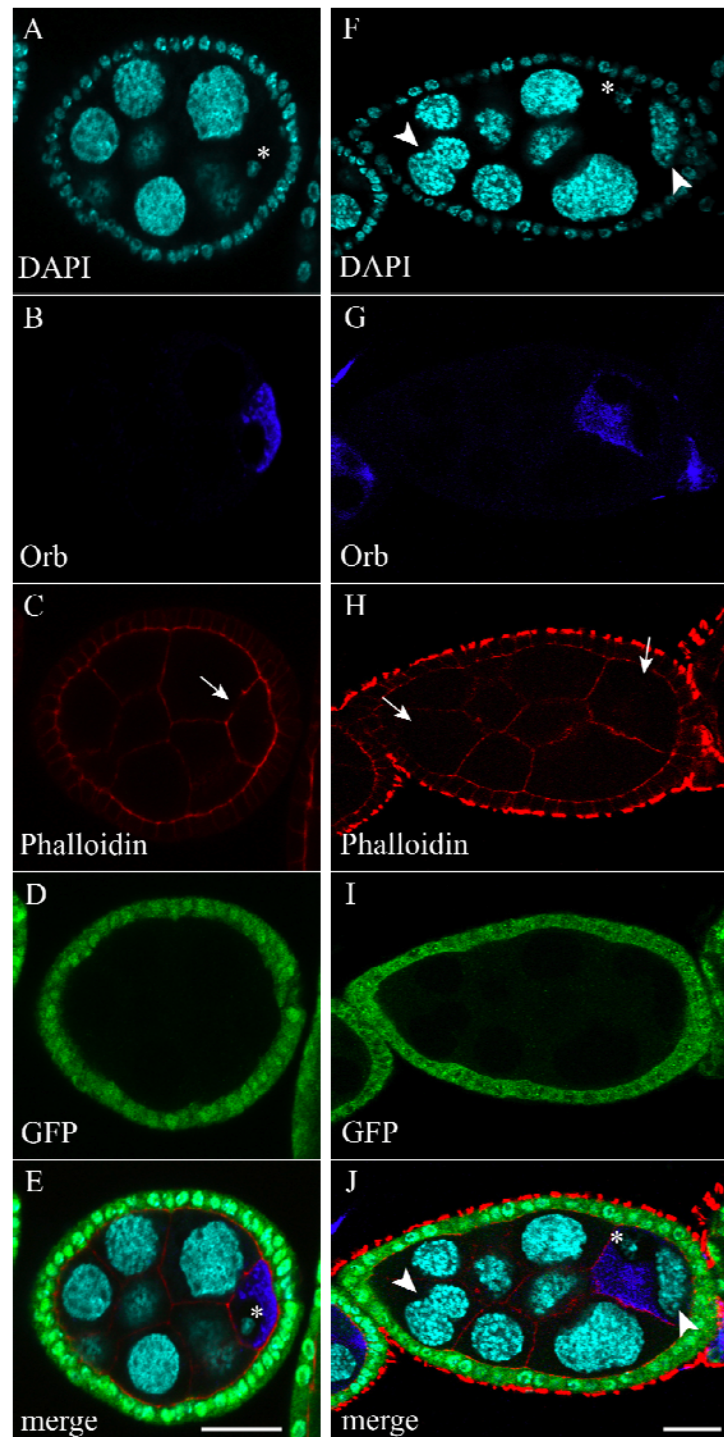


Abbildung 3.14: **Keimbahnklone des mutanten *rngo*-Allels zeigen eine korrekte Determinierung der Oozyte.** Gezeigt ist DAPI in türkis (A und F), Orb in blau (B und G), Phalloidin in rot (C und H), GFP in grün (D und I) und die Überlagerung der einzelnen Kanäle (E und J). In der jungen Eikammer (A-E) beschränkt sich die Orb-Färbung ausschließlich auf die Oozyte. In C zeigt ein Bereich einer Plasmamembran keine Färbung für F-Aktin (Pfeil). Die Bilder F-J veranschaulichen eine ältere Eikammer, bei der sich im Bereich der Oozyte zusätzlich zum Karyosom (Stern) ein Nährzellkern befindet (Pfeilkopf). Weiter anterior ist ebenfalls eine Zelle mit zwei Nährzellkernen zu beobachten (Pfeilkopf). In H sind durch Pfeile die Keimbahnzellen markiert, in denen sich zwei Zellkerne befinden. Anterior ist links. Der Maßstäbe entsprechen 20µm.

Abbildung 3.15 zeigt einen *rngo*-mutanten Keimbahnklon, bei dem sich im Bereich der Oozyte (Orb, blau in B und E) ektopische F-Aktin Akkumulationen erkennen lassen (C). Auch hier ist ein Nährzellkern in die Oozyte eingewandert.

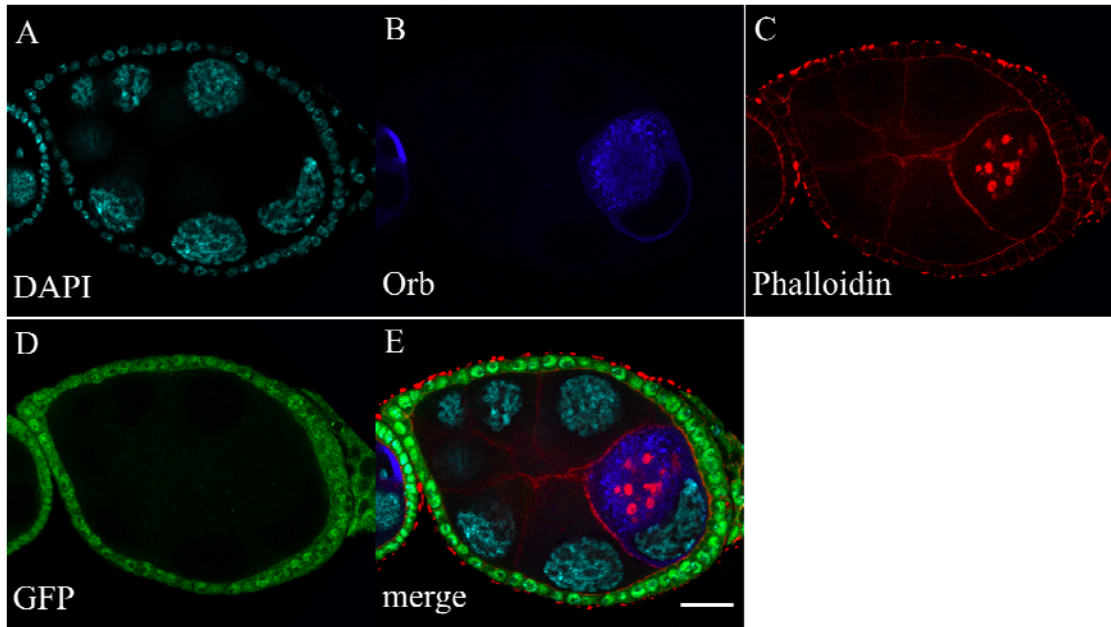


Abbildung 3.15: Keimbahnklone des mutanten *rngo*-Allels zeigen ektopische F-Aktin Akkumulationen im Bereich der Oozyte. Gezeigt ist DAPI in türkis (A), Orb in blau (B), Phalloidin in rot (C), GFP in grün (D) und die Überlagerung der einzelnen Kanäle (E). In E sind ektopische F-Aktin Akkumulationen im Bereich der Oozyte zu erkennen. Anterior ist links. Der Maßstab entspricht 20µm.

3.5.1.2 Keimbahnklone des mutanten *rngo*-Allels zeigen keine Fehllokalisierung von monomeren Aktinuntereinheiten (G-Aktin)

Da in *rngo*-Keimbahnklonen eine Fehlverteilung von filamentösem Aktin beobachtet werden konnte, wurde als nächstes die Lokalisierung von monomeren Aktinuntereinheiten untersucht. In FRT-Kontrollkeimbahnklonen zeigt eine Antikörperfärbung gegen G-Aktin ein spezifisches Signal, welches den Oozytenkern (Stern) umgibt (Abbildung 3.16B und E) (Djagaeva et al., 2005). F-Aktin lokalisiert an den Ringkanälen sowie an der Plasmamembran der Keimbahn- und der Follikelzellen (Abbildung 3.16C).

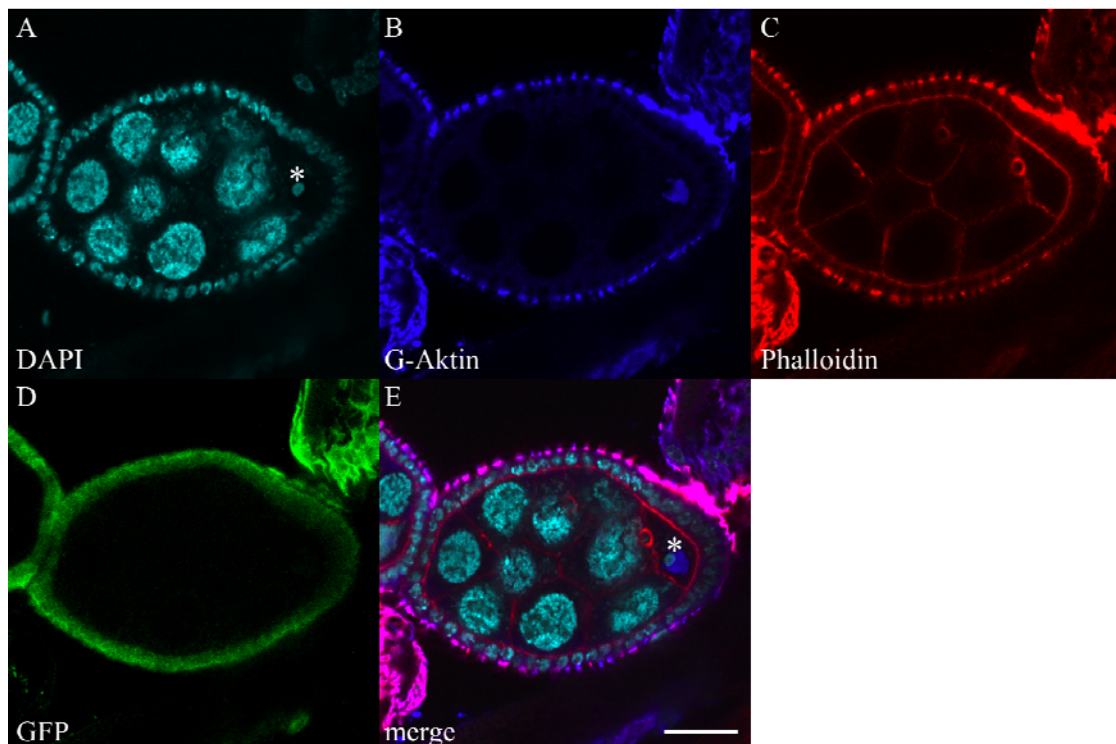


Abbildung 3.16: **Wildtypische Lokalisierung von G-Aktin in FRT-Kontrollkeimbahnklonen.** Gezeigt ist DAPI in türkis (A), G-Aktin in blau (B), Phalloidin in rot (C), GFP in grün (D) und die Überlagerung der einzelnen Kanäle ohne GFP (E). G-Aktin akkumuliert nur im Bereich des Oozytenkerns (Stern), wohingegen F-Aktin eine Färbung an den Ringkanälen und der Plasmamembran der Keimbahn- und Follikelzellen zeigt. Anterior ist links. Der Maßstab entspricht 20µm.

Im Vergleich zu den Kontrollklonen weisen *rngo*-Keimbahnklone keine Veränderung in der Lokalisierung von G-Aktin auf (Abbildung 3.17B). G-Aktin ist auch hier in einem Bereich, der den Oozytenkern (Stern) umgibt, zu sehen. F-Aktin hingegen zeigt

die bereits beschriebene Fehlverteilung als ektopisches F-Aktin im Zytoplasma der Keimbahnzellen (Pfeile in C). Die Pfeilköpfe in E weisen auf Zellen hin, in denen sich wiederum zwei Nährzellkerne befinden.

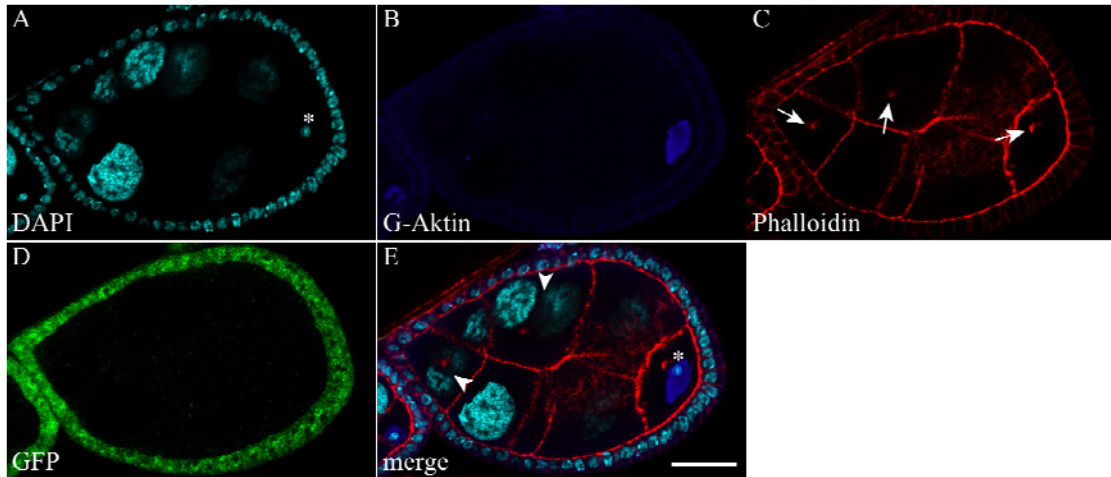


Abbildung 3.17: **Keimbahnklone des mutanten *rngo*-Allels zeigen keine Veränderung in der Lokalisierung von G-Aktin.** Gezeigt ist DAPI in türkis (A), G-Aktin in blau (B), Phalloidin in rot (C), GFP in grün (D) und die Überlagerung der einzelnen Kanäle ohne GFP (E). Wie im Wildtyp markiert G-Aktin einen Bereich in der Oozyte, der den Oozytenkern (Stern) umgibt. F-Aktin hingegen zeigt die bereits beschriebenen ektopischen F-Aktin Akkumulationen (Pfeile). Außerdem ist die Degeneration der Plasmamembran (Pfeilköpfe) von Keimbahnzellen zu beobachten. Anterior ist links. Der Maßstab entspricht 20µm.

3.5.1.3 Keimbahnklone des mutanten *rngo*-Allels zeigen keine apoptotischen Merkmale

Wie bereits erwähnt degenerieren Eikammern, die homozygot für das mutante *rngo*-Allel sind, noch vor dem Stadium 10 der Oogenese. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob in diesen Ovarien Apoptose nachgewiesen werden kann. Für die Detektierung des programmierten Zelltodes wurden Färbungen mit TUNEL (Kapitel 2.4.3) durchgeführt. Abbildung 3.18 zeigt einen FRT-Kontrollkeimbahnklon. Die Zellkerne der Keimbahn weisen eine wildtypische Morphologie auf, wohingegen bei apoptotischen Zellen die Zellkerne meist kondensiert sind. In Abbildung 3.18 ist eine Follikelzelle mit apoptotischen Merkmalen zu erkennen. Bei dieser Zelle ist der Zellkern kondensiert und die Behandlung mit TUNEL zeigt ein deutliches Signal (rot in B).

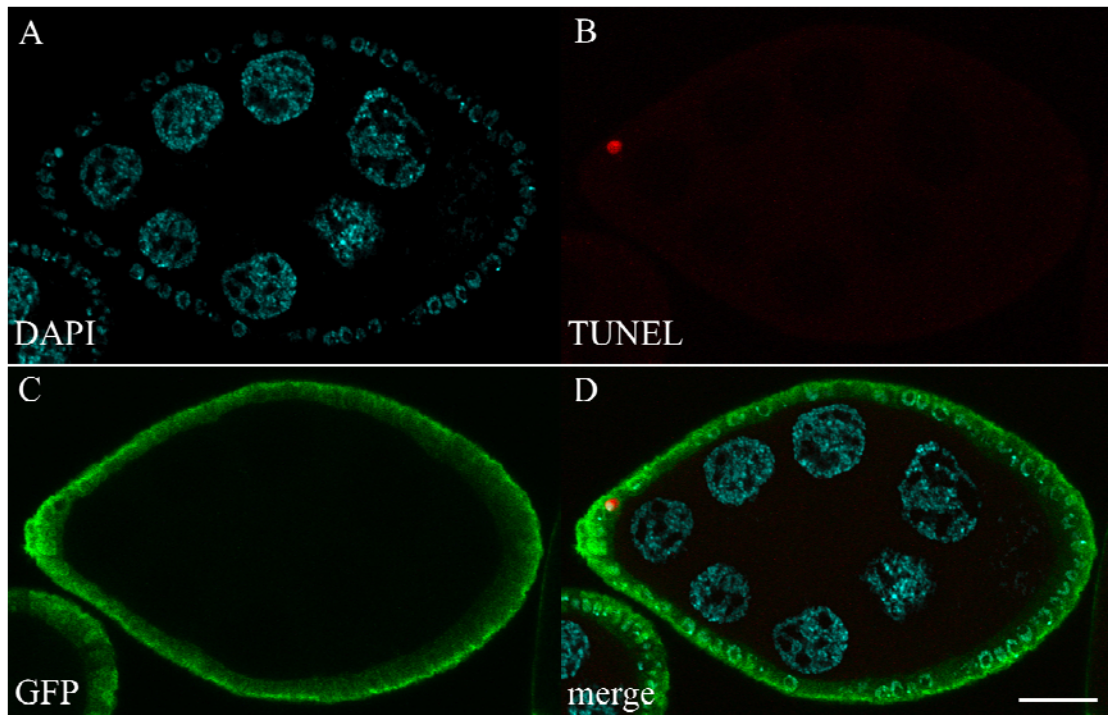


Abbildung 3.18: **FRT-Kontrollkeimbahnklone weisen keine Apoptose in der Keimbahn auf.** Gezeigt ist DAPI in türkis (A), TUNEL in rot (B), GFP in grün (C) und die Überlagerung der einzelnen Kanäle (D). Die Keimbahnzellen sind nicht apoptotisch. Eine Follikelzelle besitzt apoptotische Merkmale, da sie einen kompakten Zellkern besitzt und eine deutliche TUNEL-Färbung zeigt. Anterior ist links. Der Maßstab entspricht 20µm.

Abbildung 3.19 stellt zwei *rngo*-Keimbahnklone dar, bei denen die Zellkerne nicht kondensiert sind und die Färbung mit dem TUNEL-Kit kein Signal zeigt. Auch die in der Abbildung vorhandenen heterozygoten Eikammern (unten links im Bild) haben eine wildtypische Morphologie. Da auch wildtypische Eikammern in einigen Fällen im Stadium 7-8 der Oogenese Apoptose zeigen, konnten hier degenerierende heterozygote Eikammern (unten rechts im Bild) als interne Kontrolle verwendet werden (McCall, 2004). Dieses degenerative Gewebe zeigt typisch apoptotische Merkmale. Hier kann man kondensierte Zellkerne und eine Färbung mit dem TUNEL-Kit verzeichnen. Der programmierte Zelltod im Stadium 7-8 in wildtypischen Eikammern ist häufig eine Reaktion auf Entkräftung durch zu wenig Nahrung und Stress durch zytotoxische Substanzen (McCall, 2004). Keimbahnklone des mutanten *rngo*-Allels weisen also keine Apoptose auf.

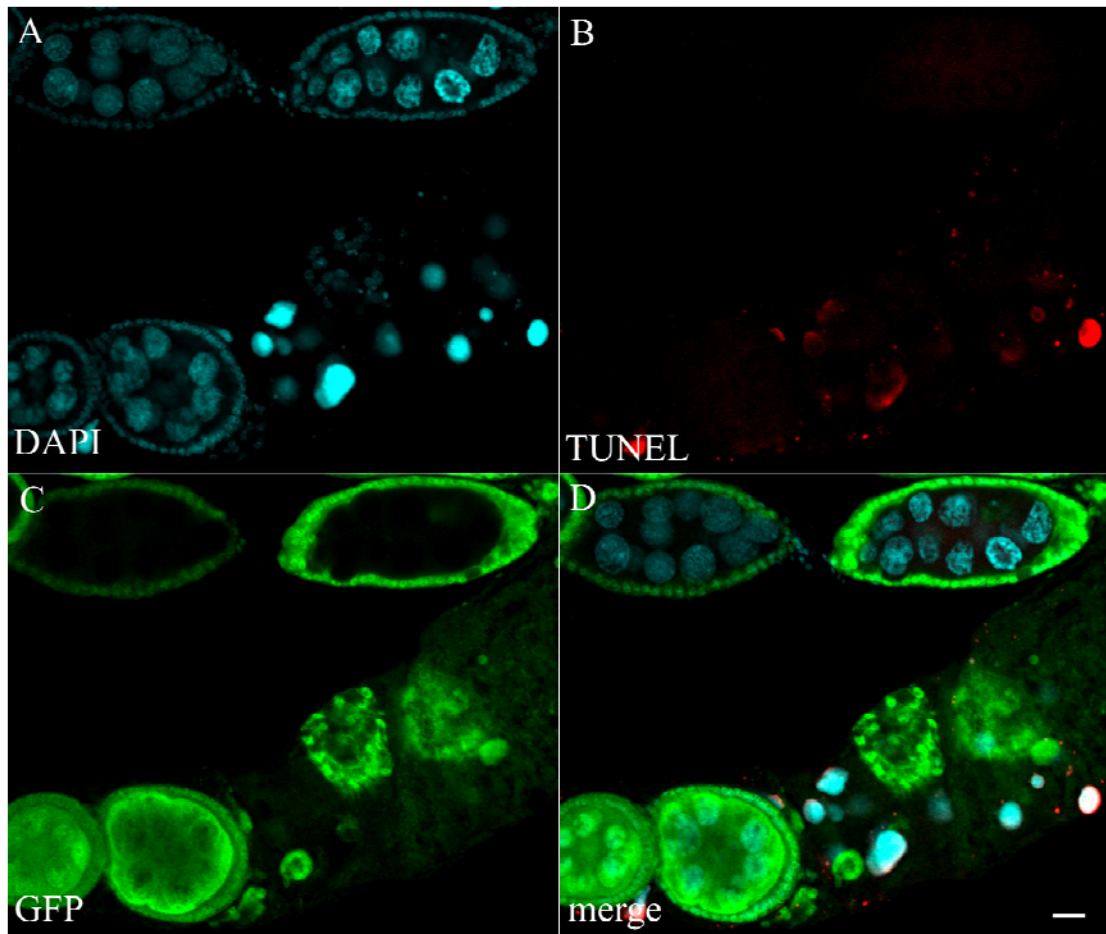


Abbildung 3.19: **Keimbahnklone des mutanten *rngo*-Allels weisen keine Apoptose auf.** Gezeigt ist DAPI in türkis (A), TUNEL in rot (B), GFP in grün (C) und die Überlagerung der einzelnen Kanäle (D). Im Gegensatz zu dem degenerierten Gewebe zeigen Keimbahnklone des mutanten *rngo*-Allels, sowie heterozygote Eikammern, keine Apoptose. Anterior ist links. Der Maßstab entspricht 20µm.

3.5.1.4 Keimbahnklone des mutanten *rngo*-Allels zeigen eine atypische Morphologie des Oozytenkerns und der Nährzellkerne

Wie schon in Abbildung 3.10A veranschaulicht wurde, zeigen Zellkerne der Oozyte und der Nährzellen von *rngo*-Keimbahnklonen eine atypische Morphologie. Der markierte Nährzellkern in Abbildung 3.10A ist unverhältnismäßig groß und der Oozytenkern weist nicht mehr die kompakte Struktur des Karyosoms auf. Abbildung 3.20 zeigt eine Eikammer, die ein Mosaikklon sein könnte, da wildtypische Bereiche noch ein Signal für Rngo aufweisen (rot in B), während mutante Zellen (gestrichelter Bereich) keine Rngo- bzw. GFP-Färbung besitzen. Die Kerne dieser mutanten Zellen sind im Vergleich zu ihren benachbarten wildtypischen Zellen kleiner und

fragmentiert. Auch ist in diesem Bereich Hts-RC nicht mehr spezifisch an den Ringkanälen lokalisiert, sondern über die Plasmamembran der Keimbahnzellen verteilt. Diese fragmentierten Kerne, sowie die übergroßen Nährzellkerne in *rngo*-Keimbahnklonen (Abbildung 3.10), könnten ein Hinweis auf eine Fehlfunktion der Endoreplikation sein. Es muss jedoch angemerkt werden, dass die Eikammer in Abbildung 3.20 auch das Ergebnis einer Fusion zweier Eikammern sein könnte und somit die weiter anterior gelegenen Zellen jünger sind und deshalb kleinere Zellkerne aufweisen. Es konnten im Verlauf dieser Arbeit keine weiteren Mosaikkclone identifiziert werden, wodurch diese Abbildung ein einmaliges Phänomen widerspiegelt.

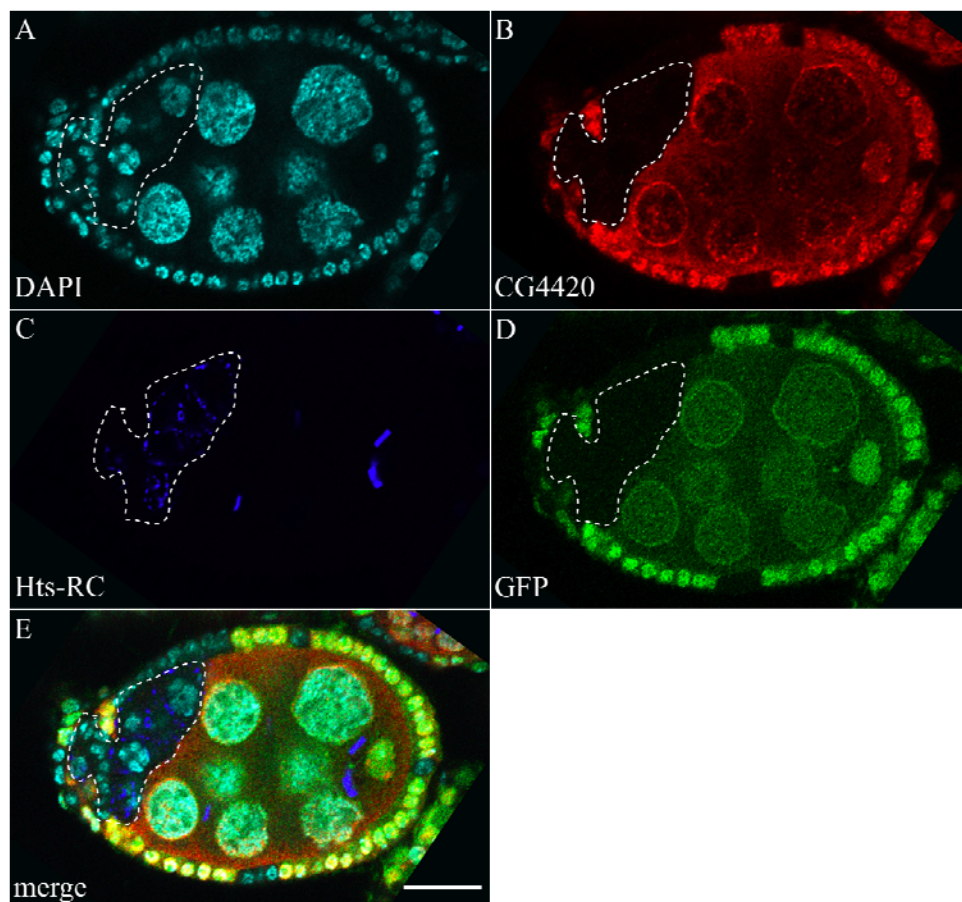


Abbildung 3.20: Ein potentieller *rngo*-Mosaikkeimbahnklon weist in den mutanten Zellen kleinere, fragmentierte Nährzellkerne auf, als im benachbarten wildtypischen Gewebe. Gezeigt ist DAPI in türkis (A), Rngo in rot (B), Hts-RC in blau (C), GFP in grün (D) und die Überlagerung der einzelnen Kanäle (E). Der mit einer gestrichelten Linie umrandete Bereich zeigt mutante Nährzellen, deren Zellkerne, im Vergleich zum benachbarten wildtypischen Gewebe kleiner und fragmentiert sind. Auch Hts-RC ist hier wie in anderen Keimbahnklonen des *rngo*-Allels über die Plasmamembran der Keimbahnzellen verteilt. Anterior ist links. Der Maßstab entspricht 20µm.

3.5.1.5 Keimbahnklone des mutanten *rngo*-Allels zeigen keine Veränderung in der Expression von Cyclin E

Da Keimbahnklone des mutanten *rngo*-Allels stark vergrößerte Nährzellkerne zeigen, stellte sich die Frage, ob die Nährzellkerne der Keimbahnklone eine erhöhte Anzahl an Endoreplikationen im Gegensatz zum Wildtyp aufweisen. Wäre dies der Fall, hätte das eine Auswirkung auf den DNA-Gehalt der Zellkerne, da mehr DNA-Synthese-Phasen ohne darauffolgende Mitose durchlaufen würden. Ein Marker für die Endoreplikation ist Cyclin E (CycE), welches den Übergang von der G_1 - in die S-Phase vermittelt (Doronkin et al., 2003). Zellkerne die eine CycE-Expression zeigen, befinden sich also in der S-Phase. Abbildung 3.21 veranschaulicht einen FRT-Kontrollkeimbahnklon und die Expression von CycE in der Keimbahn. Da die Nährzellkerne asynchron ihre DNA replizieren, zeigen immer nur einige Zellkerne eine Färbung für CycE (Pfeil in B). Die anderen Nährzellkerne befinden sich in der G_1 -Phase und exprimieren nicht CycE (Pfeilköpfe in B). Da in der Abbildung 3.21 nur ein Nährzellkern eine Färbung für CycE zeigt, bleibt zu erwähnen, dass in verschiedenen Fokusebenen auch weitere Nährzellkerne zu erkennen sind, die CycE exprimieren. Aber aufgrund des hohen unspezifischen Signals des Antikörpers konnte in den übrigen Fokusebenen kein adäquates Bild aufgenommen werden.

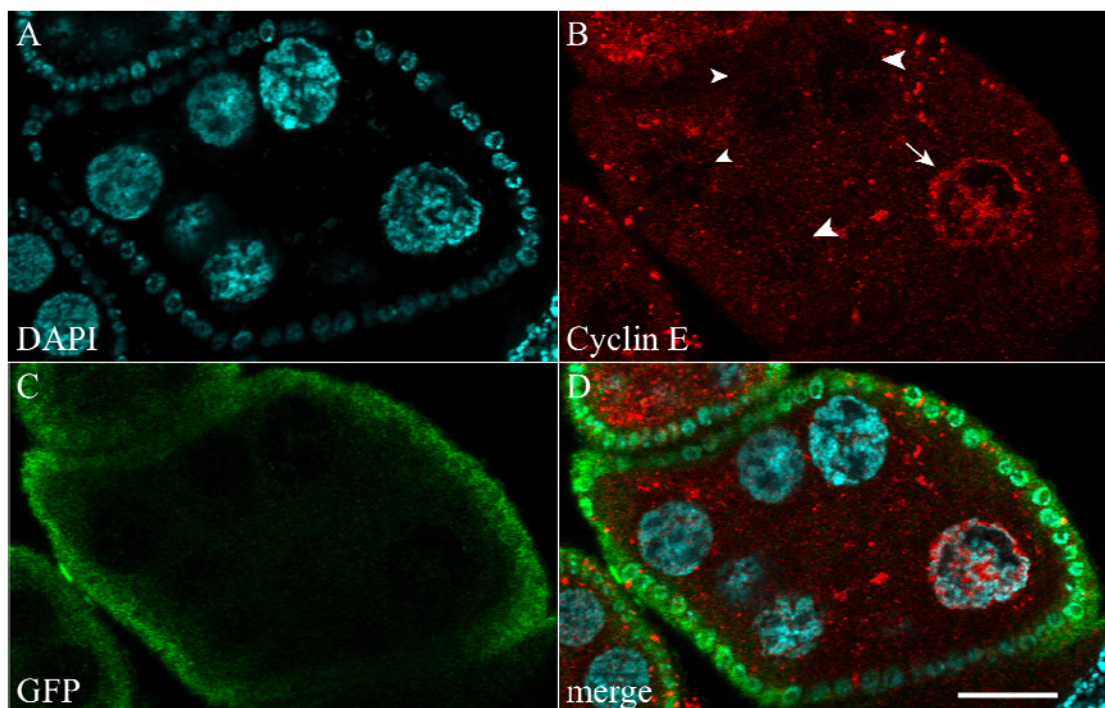


Abbildung 3.21 (vorherige Seite, 73): **Wildtypische Lokalisierung von CycE in FRT-Kontrollkeimbahnklonen.** Gezeigt ist DAPI in türkis (A), CycE in rot (B), GFP in grün (C) und die Überlagerung der einzelnen Kanäle (D). Durch einen Pfeil in B ist ein Nährzellkern markiert, der sich in der S-Phase befindet und seine DNA repliziert. Dieser exprimiert CycE. Die übrigen Nährzellkerne (Pfeilköpfe in B) befinden sich in der G₁-Phase und zeigen keine Färbung für CycE. Anterior ist links. Der Maßstab entspricht 20µm.

Auch Keimbahnklone des mutanten *rngo*-Allels zeigen Nährzellkerne, die asynchron ihre DNA replizieren. In Abbildung 3.22B sind die Nährzellkerne, die sich in der S-Phase befinden mit einem Pfeil und Nährzellkerne in der G₁-Phase mit Pfeilköpfen markiert. Durchliefen die Nährzellkerne mehr Endozyklen als im Wildtyp, würden auch mehr Zellkerne die Expression von CycE aufweisen. Dies ist hier jedoch nicht der Fall.

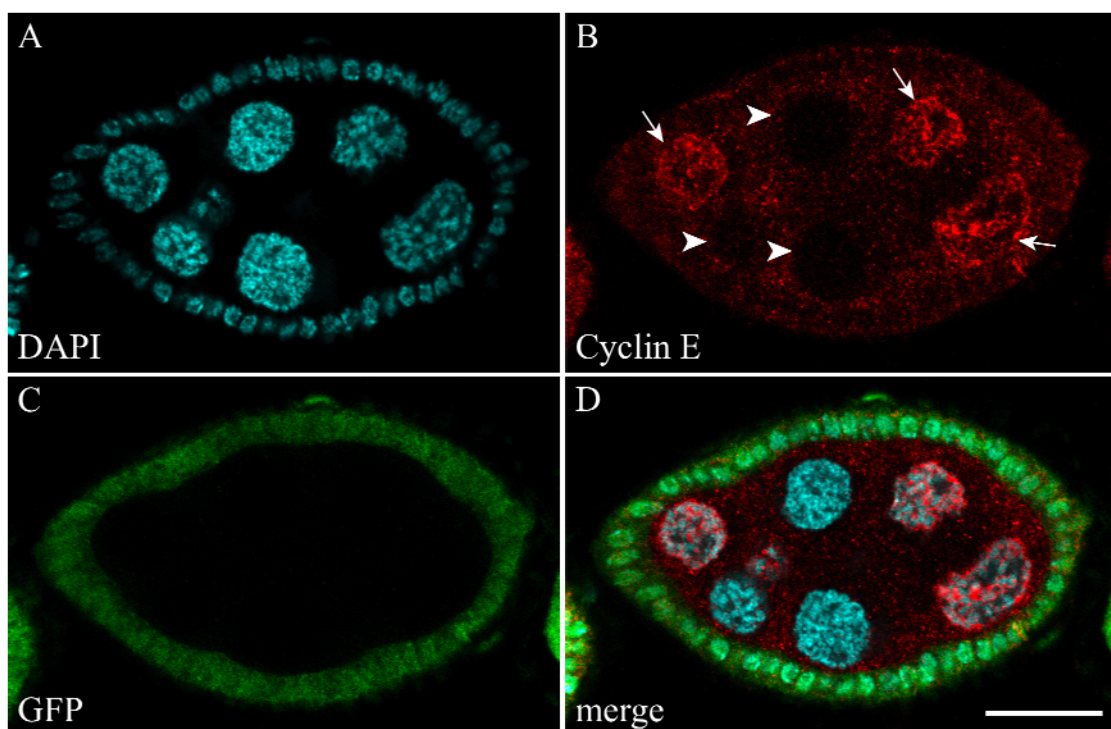


Abbildung 3.22: **Keimbahnklone des mutanten *rngo*-Allels weisen keine erhöhte Endoreplikation auf.** Gezeigt ist DAPI in türkis (A), CycE in rot (B), GFP in grün (C) und die Überlagerung der einzelnen Kanäle (D). Durch Pfeile in B sind Nährzellkerne markiert, die sich in der S-Phase befinden und ihre DNA replizieren. Diese Kerne exprimieren CycE. Die übrigen Nährzellkerne (Pfeilköpfe in B) befinden sich in der G₁-Phase und zeigen keine Färbung für CycE. Anterior ist links. Der Maßstab entspricht 20µm.

3.5.1.6 Keimbahnklone des mutanten *rngo*-Allels zeigen keine Veränderung in der Formation des Fusoms

Das Fusom wird für die Determinierung der Oozyte im 16-Zellstadium der Oogenese benötigt. Es besteht aus dicht gepackten Vesikeln, die sich vom Endoplasmatischen Retikulum ableiten. Da für das Hefehomolog (Ddi1/Vsm1) von Rngo eine Rolle im vesikulären Transport beschrieben wurde, sollte daher die Formation des Fusoms in *rngo*-Keimbahnklonen untersucht werden. Hierfür wurden Färbungen mit dem Hu-li tai shao-Fusom (Hts-F) Antikörper durchgeführt, welcher das Fusom (Abbildung 3.23B gestrichelte Linie) und die Plasmamembran der Follikelzellen anfärbt (Petrella et al., 2007). In FRT-Kontrollkeimbahnklonen ist eine weit verzweigte Struktur zu erkennen, welche die einzelnen Zellen einer 16-Zellzyste miteinander verbindet (blau in B).

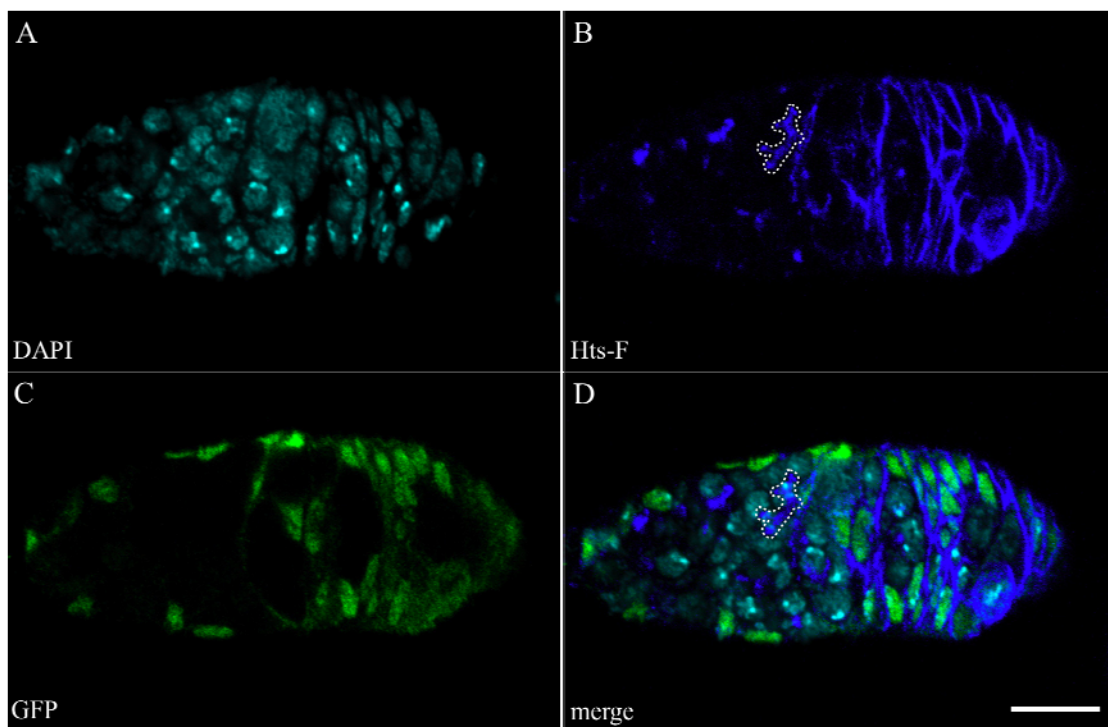


Abbildung 3.23: **Wildtypische Lokalisierung von Hts-F in FRT-Kontrollkeimbahnklonen.** Gezeigt ist DAPI in türkis (A), Hts-F in blau (B), GFP in grün (C) und die Überlagerung der einzelnen Kanäle (D). Das Fusom (gestrichelte Linie in B) ist eine weit verzweigte Struktur und verbindet die Zellen während der Zystenentwicklung miteinander. Anterior ist links. Der Maßstab entspricht 10µm.

Im Vergleich zu den FRT-Kontrollkeimbahnklonen zeigen auch Keimbahnklone des mutanten *mgo*-Allels eine wildtypische Formation des Fusoms. In Abbildung 3.24B veranschaulicht der Bereich innerhalb der gestrichelten Linie eine weit verzweigte Struktur, die eine spezifische Färbung für Hts-F zeigt. Dies bedeutet, dass auch in den mutanten Keimbahnzellen die Formation des Fusoms normal verläuft.

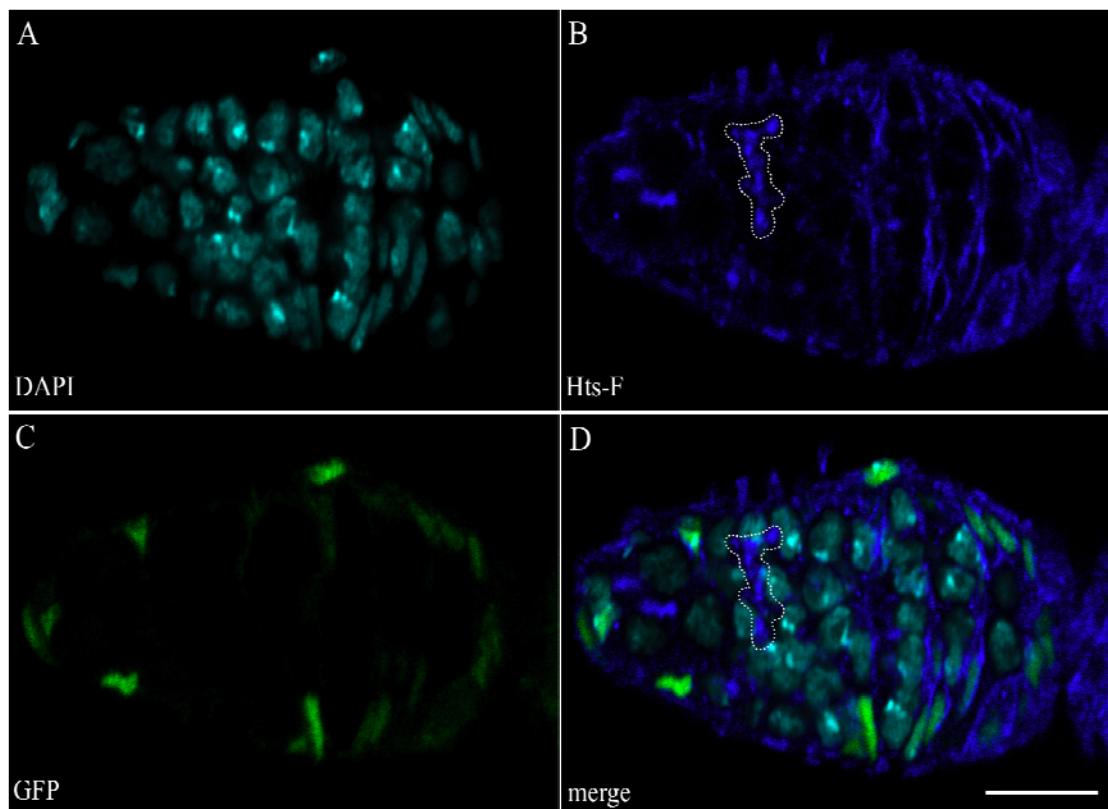


Abbildung 3.24: **Keimbahnklone des mutanten *mgo*-Allels zeigen keine Veränderung in der Formation des Fusoms.** Gezeigt ist DAPI in türkis (A), Hts-F in blau (B), GFP in grün (C) und die Überlagerung der einzelnen Kanäle (D). Das Fusom (gestrichelte Linie in B) ist eine weit verzweigte Struktur und verbindet auch in *mgo*-Keimbahnklonen die Zellen während der Zystenentwicklung miteinander. Anterior ist links. Der Maßstab entspricht 10µm.

3.6 Rngo kolokalisiert in wildtypischen Ovarien mit dem Proteasom und Ubiquitin

Ddi1/Vsm1, das Hefehomolog von Rngo, ist ein extraproteasomaler Polyubiquitinrezeptor und interagiert sowohl mit dem Proteasom als auch mit Ubiquitin. Um Aussagen über eine ähnliche Funktion von Rngo in *Drosophila* treffen

zu können, wurden Antikörperfärbungen an wildtypischen Ovarien gegen Rngo, das Proteasom und Ubiquitin durchgeführt.

In Abbildung 3.25 ist eine deutliche Kolokalisierung von Rngo und dem Proteasom zu erkennen. Abbildung 3.25B veranschaulicht die wildtypische subzelluläre Lokalisierung von Rngo. Wie zuvor erwähnt, ist Rngo zytoplasmatisch und nukleär verteilt. Eine erhöhte Färbung ist im Bereich um den Oozytenkern zu erkennen. Die Antikörperfärbung gegen das Proteasom zeigt eine ähnliche Verteilung (Abbildung 3.25C) (Adam et al., 2004). Die Lokalisierung des Proteasoms ist ebenfalls zytoplasmatisch sowie nukleär und zeigt, wie Rngo, eine erhöhte Färbung am Oozytenkern. In der Überlagerung in Abbildung 3.25D kann eine Kolokalisierung von Rngo und dem Proteasom hauptsächlich an den Nährzellkernen und dem Karyosom (gelb), aber auch an den Kernen des Follikel­epithels beobachtet werden.

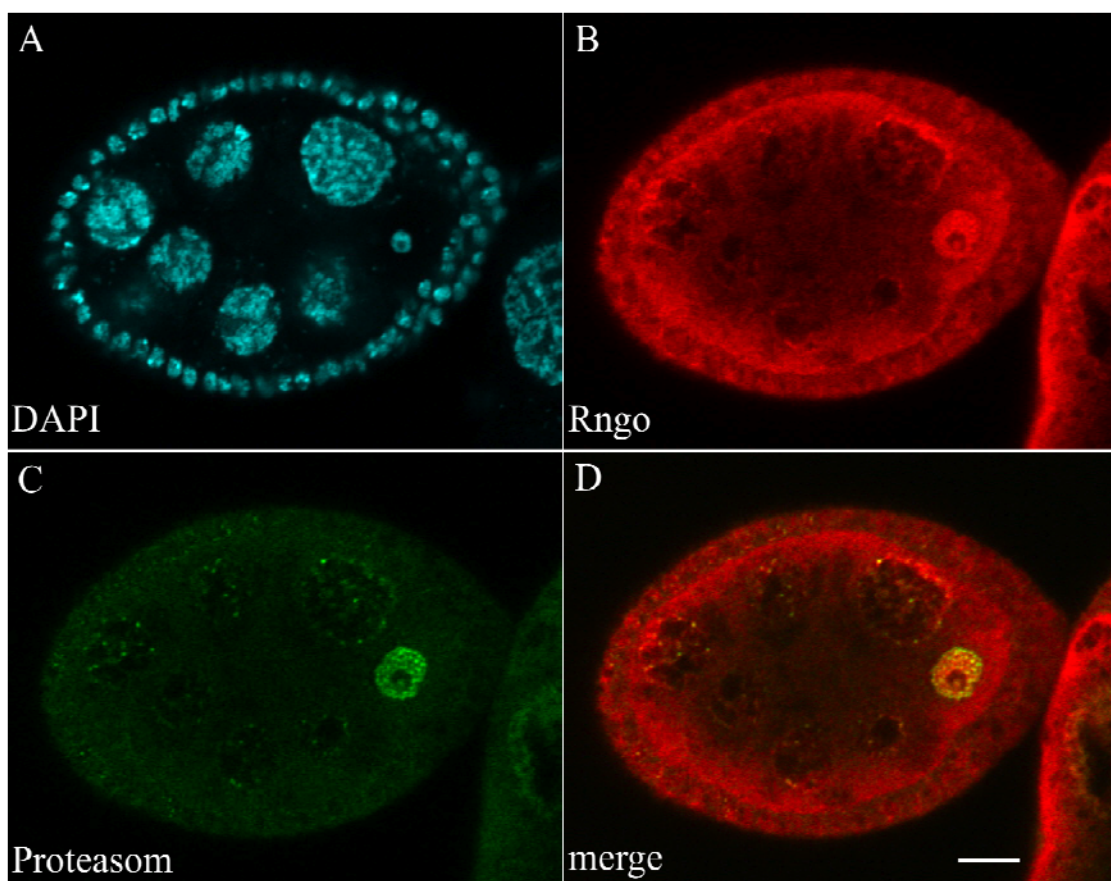


Abbildung 3.25: **Rngo kolokalisiert in wildtypischen Ovarien mit dem Proteasom.** Gezeigt ist DAPI in türkis (A), Rngo in rot (B), das Proteasom in grün (C) und die Überlagerung von B und C (D). Die Überlagerung in D zeigt eine Kolokalisierung von Rngo und dem Proteasom an den Zellkernen der Keimbahnzellen und den Zellkernen des Follikel­epithels (gelb). Anterior ist links. Der Maßstab entspricht 10µm.

Rngo kolokalisiert in wildtypischen Ovarien auch mit Ubiquitin. Wie in der Überlagerung in Abbildung 3.26D in gelb zu erkennen, kolokalisieren die beiden Proteine vornehmlich an den Zellkernen der Keimbahnzellen. Wie für Rngo und das Proteasom beschrieben (Adam et al., 2004), zeigt auch eine Antikörperfärbung gegen Ubiquitin ein starkes Signal in einem Bereich, der den Oozytenkern umgibt. Eine Färbung ist aber auch an den Nährzellkernen und im Zytoplasma zu verzeichnen.

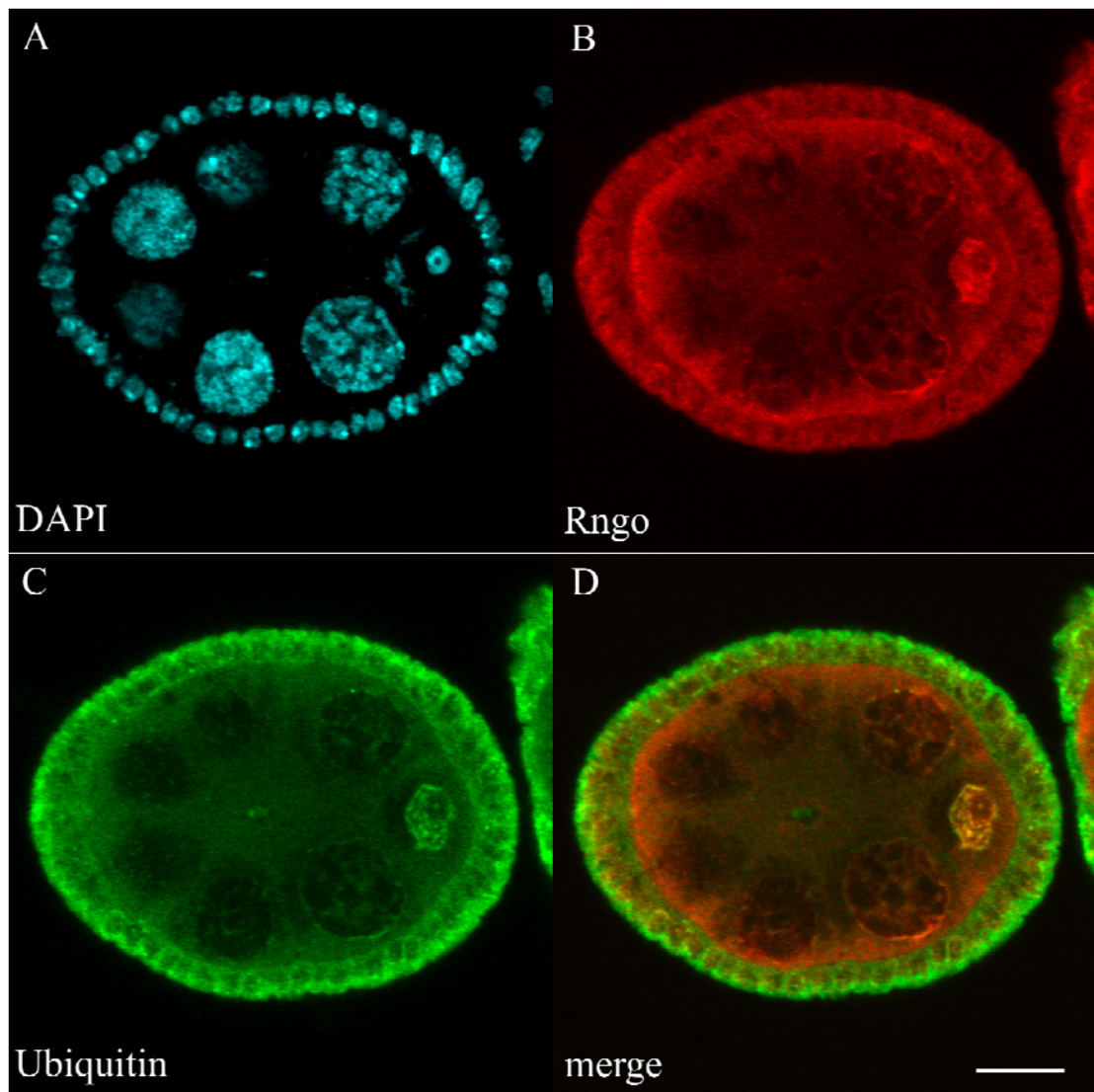


Abbildung 3.26: **Rngo kolokalisiert in wildtypischen Ovarien mit Ubiquitin.** Gezeigt ist DAPI in türkis (A), Rngo in rot (B), Ubiquitin in grün (C) und die Überlagerung von B und C (D). Die Überlagerung in D zeigt eine Kolokalisierung von Rngo und Ubiquitin an den Zellkernen der Keimbahnzellen und den Zellkernen des Follikelepithels (gelb). Anterior ist links. Der Maßstab entspricht 10 μ m.

3.7 Funktionelle Charakterisierung der vorhergesagten Proteindomänen von Rngo

Entsprechend des SMART-Algorithmus konnten in Rngo drei Proteindomänen vorhergesagt werden. N-terminal, von Aminosäure 1 bis 73, besitzt Rngo eine UBQ-Domäne (*ubiquitin-like*, UBQ), C-terminal, von Aminosäure 409 bis 447, eine UBA-Domäne (*ubiquitin-associated*, UBA) und dazwischen befindet sich von Aminosäure 236 bis 341 eine RVP-Domäne (*retroviral aspartateprotease*, RVP) (Abbildung 3.28 FL Rngo; FL = *full-length*, Vollängen). Dieselbe Domänenstruktur wurde für Ddi1/Vsm1, das Hefehomolog von Rngo beschrieben. Ddi1/Vsm1 besitzt ein potentiell katalytisches Zentrum in der RVP-Domäne an Position D220. Es wird vermutet, dass nach der Homodimerisierung von Ddi1/Vsm1 die beiden Aspartate der Dimere an der Position 220 das katalytische Zentrum bilden, welches ein für die Proteolyse benötigtes aktiviertes Wassermolekül trägt. Homologie-Vergleiche von Rngo und Ddi1/Vsm1 zeigen, dass sich das potentielle katalytische Zentrum von Rngo in der konservierten RVP-Domäne an Position D257 befindet. Abbildung 3.27 veranschaulicht einen Sequenzvergleich der RVP-Domänen von Rngo und Ddi1/Vsm1. Gelb unterlegt sind die Aminosäuren, die in beiden Sequenzen identisch sind. Aminosäure 257 in *Drosophila* und Aminosäure 220 in der Hefe (roter Kasten) stellen das potentielle katalytische Zentrum dar.

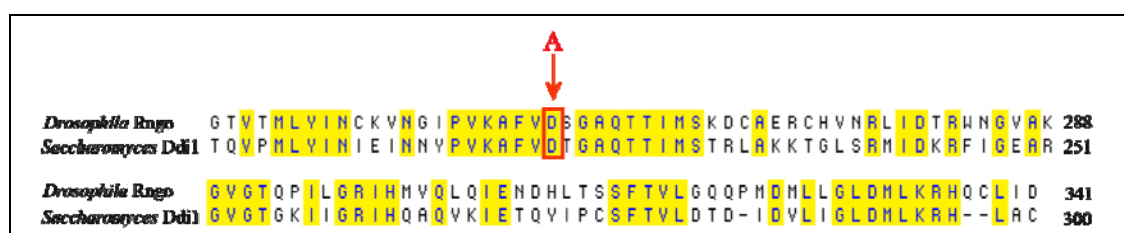


Abbildung 3.27: Sequenzvergleich der RVP-Domänen von Rngo und Ddi1/Vsm1. Gelb unterlegt sind die Aminosäuren, die in Rngo und Ddi1/Vsm1 identisch sind. Der rote Kasten zeigt das Aspartat in beiden Sequenzen, welches das potentielle katalytische Zentrum darstellt. Ein Aminosäureaustausch von einem Aspartat zu einem Alanin soll diese katalytische Funktion inhibieren.

Um eine Aussage über die Funktion der einzelnen Proteindomänen von Rngo treffen zu können, wurden verschiedene Deletionskonstrukte von Rngo mit unterschiedlichen Tags (GST und MBP) hergestellt, in *E. coli* exprimiert und anschließend aufgereinigt

(Kapitel 2.3.5). Abbildung 3.28 gibt einen Überblick über diese Konstrukte. Es wurde das Volllängenprotein (FL Rngo), Einzeldelationen der Proteindomänen (Δ UBQ, Δ RVP und Δ UBA), Doppeldeletionen dieser Proteindomänen (Δ UBQ Δ UBA, Δ UBQ Δ RVP und Δ RVP Δ UBA) und eine Punktmutation (D257A), die zu einem Aminosäureaustausch von D257 zu A257 führt (Abbildung 3.27), verwendet. Dieser Aminosäureaustausch von einem Aspartat zu einem Alanin soll die potentielle katalytische Funktion von Rngo inhibieren.

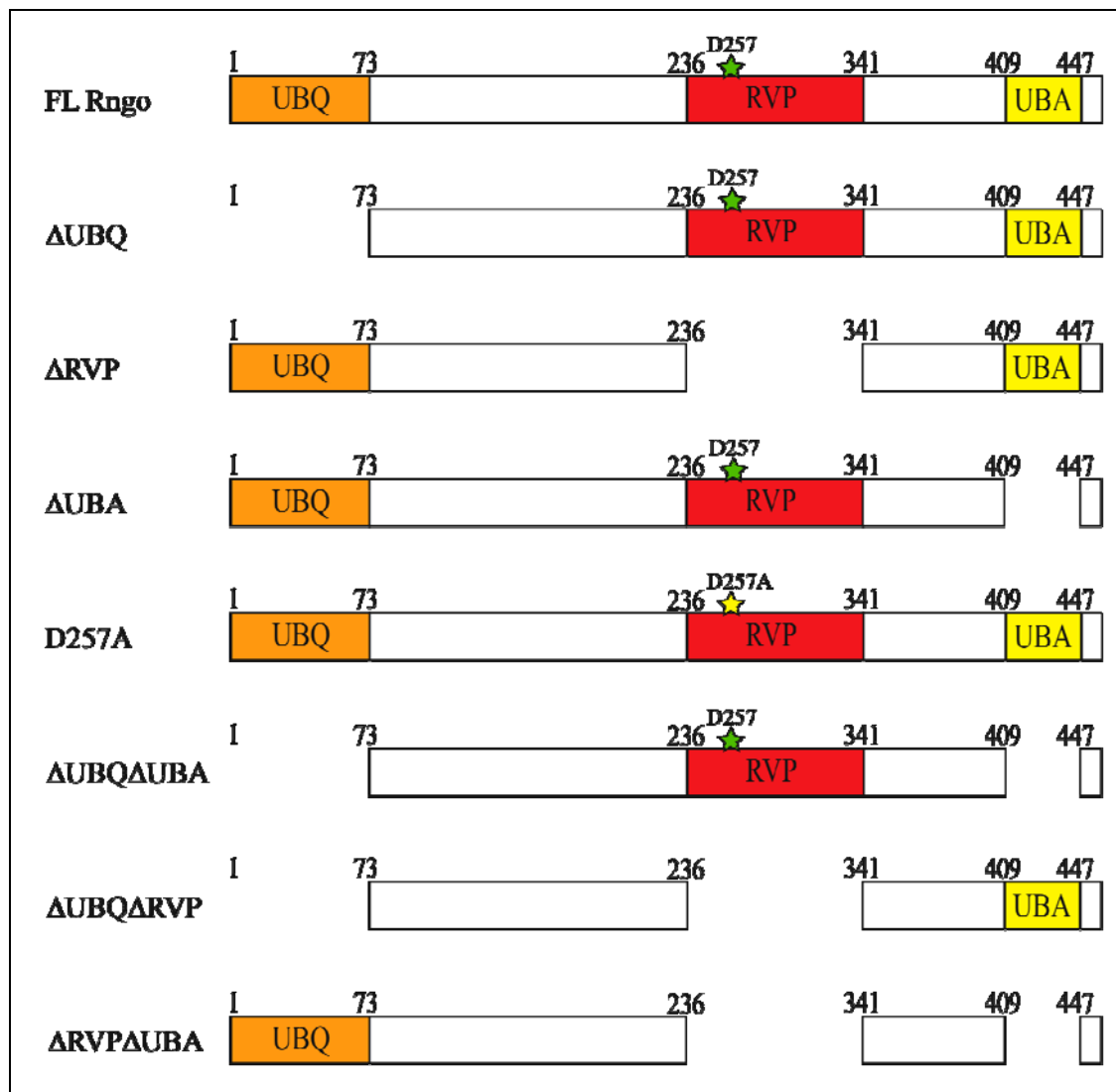


Abbildung 3.28: Übersicht über die verwendeten Rngo-Deletionskonstrukte unter Angabe der kodierten Aminosäuren. N-terminal ist links. Abkürzungen: Zahlen = kodierte Aminosäuren; FLRngo = *full-length*, Volllängen Rngo; Δ UBA = Deletion der UBA-Domäne; Δ UBQ = Deletion der UBQ-Domäne; Δ RVP = Deletion der RVP-Domäne; D257A = Aminosäureaustausch von Aspartat 257 zu Alanin; Δ UBQ Δ UBA = Doppeldeletion der UBQ- und UBA-Domäne; Δ UBQ Δ RVP = Doppeldeletion der UBQ- und RVP-Domäne; Δ RVP Δ UBA = Doppeldeletion der RVP- und UBA-Domäne.

3.7.1 Rngo bindet *in vitro* an p54, eine regulatorische Untereinheit des Proteasoms

Eine regulatorische Untereinheit des Proteasoms in *Drosophila* ist p54 (Rpn10/S5a Hefe/Mensch Orthologe). p54 erkennt polyubiquitinierte Proteine, damit diese in der katalytischen 20S Untereinheit degradiert werden können. Da Rngo die Struktur eines extraproteasomalen Polyubiquitinrezeptors aufweist und in Antikörperfärbungen mit dem Proteasom kolokalisiert, sollte getestet werden, ob Rngo mit einer regulatorischen Untereinheit des Proteasoms interagiert. Eine Datenbankanalyse (<http://www.droidb.org/>, Stand 2010) hat ergeben, dass in einem Hefe zwei-Hybrid-Screen im Labor von Finley, Rngo mit p54 interagiert. Um dieses Ergebnis biochemisch zu verifizieren, wurde ein GST-Pulldown mit GST-FLRngo und MBP-p54 durchgeführt (Kapitel 2.3.6). Abbildung 3.29 verdeutlicht das Ergebnis dieses GST-Pulldowns.

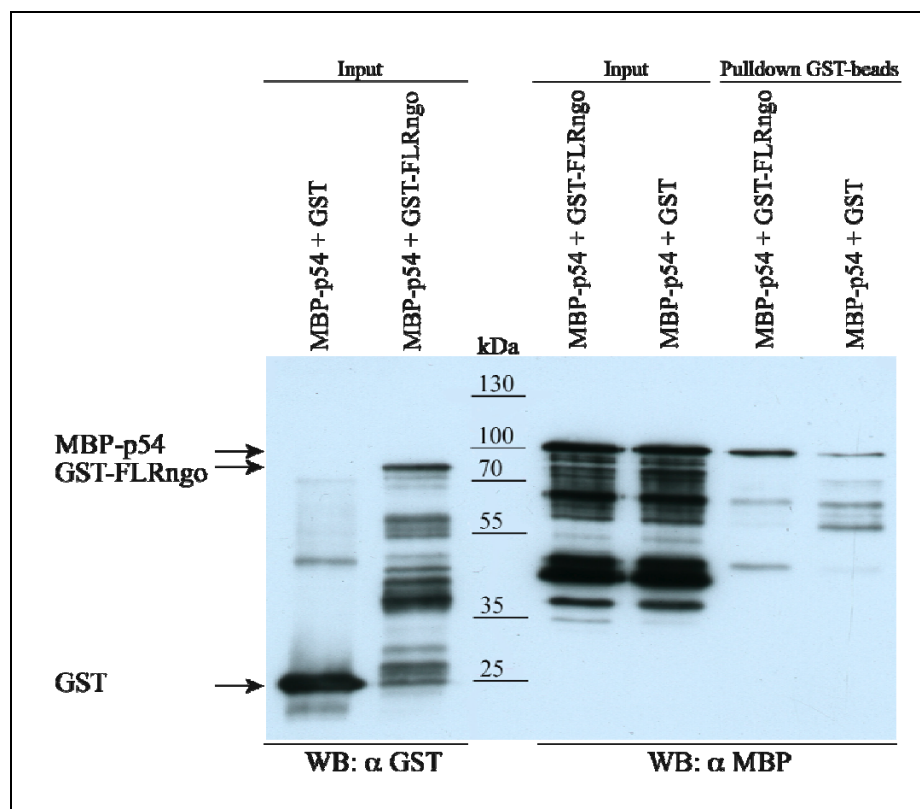


Abbildung 3.29: **Rngo bindet *in vitro* an p54.** In einem GST-Pulldown mit GST-FLRngo und MBP-p54 wurde GST-FLRngo mit Glutathion-Sepharose-Beads präzipitiert und es konnte MBP-p54 in einem Western Blot nachgewiesen werden. In der Negativkontrolle wurde GST zusammen mit MBP-p54 präzipitiert. Auch hier konnte MBP-p54 nachgewiesen werden, was auf eine unspezifische Bindung von MBP-p54 an GST schließen lässt. Der Unterschied der beiden Banden ist jedoch so groß, dass man trotz einer geringen unspezifischen Bindung eine Interaktion von Rngo und p54 annehmen kann.

Es konnte gezeigt werden, dass nach einer Präzipitation von GST-FLRngo mit Glutathion-Sepharose-Beads MBP-p54 mittels eines Western Blots nachgewiesen werden konnte. Auf dem Western Blot ist eine Bande bei ca. 100 kDa zu erkennen, die dem Molekulargewicht von MBP-p54 entspricht. Dies bedeutet, dass Rngo *in vitro* an p54 binden kann. Als Negativkontrolle wurde aufgereinigtes GST zusammen mit MBP-p54 präzipitiert. Auch hier kann man eine Bande bei ca. 100 kDa erkennen, die jedoch deutlich schwächer ist, als die Bande des Pulldowns mit GST-FLRngo und MBP-p54. MBP-p54 bindet also auch unspezifisch an GST. Es muss jedoch auch erwähnt werden, dass, wie im Input zu erkennen, eine höhere Konzentration von GST (ca. 23kDa) im Gegensatz zu GST-FLRngo (ca. 90kDa) eingesetzt wurde. Würden die Konzentrationen der beiden Proben angeglichen, wäre der Unterschied von der Probe zur Negativkontrolle wahrscheinlich deutlicher.

3.7.2 Die UBA-Domäne von Rngo ist notwendig und ausreichend für die Interaktion mit Ubiquitin

Da Rngo als potentieller extraproteasomaler Polyubiquitinrezeptor Ubiquitin erkennen und binden sollte und in Antikörperfärbungen mit Ubiquitin kolokalisiert, wurden Pulldown-Experimente mit Ubiquitin und den verschiedenen, in Abbildung 3.28 beschriebenen, Konstrukten von Rngo durchgeführt. Hierfür wurden Agarose-Beads der Firma *Biomol* verwendet, an die kovalent Ubiquitin gebunden ist. Zu diesen Beads wurden die rekombinanten Proteine von Rngo, markiert mit einem N-terminalen MBP-Tag, gegeben. Anschließend werden die Präzipitate weiter im Western Blot analysiert. Abbildung 3.30 zeigt die eingesetzten Proteinmengen für den Pulldown. Wenn jeweils die oberste Bande berücksichtigt wird, welche dem ungespaltenen MBP-Fusionsprotein entspricht, ist zu erkennen, dass in allen Proben nahezu dieselbe Proteinmenge eingesetzt wurde. Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass fehlende Banden darauf zurückzuführen sind, dass zu wenig Protein eingesetzt wurde und so keine Bindung an Ubiquitin detektiert werden kann. Als Negativkontrolle wurde aufgereinigtes MBP verwendet. Die Größen der eingesetzten Proteine variieren je nach den deletierten Fragmenten. Das Volllängenprotein weist eine Größe von ca. 110 kDa auf, wohingegen das kleinste Protein, mit der Doppeldeletion von $\Delta\text{UBA}\Delta\text{RVP}$, ca. 90 kDa groß ist. MBP alleine ist 40 kDa groß. Bis auf MBP zeigen alle eingesetzten Proteine eine Reihe von Abbaubanden, doch nur die oberste Bande im Western Blot entspricht dem nicht gespaltenen Protein.

In Abbildung 3.30 ist nach dem Pulldown mit Ubiquitin zu erkennen, dass nur Proteine, welche die UBA-Domäne besitzen, mit Ubiquitin interagieren. Die Negativkontrolle, das Fusionsprotein mit der Deletion der UBA-Domäne (ΔUBA), sowie die Doppeldeletionen $\Delta\text{UBA}\Delta\text{UBQ}$ und $\Delta\text{UBA}\Delta\text{RVP}$ zeigen keine Bindung an Ubiquitin. Die übrigen Proteine lassen sich durch Banden im Western Blot detektieren, die auch in den Inputs vorhanden sind. Dieses verdeutlicht auch, dass nur die UBA-Domäne, nicht aber die UBQ- oder RVP-Domäne, für die Bindung an Ubiquitin benötigt wird.

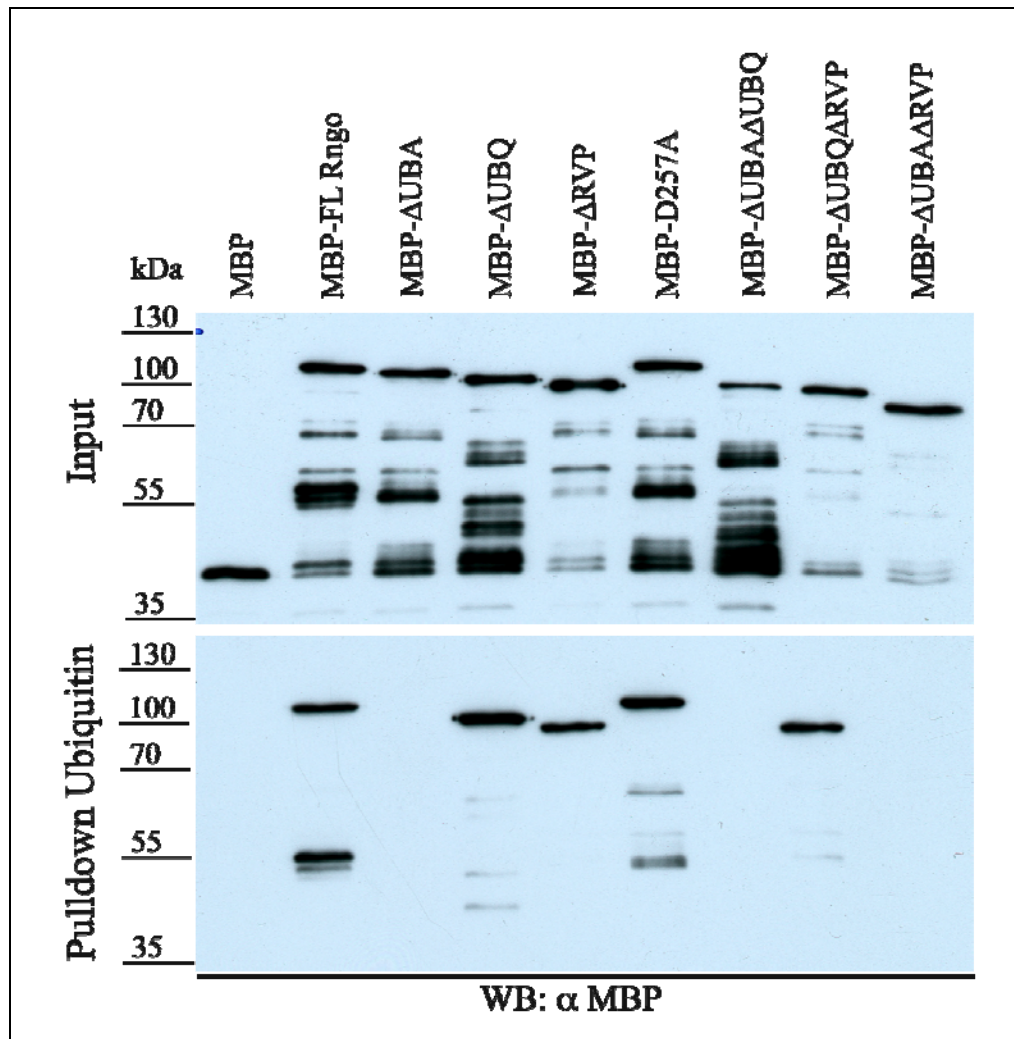


Abbildung 3.30: Die UBA-Domäne von Rngo ist notwendig und ausreichend für die Interaktion mit Ubiquitin. Die Inputs zeigen, dass in allen Proben dieselbe Proteinmenge eingesetzt wurde. Die verwendeten MBP-Fusionsproteine entsprechen denen, die in Abbildung 3.28 aufgelistet sind. Nach dem Pulldown mit Agarose-Beads, an die kovalent Ubiquitin gekoppelt ist, können nur diejenigen Proteine präzipitiert werden, welche die UBA-Domäne besitzen. In der Negativkontrolle, sowie in den Proben mit den Deletionskonstrukten (Δ UBA, Δ UBA Δ UBQ, Δ UBA Δ RVP), können keine MBP-Fusionsproteine im Präzipitat nachgewiesen werden.

3.7.3 Die Homodimerisierung von Rngo wird, unabhängig vom katalytischen Aspartat 257, durch die RVP-Domäne vermittelt

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, weisen alle charakterisierten Aspartatproteasen eine zweilobige Struktur auf, bei der zwei katalytische Aspartate zwischen den Loben lokalisiert sind. Diese tragen ein aktiviertes Wassermolekül, welches für die Peptidhydrolyse benötigt wird. Bei retroviralen Aspartatproteasen bestehen die zwei Loben aus zwei einzelnen Untereinheiten, die nach der Homodimerisierung der Proteine gebildet werden. Da Rngo eine retrovirale Aspartatprotease-Domäne besitzt, sollte in diesem Versuch untersucht werden, ob auch Rngo Homodimere bildet und welche Proteindomäne für die potentielle Homodimerisierung verantwortlich ist.

Dazu sollte mit Koimmunpräzipitationen überprüft werden, ob das Rngo-Volllängenprotein Homodimere bildet und ob diese Dimere auch bei einer Koüberexpression mit den Konstrukten Δ UBA, Δ UBQ, Δ RVP und D257A gebildet werden. Die Koüberexpression erfolgte in S2-Zellen, wobei FLRngo-GFP entweder zusammen mit FLRngo-HA, oder Δ UBA-HA, Δ UBQ-HA, Δ RVP-HA, D257A-HA unter dem Einfluß eines UASp-Promotors mittels Aktin5C-Gal4 kotransfiziert wurde. Als Negativkontrollen wurde einmal nur das jeweilige HA-markierte Konstrukt transfiziert, sowie untransfizierte S2-Zellen verwendet.

Abbildung 3.31 zeigt die Inputs der für die Koimmunpräzipitation eingesetzten Proteinextrakte. Es ist zu erkennen, dass in den kotransfizierten Proben sowohl eine Bande für FLRngo-GFP, als auch eine Bande für das jeweilige HA-markierte Protein nachweisbar ist. In den einfach transfizierten Proben kann nur eine Bande für das HA-Fusionsprotein detektiert werden. Die Proteinextrakte der untransfizierten Zellen zeigen kein Signal.

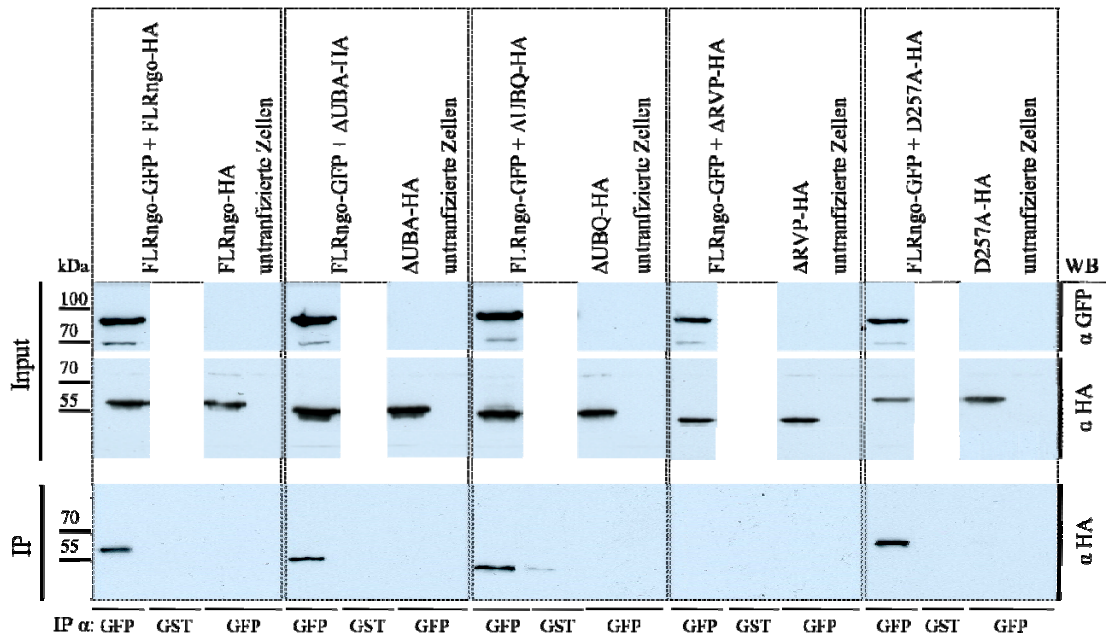


Abbildung 3.31: Die Homodimerisierung von Rngo wird, unabhängig vom katalytischen Aspartat 257, durch die RVP-Domäne vermittelt. Kotransfektionen mit einem GFP- und einem HA-markierten Fusionsprotein zeigen im Input jeweils eine spezifische Bande für diese Proteine. Einfachtransfektionen mit einem HA-Konstrukt weisen nur eine Bande im Western Blot mit einem HA-, nicht aber mit einem GFP-Antikörper, auf. In Proteinextrakten von untransfizierten S2-Zellen konnte kein Signal für GFP oder HA detektiert werden. Die Immunpräzipitation wurde mit einem Rb-GFP-Antikörper durchgeführt. Als entsprechende Negativkontrollen wurden ein Rb-GST-Antikörper, sowie einfach- und untransfizierte S2-Zellen verwendet. Die Proteinextrakte aus kotransfizierten S2-Zellen wurden aufgeteilt und damit die Immunpräzipitation mit dem Rb-GFP sowie Rb-GST Antikörper durchgeführt. Im Präzipitat können nur FLRngo-HA, Δ UBA-HA, Δ UBQ-HA und D257A-HA, jedoch nicht Δ RVP-HA nachgewiesen werden.

Der Western Blot nach der Immunpräzipitation in Abbildung 3.31B zeigt, dass mit einem Rb-GFP-Antikörper FLRngo-HA, Δ UBA-HA, Δ UBQ-HA und D257A-HA, jedoch nicht Δ RVP-HA zusammen mit FLRngo-GFP präzipitiert werden können. In den Negativkontrollen, in denen ein Rb-GST-Antikörper für die Präzipitation verwendet wurde, sowie S2-Zellen, die nur mit einem HA-markierten Fusionsprotein oder gar nicht transfiziert wurden, konnten keine Proteine präzipitiert werden. Dies bedeutet, dass Rngo Homodimere bildet und diese Dimerisierung durch die RVP-Domäne vermittelt wird. Das katalytische Aspartat 257 wird für die Dimerisierung anscheinend nicht benötigt, da das D257A-HA Fusionsprotein zusammen mit FLRngo-GFP präzipitiert werden kann.

3.7.4 Überprüfung der potentiellen retroviralen Aspartatprotease-Aktivität mittels des Protease Fluorescent Detection Kit

Da Rngo eine retrovirale Aspartatprotease-Domäne besitzt und das Protein Homodimere bildet, welche für die Aktivität der Protease benötigt werden, sollte in diesem Versuch eine potentielle proteolytische Aktivität von Rngo untersucht werden. Hiefür wurde das FITC-markierte Breitbandsubstrat Casein verwendet, das von Aspartat-, Serin-, Cystein- und Metalloproteasen gespalten wird. Eine proteolytische Aktivität kann durch ein Fluorimeter anhand von Fluoreszenzeinheiten gemessen werden. Als Positivkontrolle wurde Trypsin verwendet. Abbildung 3.32 zeigt die Ergebnisse der Messungen, nachdem das FITC-markierte Casein zusammen mit Trypsin, MBP-FLRngo, MBP- Δ RVP und MBP-D257A inkubiert wurde.

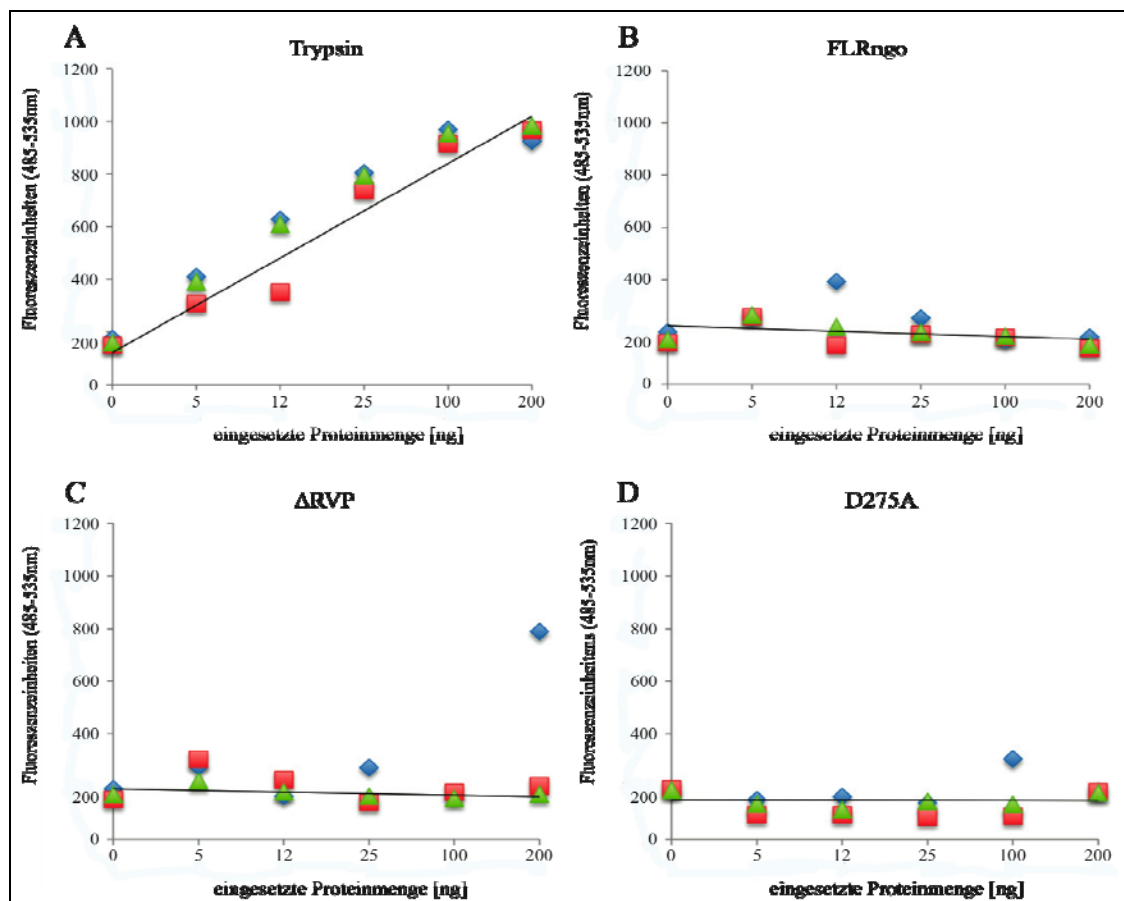


Abbildung 3.32: Mit dem Protease Fluorescent Detection Kit lässt sich keine proteolytische Aktivität von Rngo nachweisen. Gezeigt sind die Einzelwerte von drei unabhängigen Messungen für jedes Protein. Die x-Achse spiegelt die eingesetzten Proteinmengen in ng, die y-Achse die erhaltenen Fluoreszenzeinheiten bei einer Wellenlänge von 485-535nm wider. Die eingezeichnete Trendlinie veranschaulicht die durchschnittlich gemessenen Fluoreszenzeinheiten.

In Abbildung 3.32A ist zu erkennen, dass mit einer steigenden Trypsinkonzentration mehr Caseinmoleküle gespalten werden. Dies kann durch einen Anstieg der Fluoreszenzeinheiten gemessen werden. Abbildung 3.32B, C und D zeigen nicht diese proportionale Erhöhung der Fluoreszenzeinheiten in Folge einer erhöhten Proteinkonzentration. Die Inkubation von FITC-markiertem Casein mit MBP-FLRngo, MBP- Δ RVP und MBP-D257A führt nur zu einer Grundfluoreszenz von ca. 200 Units, die sich dadurch erklären lässt, dass während der Behandlung der Proben Caseinmoleküle durch mechanische Einwirkung gespalten werden. Ansonsten beschreiben die Trendlinien keine proteolytische Aktivität von FLRngo oder der beiden anderen Fusionsproteine. Dadurch kann keine Aussage getroffen werden, ob die Deletion der RVP-Domäne oder der Aminosäureaustausch von Aspartat 257 zu einem Alanin eine Auswirkung auf die proteolytische Aktivität von Rngo hat. Das Ergebnis bedeutet jedoch nicht, dass Rngo keine proteolytische Aktivität besitzt. Es konnte nur mit den gewählten Versuchsbedingungen keine Aktivität nachgewiesen werden.

3.7.5 Die Überexpression von Δ RVP-GFP und D257A-GFP, aber nicht von FLRngo-GFP, Δ UBA-GFP und Δ UBQ-GFP, führt in Ovarien zu einer Degenerierung der Plasmamembran von Keimbahnzellen

Um eine Aussage über die Funktion und Lokalisierung von überexprimiertem FLRngo, Δ UBQ, Δ UBA, Δ RVP und der potentiell proteolytisch inaktiven Form von Rngo (D257A) in der Oogenese machen zu können, wurden diese in Destinationsvektoren kloniert, die C-terminal ein GFP-Tag tragen und unter der Kontrolle eines UASp-Promotors stehen (Kapitel 2.2.12.2). Diese Plasmide wurden in Fliegen injiziert, um transgene Tiere zu erhalten (Kapitel 2.5.5). In diesen Fliegen wurden die Fusionsproteine durch einen *daughterless*-Gal4-Treiber überexprimiert. Abbildung 3.33 zeigt eine Stadium 10 Eikammer, in der FLRngo-GFP überexprimiert wurde. Das GFP-Signal ist identisch mit der wildtypischen Verteilung von Rngo. Das Fusionsprotein weist eine zytoplasmatische und nukleäre Lokalisierung auf. Auch die Färbung für F-Aktin und die gesamte Morphologie der Eikammer ist wildtypisch.

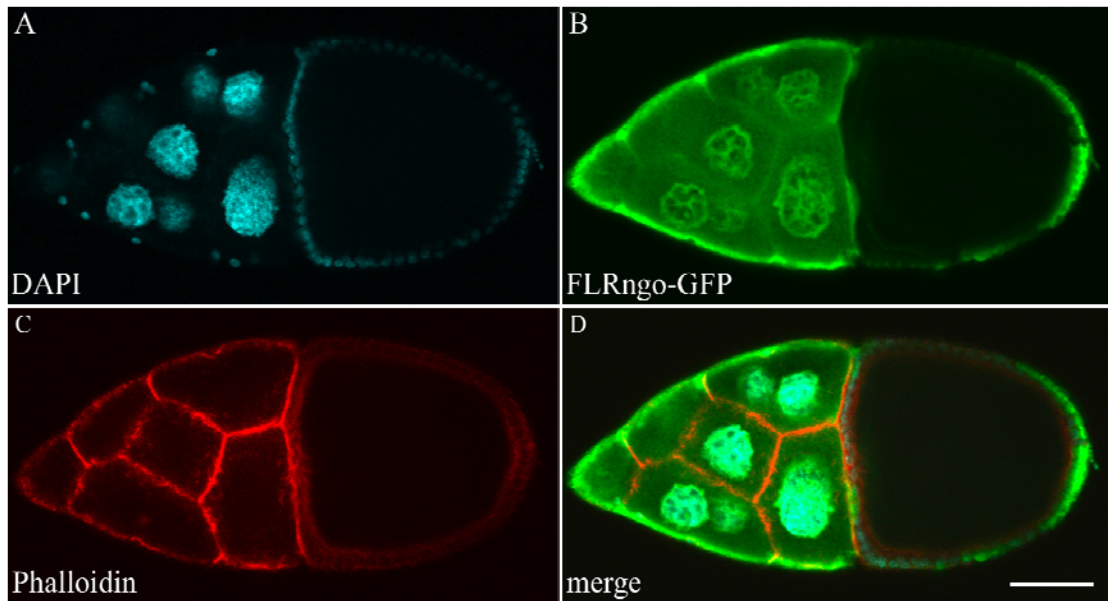


Abbildung 3.33: **Die Überexpression von FLRngo-GFP hat keine Auswirkungen auf die Morphologie der Eikammern und das GFP-Fusionsprotein lokalisiert wie das wildtypische Protein.** Gezeigt ist DAPI in türkis (A), GFP in grün (B), Phalloidin in rot (C) und die Überlagerung der einzelnen Kanäle (D). Anterior ist links. Der Maßstab entspricht 50µm.

Abbildung 3.34 zeigt eine Eikammer im Stadium 8, in der Δ UBQ-GFP überexprimiert wurde. Die Morphologie sowie die Färbung für F-Aktin weisen wildtypische Merkmale auf. Es ist jedoch in der GFP-Färbung zu erkennen, dass das GFP-Signal eine deutliche Reduktion in den Bereichen der Nährzellkerne aufweist. Da die UBQ-Domäne an das Proteasom binden sollte und dieses, wie in Abbildung 3.25 gezeigt, an den Zellkernen lokalisiert, könnte das Fehlen der GFP-Färbung an den Zellkernen auf die Deletion der UBQ-Domäne zurückzuführen sein. Die nicht uniforme Expression des GFP-Fusionsproteins in den Follikelzellen beruht auf der Verwendung des *daughterless*-Gal4-Treibers, der nicht immer homogen in allen somatischen Follikelzellen treibt.

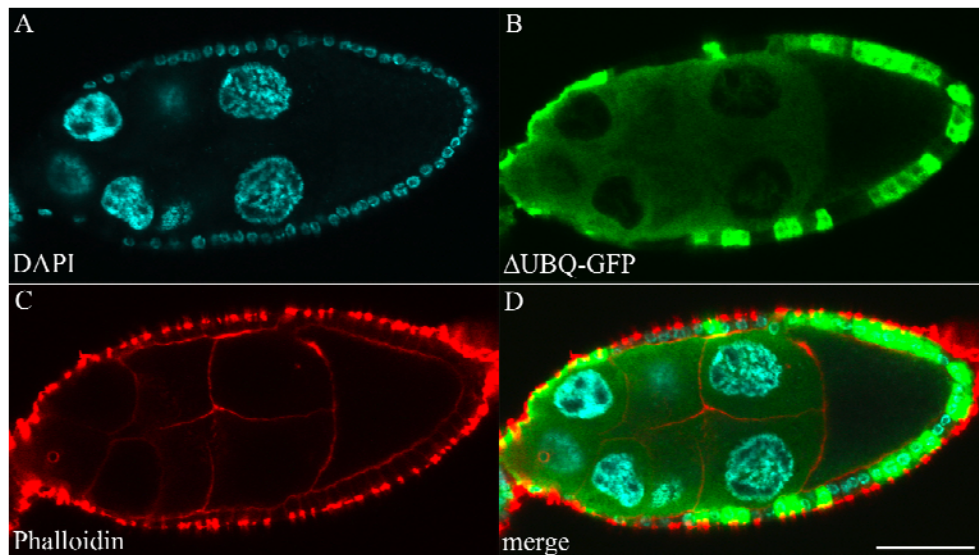


Abbildung 3.34: Die Überexpression von Δ UBQ-GFP hat keine Auswirkungen auf die Morphologie der Eikammern. Das GFP-Fusionsprotein lokalisiert jedoch in geringerem Maße an den Nährzellkernen der Keimbahnzellen. Gezeigt ist DAPI in türkis (A), GFP in grün (B), Phalloidin in rot (C) und die Überlagerung der einzelnen Kanäle (D). Anterior ist links. Der Maßstab entspricht 50 μ m.

Eine Überexpression des Deletionskonstruktes, in dem die UBA-Domäne deletiert wurde, weist ebenfalls eine wildtypische Verteilung des GFP-Fusionsproteins auf. In Abbildung 3.35B ist zu erkennen, dass Δ UBA-GFP an den Nährzellkernen lokalisiert und zytoplasmatisch exprimiert ist. Auch die Färbung für Phalloidin zeigt eine wildtypische Verteilung von F-Aktin.

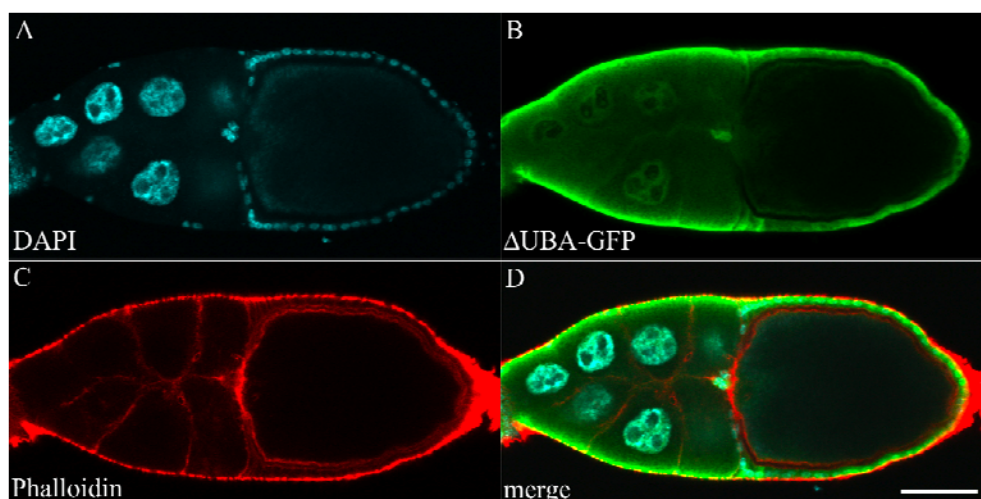


Abbildung 3.35: Die Überexpression von Δ UBA-GFP hat keine Auswirkungen auf die Morphologie der Eikammern und das GFP-Fusionsprotein lokalisiert wie das wildtypische Protein. Gezeigt ist DAPI in türkis (A), GFP in grün (B), Phalloidin in rot (C) und die Überlagerung der einzelnen Kanäle (D). Anterior ist links. Der Maßstab entspricht 50 μ m.

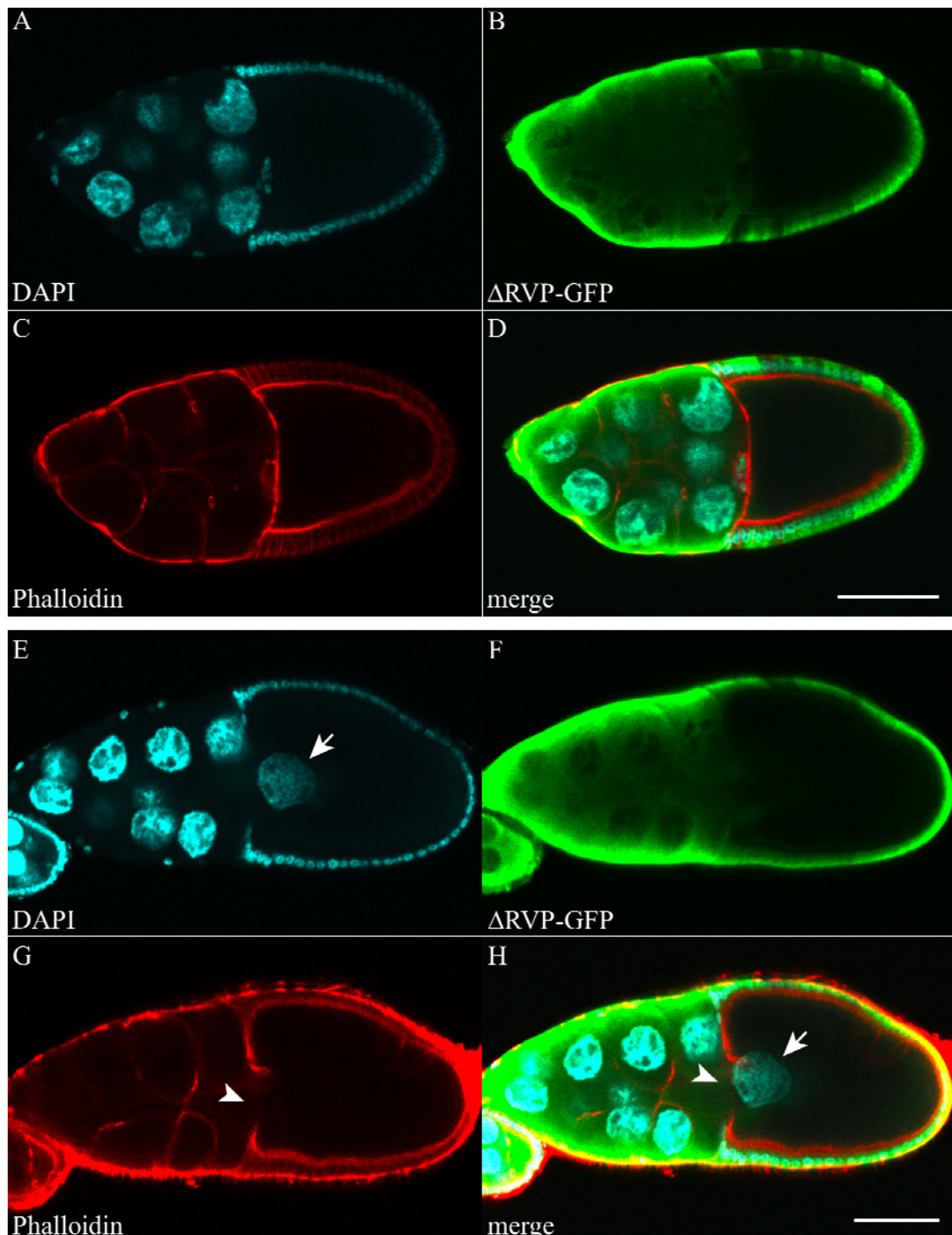


Abbildung 3.36: A-D Die Überexpression von Δ RVP-GFP hat in 84,1% aller untersuchten Stadium 10 Eikammern keine Auswirkungen auf die Morphologie der Eikammern und das GFP-Fusionsprotein lokalisiert wie das wildtypische Protein. Gezeigt ist DAPI in türkis (A), GFP in grün (B), Phalloidin in rot (C) und die Überlagerung der einzelnen Kanäle (D). E-H In 15,9% aller untersuchten Stadium 10 Eikammern kann eine Degeneration der Plasmamembran von Keimbahnzellen und ein Einwandern von Nährzellkernen in die Oozyte beobachtet werden. Gezeigt ist DAPI in türkis (E), GFP in grün (F), Phalloidin in rot (G) und die Überlagerung der einzelnen Kanäle (H). In E und H ist der eingewanderte Nährzellkern mit einem Pfeil markiert. Die degenerierende Plasmamembran ist in G und H mit einem Pfeilkopf gekennzeichnet. Anterior ist links. Die Maßstäbe entsprechen 50 μ m.

Eine Überexpression des Δ RVP-GFP Fusionsproteins zeigt in 84,1% der untersuchten Stadium 10 Eikammern keine Veränderungen zum Wildtyp. In Abbildung 3.36A-D kann eine normale Morphologie der Eikammer, sowie eine wildtypische Lokalisierung von F-Aktin und Δ RVP-GFP festgestellt werden. Andererseits kann in 15,9% aller Stadium 10 Eikammern eine Degenerierung der Plasmamembran von Keimbahnzellen und damit ein Einwandern von Nährzellkernen in die Oozyte beobachtet werden. In Abbildung 3.36E und H ist mit einem Pfeil ein Nährzellkern markiert, der in die Oozyte eingewandert ist. Der Pfeilkopf in G und H verdeutlicht die degenerierte Plasmamembran, durch welche eine räumliche Trennung der Oozyte und der benachbarten Nährzelle nicht mehr aufrecht erhalten werden kann. In diesem Bereich kann keine F-Aktin Färbung mehr detektiert werden.

Abbildung 3.37 zeigt eine Stadium 10 Eikammer, in der das D257A-GFP Fusionsprotein überexprimiert wurde. Es ist zu erkennen, dass die GFP-Färbung wie im Wildtyp zytoplasmatisch und nukleär ist. Auch bei den in Abbildung 3.37B mit Pfeilen markierten Nährzellkernen ist eine nukläre GFP-Färbung zu verzeichnen. Jedoch kann man hier im Gegensatz zum Wildtyp eine Degenerierung der Plasmamembran von Keimbahnzellen und damit einhergehend ein Einwandern von Nährzellkernen in die Oozyte erkennen. In Abbildung 3.37A und D sind durch Pfeile zwei Nährzellkerne markiert, die in die Oozyte eingedrungen sind. Auch der Oozytenkern (Stern) ist fehllokalisiert, da sich dieser im Wildtyp in einem anterior-dorsalen Bereich der Oozyte befindet. Die Stellen, an der die Plasmamembran der Keimbahnzellen degeneriert ist, bzw. an denen man ektopische F-Aktinakkumulationen erkennen kann, sind mit Pfeilköpfen markiert. Dieser Phänotyp tritt jedoch nicht bei allen Eikammern auf. 25,3% aller untersuchten Stadium 10 Eikammern sind wildtypisch, wohingegen die übrigen 74,7% die beschriebenen Phänotypen zeigen.

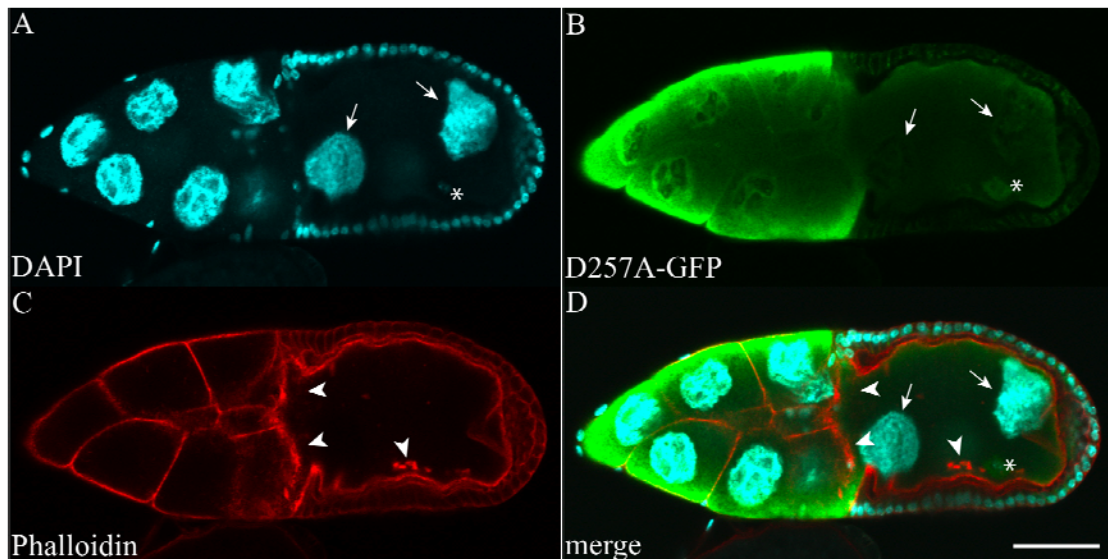


Abbildung 3.37: Die Überexpression von D257A-GFP zeigt in 74,7% aller untersuchten Stadium 10 Eikammern eine Degenerierung der Plasmamembran von Keimbahnzellen und ein Einwandern von Nährzellkernen in die Oozyte. Gezeigt ist DAPI in türkis (A), GFP in grün (B), Phalloidin in rot (C) und die Überlagerung der einzelnen Kanäle (D). Durch Pfeile in A, B und D sind Nährzellkerne markiert, die in die Oozyte eingewandert sind. Der Oozytenkern (Stern in A, B und D) ist ebenfalls fehllokalisiert. Die Pfeilköpfe in C und D markieren Bereiche, in denen die Plasmamembran von Keimbahnzellen degeneriert ist bzw. in denen ektopische F-Aktinakkumulationen zu verzeichnen sind. Anterior ist links. Der Maßstab entspricht 50µm.

Tabelle 3.4 fasst die Häufigkeit der beschriebenen Phänotypen in Stadium 10 Eikammern nach der Überexpression von verschiedenen GFP-Fusionsproteinen zusammen. Als interne Kontrolle dient das FLRngo-GFP Fusionsprotein.

Tabelle 3.4: Häufigkeit der beschriebenen Phänotypen in Stadium 10 Eikammern, nach der Überexpression von verschiedenen GFP-Fusionsproteinen.

Stadium 10 Eikammern	FLRngo-GFP		Δ RVP-GFP		D257A-GFP	
	relativ	absolut	relativ	absolut	relativ	absolut
wildtypische Eikammern	100%	31	84,1%	37	25,3%	22
Eikammern mit degenerierter Plasmamembran	0%	0	15,9%	7	74,7%	65
Gesamtzahl	n = 31		n = 44		n = 87	

3.8 Die Analyse von Interaktionspartnern von Rngo mittels Massenspektrometrie

Die Analyse von Interaktionspartnern von Rngo mittels Massenspektrometrie sollte Aufschlüsse über die molekulare Funktion von Rngo im Laufe der Entwicklung von *Drosophila* geben. Hierfür wurden Proteinextrakte aus Ovarien, Embryonen und L3-Larven von transgenen Fliegen hergestellt, die ein GFP-Fusionsprotein von Rngo exprimieren, welches ein N-terminales bzw. ein C-terminales GFP-Tag trägt. Für die Expression in Ovarien wurden transgene Fliegen verwendet, die das GFP-Fusionsprotein unter der Kontrolle des UASp-Promotors im Muster des *daughterless*-Gens exprimieren. Die Proteinextrakte aus Embryonen und L3-Larven entstammen aus Fliegen, mit denen die Rettungsexperimente in Kapitel 3.2 durchgeführt wurden. Als Negativkontrolle wurden w⁻-Fliegen verwendet. Mit diesen Proteinextrakten wurde eine Präzipitation mit dem GFP-Trap[®] Kit der Firma Chromotek durchgeführt. Die Präzipitate wurden im Labor von Dr. Olaf Jahn durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend massenspektrometrisch untersucht. Als mögliche Interaktionspartner wurden folgende Aktin-assoziierte Proteine identifiziert: Twinstar, Tropomyosin, Zipper (Myosin schwere Kette) und Aktin. Als Positivkontrolle wurde Rngo identifiziert. Die detaillierten Ergebnisse der massenspektrometrischen Auswertung, sowie die Polyacrylamidgele, mit Kennzeichnung der untersuchten Proteinbanden, sind dem Anhang zu entnehmen.

Im Hinblick auf die mögliche Funktion von Rngo als extraproteasomaler Polyubiquitinrezeptor und die damit verbundene Regulierung von Proteinen durch das Proteasom, wurden Proteinextrakte aus L3-Larven untersucht, da die maternale Komponente von Rngo in *rngo*-mutanten L3-Larven nicht mehr nachweisbar ist. Hierfür wurden hemizygot mutante Tiere, heterozygote Tiere, die den FM7[*twist::GFP*]-Balancer und die P-Element-Insertion GE3956 tragen und Tiere, die homozygot den FM7[*twist::GFP*]-Balancer aufweisen, verwendet. Diese Proteinextrakte wurden mittels eines Western Blots analysiert, um so die Frage zu beantworten, ob der Proteingehalt der identifizierten Interaktionspartner in mutanten Tieren Unterschiede zu den Kontrolltieren aufweist. Abbildung 3.38 zeigt die Ergebnisse dieses Versuches. Es ist zu erkennen, dass in dem Proteinextrakt der hemizygot mutanten Tiere keine Bande für das wildtypische Rngo-Protein detektiert

werden kann. Dies bedeutet, dass die maternale Komponente von Rngo nicht mehr nachweisbar ist. Im Gegensatz dazu ist in den beiden Negativkontrollen eine Bande auf der Höhe von ca. 60 kDa zu erkennen, die dem wildtypischen Protein entspricht. Des Weiteren kann keine Veränderung des Proteingehalts von Twinstar (Tsr), Tropomyosin, Zipper, G-Aktin und Aktin in mutanten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren festgestellt werden. Der Nachweis von α -Tubulin dient als Kontrolle, dass in allen Spuren gleiche Mengen an Protein aufgetragen wurden.

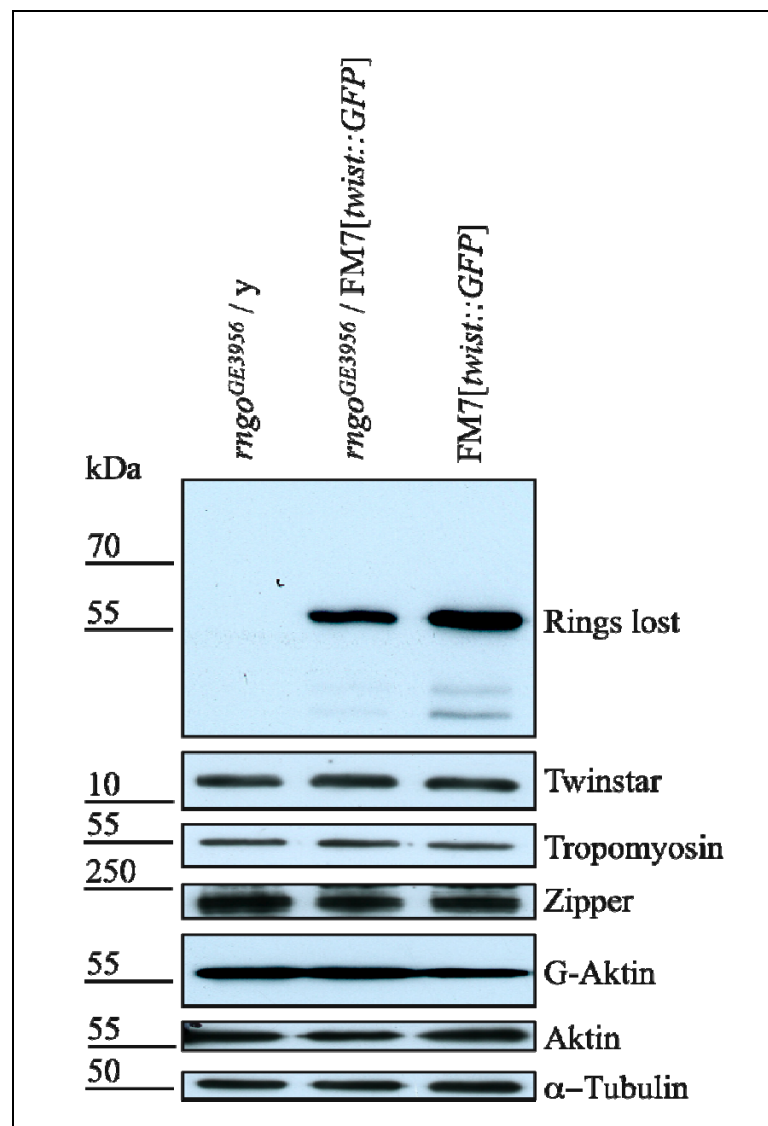


Abbildung 3.38: **Der Proteingehalt von Twinstar, Tropomyosin, Zipper, G-Aktin und Aktin unterscheidet sich nicht im Vergleich von hemizygot mutanten Tieren zu den Kontrolltieren.** Gezeigt ist ein Western Blot auf Proteinextrakten von L3-Larven aus hemizygot mutanten Tieren, heterozygoten Tieren, welche die P-Element-Insertion GE3956 und den FM7[*twist::GFP*]-Balancer tragen, sowie Tiere, die homozygot den FM7[*twist::GFP*]-Balancer aufweisen. Der Nachweis von α -Tubulin dient als Kontrolle, dass in allen Spuren gleiche Mengen an Protein aufgetragen wurden.

Ergänzend zu den massenspektrometrischen Versuchen sollte die Interaktion von Rngo mit Tsr in Koimmunpräzipitationen verifiziert werden. Dafür wurde FLRngo-GFP zusammen mit Tsr-HA in S2-Zellen kotransfiziert. Eine Immunpräzipitation mit GFP und die anschließende Analyse mittels Western Blot konnte jedoch keine eindeutige Aussage darüber geben, ob diese beiden Proteine einen Komplex bilden. Auch der Versuch, eine Interaktion von Rngo und Tsr in Ovarien, Embryonen und L3-Larven nachzuweisen, führte zu keinem eindeutigen Ergebnis, da nur in ca. 50% aller Versuche eine Bindung von Rngo an Tsr zu verzeichnen war.

4 Diskussion

Im Laufe dieser Arbeit wurde eine molekulare und funktionelle Analyse des Gens *rings lost (rngo)* durchgeführt. Durch Datenbankanalysen wurde eine P-Element-Insertionslinie identifiziert, in der ein P-Element stromabwärts des ATG-Startcodons von *rngo* inseriert hat. Diese P-Element-Insertion erzeugt einen Funktionsverlust von *rngo* und es konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesem Allel um ein Null-Allel von *rngo* handelt. Fliegen, die hemizygot dieses P-Element tragen, sind pupal letal. Rettungsexperimente mit Vollängen GFP-Rngo-Konstrukten zeigten, dass die Letalität der mutanten Fliegen nur auf die Mutation in *rngo* zurückzuführen ist und dass die GFP-Fusionsproteine funktional sind. Außerdem zeigten diese Rettungsexperimente, dass die für die transgenen Fliegen klonierten und in FlyBase annotierten Sequenzen für das Rngo-Protein kodieren. Das von *rngo* kodierte Protein weist konservierte Proteindomänen auf. N-terminal befindet sich eine UBQ- (*ubiquitin like*) und C-terminal eine UBA- (*ubiquitin associated*) Domäne. Diese beiden Domänen sind charakteristisch für extraproteasomale Polyubiquitinrezeptoren, die in der Evolution hoch konserviert sind. Das Rngo-Homolog in der Hefe, Ddi1/Vsm1, sowie andere extraproteasomale Polyubiquitinrezeptoren (DDsk2/Dsk2/Ubiquilin1-4; DRad23/Rad23/HHR23A-B, *Drosophila*/Hefe/Säuger), besitzen dieselben Proteindomänen (Elsasser und Finley, 2005). Im Vergleich zu den Homologen könnte also auch Rngo als ein extraproteasomaler Polyubiquitinrezeptor fungieren. Rngo nimmt unter diesen Proteinen jedoch eine Sonderrolle ein, da es als einziges eine retrovirale Aspartatprotease-Domäne (RVP) aufweist, die sich zwischen der UBQ- und UBA-Domäne befindet (Grabbe und Dikic, 2009). Auch die Domänenstruktur der beiden humanen Rngo Homologe, HDdi1 und HDdi2, zeigt, dass beide eine RVP-Domäne besitzen. Jedoch fehlt HDdi1 die UBA- und HDdi2 die UBA- und UBQ-Domäne (Elsasser und Finley, 2005).

Die Analyse der Lokalisierung des Rngo-Proteins ergab, dass es in allen untersuchten Geweben zytoplasmatisch und nukleär exprimiert ist. Eine phänotypische Charakterisierung der zygotischen *rngo*-Mutante gestaltete sich jedoch schwierig, da Rngo eine starke maternale Komponente aufweist, die mögliche Phänotypen in der embryonalen bzw. larvalen Entwicklung überdeckt. Deshalb wurde die maternale

Komponente durch Erzeugung von Keimbahnklonen ausgeschaltet. Da diese Keimbahnklone die Oogenese nicht vollenden, konnte auch durch diesen Versuch keine Aussage über die Funktion von Rngo in der embryonalen bzw. larvalen Entwicklung getroffen werden. Doch Keimbahnklone für das mutante *rngo*-Allel zeigten diverse Phänotypen während der Oogenese. Da jedoch noch Unklarheit herrscht, an welchen Prozessen Rngo genau beteiligt ist, sollen diese Phänotypen im Folgenden zusammengefasst und mit Mutationen in Genen verglichen werden, welche ähnliche Defekte aufweisen.

4.1 Defekte in der Etablierung der Ringkanäle können nicht auf Fehler während der unvollständigen Zytokinese im Germarium zurückgeführt werden

Die vorläufige Etablierung der Ringkanäle erfolgt bereits während der vier mitotischen Teilungen des Zystoblasten, aus dem die spätere 16-Zellzyste entsteht. Die erste mitotische Teilung der Keimbahnstammzelle weist eine vollständige Zytokinese auf, aus der zwei separate Tochterzellen entstehen. Die Keimbahnstammzelle behält ihren Stammzellcharakter, während die zweite Zelle den Zystoblasten darstellt. Dieser Zystoblast teilt sich weitere vier Mal, jedoch endet jede Mitose mit einer unvollständigen Zytokinese. Dieser nicht vollendete Prozess hinterlässt jeweils eine arretierte Teilungsfurche, welche die einzelnen Zellen miteinander verbindet (Huynh und St Johnston, 2004; Kai und Spradling, 2004). Wie genau diese arretierte Teilungsfurche etabliert wird, ist bis jetzt noch nicht bis ins Detail geklärt. Es ist jedoch bekannt, dass die Proteine Anillin (Ani) und Pavarotti (Pav) diesen Prozess steuern. Ani, ein F-Aktin bindendes und verknüpfendes Protein, wurde ursprünglich aus Embryonenextrakten von *Drosophila melanogaster* isoliert und interagiert dort mit Aktin, Myosin II und Septinen. Diese werden während der Mitose durch Ani zu den entstehenden Teilungsfurchen rekrutiert (D'Avino et al., 2008). Pav gehört zur Gruppe der mitotischen Kinesin-ähnlichen Proteine 1. Mutationen in *pav* führen zu Fehlern während der Zytokinese im Zellzyklus 16 der Embryogenese, durch welche die mitotischen Zellen nicht korrekt ihre Spindel etablieren und niemals einen kontraktilen Ring bilden (Adams et al., 1998). Die Ergebnisse aus Embryonen und Lokalisationsstudien von Ani und Pav im Germarium zeigten, dass Aktin und Myosine zusammen mit Ani und Pav an der Etablierung der arretierten Teilungsfurche beteiligt

sind. Da in *rngo*-Keimbahnklonen die Bildung von F-Aktin gestört ist, wäre es möglich, dass auch Rngo eine Rolle in der Regulierung der arretierten Teilungsfurche spielt. Interessanterweise wurde im S2-Zellkultursystem gezeigt, dass die Rekrutierung von F-Aktin zu den Teilungsfurchen während der Zytokinese nicht essentiell für den Aufbau von Anillin-enhaltenden Strukturen ist. Stattdessen zeigten S2-Zellen, die mit Latrunculin A behandelt wurden, welches die Bildung von F-Aktin inhibiert, nach wie vor eine Lokalisierung von Ani und Septinen an der Teilungsfurche (Hickson und O'Farrell, 2008). Auch HeLa-Zellen, die mit Blebbistatin, einem Myosin II Inhibitor, inkubiert wurden, zeigten eine Aufrechterhaltung von Anillin-enhaltenden Strukturen und eine Etablierung von Teilungsfurchen (Guha et al., 2005; Murthy und Wadsworth, 2005). Die Autoren spekulierten, dass Ani zusammen mit Septinen in der Abwesenheit von F-Aktin einen Komplex bilden kann, der die Teilungsfurche bildet. Im Gegenzug wird F-Aktin für die Destabilisierung dieses Komplexes benötigt (Hickson und O'Farrell, 2008). Da F-Aktin also nicht essentiell für die Bildung der arretierten Teilungsfurche ist, hätte eine mögliche Regulierung von F-Aktin durch Rngo keine Auswirkung auf die vier mitotischen Zellteilungen des Zystoblasten. Dies wird auch durch die Antikörperfärbungen von Hu-li tai shao-Fusom (Hts-F) in *rngo*-Keimbahnklonen unterstützt. Die Bildung des Fusoms scheint völlig normal zu verlaufen und falls keine arretierten Teilungsfurchen entstehen würden, könnte das Fusom nicht die Zellen der 16-Zellzyste miteinander verbinden. Die Defekte in der Etablierung der Ringkanäle in *rngo*-Keimbahnklonen scheinen daher erst während der Expansion der Ringkanäle aufzutreten.

4.2 *rngo*-Keimbahnklone weisen Abnormalitäten in der Größenkontrolle der Ringkanäle auf

Erst nachdem die vier mitotischen Zellteilungen mit unvollständiger Zytokinese abgeschlossen sind, fangen die Ringkanäle an zu expandieren (Ong und Tan, 2010). Der Prozess des Ringkanalwachstums wird durch verschiedene Proteine reguliert. Da in *rngo*-Keimbahnklonen Abnormalitäten in der Größenkontrolle der Ringkanäle auftreten (abnormal große, rudimentäre oder gar fehlende Ringkanäle), werden die bereits in der Literatur beschriebenen und für die Ringkanalexpansion benötigten Proteine mit den Phänotypen der *rngo*-Keimbahnklone verglichen.

Während der Etablierung der Ringkanäle wird F-Aktin zum inneren Ring dieser Kanäle rekrutiert. Um das Wachstum der Ringkanäle zu gewährleisten, müssen diese Aktinfilamente verlängert und verknüpft werden. Da Aktinfilamente zueinander eine geringe Affinität aufweisen, werden Kofaktoren für deren Verknüpfung benötigt. Einer dieser Faktoren ist Kelch (Kel). In *kel*-Mutanten lokalisiert F-Aktin zwar an den Ringkanälen, ist aber hochgradig unorganisiert (Robinson und Cooley, 1997a). Durch die Anwesenheit von F-Aktin werden die Ringkanäle zwar stabilisiert, aber der innere Ring kann nicht weiter wachsen, da die Verknüpfung der Aktinfilamente gestört ist (Robinson und Cooley, 1997a). Dies führt zu kleineren Ringkanälen, die auch in *rngo*-Keimbahnklonen beobachtet werden konnten. Die Lokalisierung anderer Ringkanalproteine wie Hu-li tai shao-Ring Canal (Hts-RC) und Filamin ist in *kel*-Mutanten im Gegensatz zu *rngo*-Keimbahnklonen jedoch nicht betroffen.

In wildtypischen Ovarien konnten durch Antikörperfärbungen Tyrosin phosphorylierte Proteine an den Ringkanälen beobachtet werden. Die Phosphorylierung dieser Proteine wird durch zwei Phosphotyrosinkinasen (Src64 und Tec29) vermittelt. Mutationen in Genen, die für diese beiden Kinasen kodieren, führen zu einem Verlust der Phosphotyrosin-spezifischen Färbung an den Ringkanälen. Die Ringkanäle von *src64*- und *tec29*-mutanten Ovarien sind im Gegensatz zum Wildtyp kleiner. Das bedeutet, dass die Kinaseaktivität für die Expansion der Ringkanäle benötigt wird. In *rngo*-Keimbahnklonen ist eine Fehlverteilung, jedoch nicht ein kompletter Verlust des Signals von Tyrosin phosphorylierten Proteinen in der Keimbahn zu beobachten. Auch degenerieren die Eikammern von *rngo*-Keimbahnklonen vor dem Stadium 10 der Oogenese, wohingegen Fliegen, die mutant für *src64* oder *tec29* sind, sogar noch Eier legen. Auch konnte in mutanten *src64* und *tec29* Eikammern, im Gegensatz zu *rngo*-Keimbahnklonen keine Fehllokalisierung von Hts-RC und Kel beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass diese Kinasen nur für die Expansion der Ringkanäle, aber nicht für die Lokalisierung anderer beschriebener Ringkanalproteine verantwortlich sind (Dodson et al., 1998; O'Reilly et al., 2006). Interessanterweise wurde lange Zeit angenommen, dass Kel und Src64 unabhängig voneinander in einem parallelen Signalweg das Wachstum von Ringkanälen organisieren. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Kel durch Src64 vermittelte Tyrosinphosphorylierung reguliert wird (Kelso et al., 2002).

Auch Mutationen in *cheerio* (*cher*), dem *Drosophila* Filamin, zeigen eine veränderte Ringkanalmorphologie. Der *cher*-Lokus kodiert für zwei Proteine. Das größere

Filamin240-Protein lokalisiert an dem inneren Ring der Ringkanäle in der Keimbahn, wohingegen das kleinere Filamin90-Protein ausschließlich in der somatischen Muskelhülle exprimiert ist. Im Wildtyp verankert Filamin Ringkanal-assoziiertes F-Aktin mit der Plasmamembran. Diese Verankerung stabilisiert die Ringkanäle und zeitgleich verknüpft Filamin neue Aktinfilamente miteinander, um eine Ringkanalexpansion zu ermöglichen. Die Ringkanäle in *cher¹*-Mutanten (mutant für *Filamin240*) sind kleiner als im Wildtyp, weisen aber eine wildtypische Verteilung von an Tyrosin phosphorylierten Proteinen auf. Die kleineren Ringkanäle in *cher¹*-Mutanten lassen sich dadurch erklären, dass die Aktinfilamente nicht mehr korrekt verknüpft und in der Membran verankert werden. Dadurch ist auf der einen Seite die für das Ringkanalwachstum benötigte Dynamik der Aktinfilamente gestört und auf der anderen Seite die Stabilität der Ringkanäle nicht mehr gewährleistet. Jedoch ist Filamin nicht allein für die Rekrutierung von F-Aktin zu den Ringkanälen verantwortlich. In *hts-RC*-mutanten Fliegen lokalisiert Filamin zwar an den Ringkanälen, aber F-Aktin kann dort nicht detektiert werden. Das bedeutet, dass Filamin einen Kofaktor benötigt, um Aktinfilamente zu binden und in der Membran zu verankern. Dieser Faktor könnte das Aktin-bindende Protein Hts-RC sein, da sich in *cher¹*-Mutanten die Lokalisierung von Hts-RC nicht mehr auf die Ringkanäle beschränkt, sondern an der Plasmamembran der Keimbahnzellen zu beobachten ist (Li et al., 1999; Robinson et al., 1997). Diese Fehlverteilung von Hts-RC, sowie kleinere Ringkanäle konnten auch in *rngo*-Keimbahnklonen beobachtet werden. Im Gegensatz zu *cher¹*-Mutanten lokalisieren die an Tyrosinen phosphorylierten Proteine in *rngo*-Keimbahnklonen jedoch nicht mehr ausschließlich an den Ringkanälen. Außerdem treten in *rngo*-Keimbahnklonen auch vergrößerte Ringkanäle auf, die in *cher¹*-Mutanten nie beschrieben wurden. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass Rngo zusammen mit Filamin eine kooperative Rolle in der Expansion der Ringkanäle einnimmt, jedoch scheint Rngo noch weitere Prozesse zu beeinflussen.

Die Größenkontrolle der Ringkanäle wird auch durch Mitglieder der Myosin-Familie beeinflusst. Hierbei spielt Nicht-Muskel Myosin II eine entscheidende Rolle. Myosin II ist ein hexameres Enzym, welches aus zwei schweren Ketten, zwei regulatorischen leichten Ketten (*Myosin regulatory light chains*, MRLC) und zwei essentiellen leichten Ketten besteht. Die Aktivität von Nicht-Muskel Myosin II wird durch die Phosphorylierung von MRLC reguliert. Diese Phosphorylierung unterliegt der antagonistischen Aktivität der Myosin leichten Kette-Phosphatase (MLCP) und der

Myosin leichten Kette-Kinase (MLCK). Die MLCP lässt sich weiter in drei Untereinheiten aufteilen: Eine katalytische Untereinheit, bestehend aus der Proteinphosphatase 1c β , einer Myosin bindenden Untereinheit (MYPT) und eine Untereinheit mit nicht bekannter Funktion (Hartshorne et al., 1998). In *Drosophila* wird die MYPT Untereinheit für verschiedene Prozesse, wie den Dorsalschluss, die Morphogenese der Augen und das Ringkanalwachstum benötigt. Keimbahnklone für *mypt* zeigen stark verkleinerte Ringkanäle, wobei die Lokalisierung von Hts-RC, Kel und Tyrosin phosphorylierten Protein nicht verändert ist. Es wird spekuliert, dass in wildtypischen Ovarien MYPT durch die Regulierung von Myosin II eine übermäßig starke Kontraktion der arretierten Teilungsfurche inhibieren könnte. *mypt*-Keimbahnklone könnten somit diesen Prozess nicht mehr regulieren und deshalb würden zu kleine Ringkanäle, aufgrund von Teilungsfurchen mit geringerem Durchmesser, entstehen. Aber auch die *mypt*-Keimbahnklone zeigen weitaus geringere Defekte in der Oogenese als *rngo*-Keimbahnklone, da hier Eikammern im Stadium 10 beobachtet werden können und sogar Eier von den Weibchen gelegt werden (Tan et al., 2003). Da Rngo, wie schon in Kapitel 4.1 diskutiert, nicht wie MYPT in der Etablierung der arretierten Teilungsfurche involviert ist, ist eine Interaktion von Rngo mit MYPT unwahrscheinlich.

Des Weiteren trägt die Regulierung der Protein Kinase A (PKA) durch A-Kinase-verankernde Proteine (A-kinase anchoring proteins, AKAP) zum Größenwachstum der Ringkanäle bei. In der Abwesenheit von cAMP ist die PKA ein inaktives Holoenzym, das aus zwei identischen katalytischen Untereinheiten (PKA-C) und zwei identischen regulatorischen Untereinheiten (PKA-R) besteht. Die Aktivität der PKA wird durch die Anwesenheit von cAMP reguliert. cAMP bindet an die PKA-R wodurch die PKA-C aus dem Komplex gelöst wird (Kalderon und Rubin, 1988). Die so freigesetzte katalytische Untereinheit kann nun Zielproteine phosphorylieren. Um spezifisch Proteine zu erkennen und zu phosphorylieren, wird die PKA durch AKAPs an bestimmte Zielregionen in der Zelle rekrutiert (Scott und McCartney, 1994). In wildtypischen Ovarien lokalisieren PKA-RII und Akap200 an der Plasmamembran der Keimbahnzellen und am äußeren Ring der Ringkanäle. Aufgereinigtes Akap200 bindet *in vitro* an aufgereinigte Aktinfilamente wodurch angenommen wird, dass Akap200 die PKA an den Ringkanälen verankert und so einen Einfluss auf die Organisation des Aktinzytoskeletts nimmt. *akap200*-mutante Ovarien weisen vergrößerte, dünnere Ringkanäle als der Wildtyp auf. Im Gegensatz dazu führt eine Überexpression von

Akap200 zu dickeren und kleineren Ringkanälen. Diese Ringkanäle scheinen aber funktional zu sein, da die Fliegen fertil sind und keine Defekte während des schnellen Transportes von den Nährzellen zur Oozyte (*nurse cell dumping*) aufweisen. Die kleineren Ringkanäle in *akap200*-mutanten Ovarien zeigen, im Gegensatz zu *rngo*-Keimbahnklonen, keine Fehlverteilung von Hts-RC, F-Aktin, Filamin und Tyrosin phosphorylierten Proteinen. Eine Beteiligung von Rngo am Akap200-Signalweg ist daher unwahrscheinlich. Interessanterweise konnte ein Zusammenhang zwischen der Funktion von Akap200 und Src64 hergestellt werden. *src64*-mutante Fliegen weisen, im Gegensatz zu *akap200*-mutanten Fliegen, kleinere Ringkanäle auf als wildtypische Ovarien. Doch wenn die Gendosis von *akap200* in *src64*-mutanten Fliegen reduziert ist, ist der Durchmesser der Ringkanäle in diesen Fliegen nicht von denen in wildtypischen Ovarien zu unterscheiden (Jackson und Berg, 2002).

Für den Arp2/3 Komplex konnte gezeigt werden, dass dieser die langsam ablaufende spontane Nukleation von Aktinfilamenten erhöhen kann. Außerdem ist der Komplex *in vivo* wichtig für die Restrukturierung des Aktinzytoskeletts (Mullins et al., 1998). Diese beiden Prozesse werden auch für das Größenwachstum der Ringkanäle benötigt. Mutationen in den Untereinheiten *arpc1* und *arp3* des Arp2/3 Komplexes weisen Ringkanäle mit kleineren Durchmessern als in wildtypischen Ovarien auf. Die Defekte der Ringkanalexansion treten jedoch erst relativ spät während der Oogenese auf. Bis zum Stadium 4 konnte kein Unterschied im Durchmesser der Ringkanäle von wildtypischen und *arpc1* mutanten Fliegen ausgemacht werden. Erst ab Stadium 5-6 können kleinere Ringkanäle in *arpc1* mutanten Ovarien beobachtet werden. Dies bedeutet, dass der Arp2/3 Komplex nicht für die initiale Rekrutierung von Aktin zu den Ringkanälen, sondern erst im späteren Verlauf der Oogenese für die Expansion der Ringkanäle benötigt wird (Hudson und Cooley, 2002). Da in *rngo*-Keimbahnklonen nicht nur verkleinerte sondern auch übergroße Ringkanäle zu beobachten sind und Hts-RC in Arp2/3 Keimbahnklonen ausschließlich an den Ringkanälen lokalisiert, ist es unwahrscheinlich, dass Rngo die Größenkontrolle der Ringkanäle durch die Regulierung des Arp2/3 Komplexes beeinflusst.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass viele Proteine und Proteinkomplexe für das Wachstum der Ringkanäle zuständig sind. Manche agieren autonom, andere wiederum unterliegen komplizierten Regulierungsmechanismen und Signalwegen. Jedoch kann keine der hier beschriebenen Mutationen die vielfältigen Phänotypen von *rngo*-Keimbahnklonen widerspiegeln. Das bedeutet, dass Rngo

wahrscheinlich gleichzeitig an der Steuerung von mehreren Proteinen oder Proteinkomplexen beteiligt ist. Es ist aber auch möglich, dass Rngo einen direkten Einfluss auf F-Aktin nimmt, denn sowohl kleinere als auch vergrößerte Ringkanäle werden durch die Dynamik der Aktinfilamente gesteuert. Auch die Fehlverteilung aller untersuchten Ringkanal-assoziierten Proteine könnte auf eine generelle Störung des filamentösen Aktins zurückzuführen sein. Falls F-Aktin nicht mehr korrekt verknüpft und/oder fehllokalisiert wird, könnte die ektopische Verteilung dieser Aktin-bindenden und -bündelnden Proteine ein sekundärer Effekt sein.

4.3 Die Degenerierung der Plasmamembran von Keimbahnzellen in *rngo*-Keimbahnklonen und damit einhergehende multinukleäre Zellen, sind vermutlich auf eine fehlerhafte Verknüpfung von Aktinfilamenten zurückzuführen

In *rngo*-Keimbahnklonen konnten multinukleäre Zellen beobachtet werden. Hierbei handelte es sich um Keimbahnzellen, bei denen die Degenerierung der Plasmamembran eine korrekte Separierung der einzelnen Zellen nicht mehr ermöglicht. Die Instabilität der Plasmamembran scheint auf eine fehlerhafte Verknüpfung der subkortikalen Aktinfilamente zurückzuführen zu sein, denn dieser Phänotyp zeigt sich schon vor dem Stadium 10 der Oogenese. Ab diesem Stadium bilden sich zytoplasmatische Aktinfilamente, welche die Nährzellkerne während des schnellen zytoplasmatischen Transports (*nurse cell dumping*) zwischen den Nährzellen und der Oozyte festhalten. Werden die Nährzellkerne nicht durch das zytoplasmatische F-Aktinnetzwerk festgehalten, wandern sie beim *nurse cell dumping* in die Oozyte ein. Es konnten in *rngo*-Keimbahnklonen jedoch nie Stadium 10 Eikammern beobachtet werden, da die Eikammern schon vor diesem Stadium degenerieren. Auch kann der Phänotyp nicht durch einen Defekt während der ersten vier mitotischen Zellteilungen erklärt werden, da alle *rngo*-Keimbahnklone 16 Zellen aufweisen und die Oozyte initial korrekt determiniert wurde. Würden die multinukleären Zellen durch inkorrekte Zellteilung entstehen, müsste man schon in sehr frühen Eikammern mehrere Zellkerne in einer Zelle beobachten können.

Viele der bereits unter Kapitel 4.2 beschriebenen Proteine haben auch eine Funktion während der Stabilisierung der Plasmamembran in der Keimbahn. In *cher*¹-Mutanten konnte eine Degenerierung der Plasmamembran im Stadium 10 der Oogenese gezeigt

werden, wodurch Nährzellkerne in die Oozyte eingewandert sind (Li et al., 1999; Robinson et al., 1997). Die Autoren spekulierten, dass Filamin nicht nur spezifisch die Aktinfilamente der Ringkanäle, sondern auch die subkortikalen Aktinfilamente in der Plasmamembran verankert. Ist dieser Prozess gestört, kann die Stabilität der Plasmamembran nicht mehr gewährleistet werden. Die Membran könnte dem mechanischen Stress, der beim *nurse cell dumping* auftritt, nicht entgegenwirken und würde dadurch zerbrechen. *rngo*-Keimbahnklone erreichen nie das Stadium, in dem das *nurse cell dumping* eintritt. Daher scheint die Stabilität der Plasmamembran schon während der frühen Entwicklung der Eikammer so stark beeinträchtigt zu sein, dass die Membranen dem Druck, der durch das Wachstum der Eikammer entsteht, nicht standhalten können.

Ähnliche Phänotypen wie in *rngo*-Keimbahnklonen konnten auch für GTPasen der Rho Unterfamilie gezeigt werden. Mutationen in *cdc42* und *rhoL* führen ebenfalls zu fusionierten Nährzellen mit ektopisch aggregiertem F-Aktin und Ringkanälen (Murphy und Montell, 1996). Die Eikammern der *rhoL* mutanten Fliegen zeigen jedoch Apoptose, welche in *rngo*-Keimbahnklonen nicht nachgewiesen werden konnte.

Die durch die Degenerierung der Plasmamembran von einzelnen Keimbahnzellen hervorgerufene Fusion von Nährzellen konnte auch in Mutanten für *armadillo* (*arm*) (*Drosophila* β -*catenin*) und *spaghetti squash* (*sqh*, regulatorische leichte Kette von Nicht-Muskel Myosin) beobachtet werden. Allerdings wurde bei diesen Ergebnissen kein Augenmerk auf die Etablierung der Ringkanäle gelegt. Also könnten hier die Zellfusionen auch auf Defekte während der frühen Zytokinese zurückzuführen sein. Eine wildtypische Anzahl von Ringkanälen würde zeigen, dass die Zellteilungen im Germarium korrekt abgelaufen sind. Die binukleären Zellen wären dann das Resultat einer degenerierten Plasmamembran in der Keimbahn. Dies scheint auch eher wahrscheinlich zu sein, da Arm für die Zelladhäsion benötigt wird. Um hier Vergleiche von *rngo*-Keimbahnklonen mit *arm*-Mutanten anstellen zu können, sollte vorher die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass die Phänotypen in *arm*-Mutanten auf Fehler während der vier mitotischen Teilungen im Germarium zurückzuführen sind, bevor falsche Rückschlüsse gezogen werden.

Mutationen in Genen der beiden Phosphotyrosin-Kinasen *src64* und *tec29* zeigten nicht nur Defekte bei der Etablierung der Ringkanäle, sondern auch multinukleäre Keimbahnzellen (Djagaeva et al., 2005; O'Reilly et al., 2006). Der Unterschied zu *rngo*-Keimbahnklonen ist jedoch, dass *src64*- und *tec29*-Keimbahnklone eine erhöhte

Anzahl von Zellkernen besitzen. Es können Eikammern mit 30 Nährzellen und zwei Oozyten, sowie Eikammern mit 60 Nährzellen und vier Oozyten beobachtet werden. Diese Anzahl ist ein zwei- bzw. vierfaches von 16, was darauf schließen lässt, dass hier entweder mehrere Eikammern miteinander fusioniert sind oder aber im Germarium nicht nur vier sondern mehrere Zellteilungen mit unvollständiger Zytokinese vollzogen wurden. Im Gegensatz dazu können in *rngo*-Keimbahnklonen immer 15 Nährzellen und eine Oozyte beobachtet werden. Auch ist in *src64*- und *tec29*-Keimbahnklonen die Lokalisierung von G-Aktin gestört. G-Aktin lokalisiert in wildtypischen und *rngo*-Keimbahnklonen in einem Bereich, der den Oozytenkern umgibt. In *src64*- und *tec29*-Keimbahnklonen hingegen akkumuliert weitestgehend kein G-Aktin mehr am Karyosom (Djagaeva et al., 2005).

In Arp2/3-Keimbahnklonen ist das subkortikale F-Aktin destabilisiert und Ringkanäle lösen sich von der Plasmamembran der Keimbahnzellen ab. Dies ist wahrscheinlich der Grund, warum in diesen Mutanten binukleäre Zellen auftreten. Da dieser Phänotyp erst spät in der Oogenese auftritt und die Ringkanäle zwar kleiner sind aber etabliert werden, sind auch hier wie in *rngo*-Keimbahnklonen keine Defekte während der vier mitotischen Teilungen im Germarium zu erwarten. Jedoch können in Arp2/3-Keimbahnklonen, im Gegensatz zu *rngo*-Keimbahnklonen, noch Eikammern im Stadium 10 und später beobachtet werden (Hudson und Cooley, 2002). Daher kann es sein, dass Rngo mit dem Arp2/3-Komplex interagiert, aber auch noch weitere Proteine oder Proteinkomplexe reguliert.

Zwei Proteine (Chickadee, Chic und Cappuccino, Capu), die für die Nukleation von Aktinfilamenten notwendig sind, zeigen ebenfalls multinukleäre Zellen während der Oogenese (Manseau et al., 1996; Verheyen und Cooley, 1994). Es wird jedoch angenommen, dass die multinukleären Zellen in *chic*- (*Drosophila Profilin*) und *capu*-Keimbahnklonen das Resultat von Defekten während der Zytokinese der vier mitotischen Teilungen im Germarium sind, denn es konnte eine große Variation von Nährzellen und Nährzellkernen beobachtet werden. In manchen Eikammern waren nur zwei, in anderen bis zu 30 Nährzellen zu verzeichnen, die alle mehrere Nährzellkerne besitzen. Also scheinen hier entweder zu viele oder zu wenig Zellteilungen während der Ausbildung der 16-Zellzyste durchgeführt worden zu sein (Manseau et al., 1996; Verheyen und Cooley, 1994). Es wurde bereits beschrieben, dass die Lokalisierung von Chic am Leitsaum von invaginierenden Membranen wichtig für die Zellularisierung von Embryonen ist. Da die Zellularisierung und die Formation der

arretierten Teilungsfurchen einem ähnlichen Mechanismus unterliegen, könnte die Funktion von Chic auch einen Einfluss auf die Etablierung der Teilungsfurchen haben (Warn und Robert-Nicoud, 1990). Zusätzlich zu den identischen Phänotypen in *chic*- und *capu*-Keimbahnklonen konnte in einem Hefe zwei-Hybrid-Screen eine direkte Interaktion von Chic und Capu beschrieben werden. Dies lässt den Rückschluss zu, dass beide Proteine zusammen an dem eben erwähnten Prozess beteiligt sind (Manseau et al., 1996). Da die Formation der 16-Zellzyste in *rngo*-Keimbahnklonen jedoch korrekt verläuft, kann ein Einfluss von Rngo auf Chic oder Capu im Hinblick auf das Auftreten von binuklearen Zellen ausgeschlossen werden.

Die Depolymerisierung und damit die Dynamik von Aktinfilamenten wird in *Drosophila* durch das ADF (*actin depolymerizing factor*)/Cofilin Homolog Twinstar (Tsr) reguliert. Mutationen in *tsr* zeigen eine Verzögerung der Migration von Grenzzellen (*border cells*) vom anterioren Teil der Eikammer zum anterioren Bereich der Oozyte. Während der Untersuchung der Zellmigration konnten in *tsr*-Mutanten Nährzellkerne beobachtet werden, die in die Oozyte eingewandert sind. Die Autoren haben jedoch nicht spekuliert oder weiter verfolgt, welchen Einfluss Tsr auf diesen Prozess haben könnte (Chen et al., 2001). Es ist auch nicht bekannt, ob der Verlust von Tsr die Regulierung von subkortikalen oder zytoplasmatischen Aktinfilamenten beeinflusst. Da die Defekte erst im Stadium 10 der Oogenese beschrieben wurden, ist es wahrscheinlich, dass die Nährzellkerne während des *nurse cell dumpings* in Folge von destabilisierten zytoplasmatischen Aktinfilamenten nicht mehr von einem Aktinnetzwerks festgehalten werden und so in die Oozyte einwandern können. Im Gegensatz dazu degeneriert die Plasmamembran der Keimbahnzellen in *rngo*-Keimbahnklonen aber schon in früheren Stadien der Oogenese.

Auch die Eliminierung des RNA-bindenden Proteins Lark führt zu fehlerhaftem *nurse cell dumping* und somit zum Einwandern von Nährzellkernen in die Oozyte. *lark*-Keimbahnklone zeigen die Invasion von Nährzellkernen, im Gegensatz zu *rngo*-Keimbahnklonen, aber erst in späteren Stadien der Oogenese. Es wird vermutet, dass auch bei *lark*-Keimbahnklonen das zytoplasmatische Netzwerk aus Aktinfilamenten nicht mehr in der Lage ist, die Nährzellkerne während des schnellen Transports von Proteinen in die Oozyte zurückzuhalten. Die Ringkanäle in *lark* mutanten Ovarien scheinen korrekt etabliert zu werden, da bis auf Hts-RC alle getesteten Ringkanalproteine an diesen lokalisieren. Hts-RC kann zwar ebenfalls an den Ringkanälen detektiert werden, jedoch ist Hts-RC zu einem großen Teil im

Zytoplasma der Nährzellen verteilt. Deshalb scheint der Effekt spezifisch für Hts-RC und nicht für eines der anderen Ringkanal-assoziierten Proteine zu sein (McNeil et al., 2004). *rngo*-Keimbahnklone hingegen zeigen eine Fehlverteilung von allen untersuchten Ringkanal-assoziierten Proteinen.

Der Phänotyp von binukleären Zellen in der Keimbahn ist aber nicht nur auf Mutationen in Genen zurückzuführen, deren Expression in der Keimbahn inhibiert wird. Das *Drosophila* Gen *cut* kodiert für ein Homeodomänen Protein, welches in einem Signalweg von den Follikel- zu den Keimbahnzellen beteiligt ist. Cut wird nur in den somatischen Follikelzellen benötigt, denn *cut*-Keimbahnklone haben keine Auswirkung auf die Entwicklung der Fliege. Follikelzellklone von *cut* führen durch die Destabilisierung des Aktinzytoskeletts zur Degenerierung der Plasmamembran von Keimbahnzellen, welche die Nährzellen voneinander trennt (Jackson und Berg, 1999). In einem Screen konnten genetische Interaktionen von *cut* mit schon bekannten Genen beschrieben werden, die zu einer Degenerierung der Plasmamembran und damit zu binukleären Nährzellkernen führen. Als ein Beispiel soll hier das Gen *ovarian tumor* (*otu*) aufgeführt werden. Mutationen in *otu* verursachen eine große Bandbreite von Phänotypen in der Keimbahn, wie z.B. tumorhafte Eikammern und Defekte während des *nurse cell dumpings* (King et al., 1986; King und Storto, 1988). Es wird vermutet, dass diese Phänotypen aus einer Fehlregulierung des Aktinzytoskeletts resultieren (Rodesch et al., 1997). In dem oben erwähnten Screen wurden Fliegen erzeugt, die doppelt heterozygot für *cut* und *otu* sind. Die Ovarien dieser Fliegen wiesen binukleäre Zellen in der Keimbahn auf, zeigten aber keinen der anderen *otu*-Phänotypen. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Cut und Otu während der Oogenese kooperieren und die Stabilität der Keimbahn-Plasmamembran beeinflussen (Jackson und Berg, 1999). Im Gegensatz dazu konnten vorläufige Daten von *rngo*-Follikelzellklonen keinen Einfluss von Rngo auf einen Signalweg von den Follikel- zu den Keimbahnzellen zeigen. Eikammern, deren gesamtes Follikel epithel mutant für *rngo* ist, scheinen sich wie der Wildtyp zu entwickeln. Die Daten wurden aber nicht im Ergebnisteil erwähnt, da großflächige Follikelzellklone nur mit Hilfe des *ovo^{DI}*-Allels und nicht mit GFP-markierten FRT-Chromosomen induziert werden konnten. Da das *ovo^{DI}*-Allel aber einen Einfluss auf die Entwicklung der Eikammern hat und hierfür keine adäquaten Kontrollen verfügbar sind, müssen die Versuche mit GFP-Follikelzellklonen durchgeführt werden, um klare Aussagen treffen zu können.

Durch die gezeigten Ergebnisse wird deutlich, dass *Rngo* eine Funktion in der Stabilisierung der Plasmamembran in der Keimbahn hat. Fast alle der in der Literatur erwähnten Phänotypen zeigen jedoch eine Fusion von zwei Nährzellen, falls die Degenerierung der Plasmamembran vor dem *nurse cell dumping* auftritt. Dagegen kann in *rngo*-Keimbahnklonen sehr häufig beobachtet werden, dass die Destabilisierung der Plasmamembran zuerst bei der Membran auftritt, welche die Oozyte von den daneben liegenden Nährzellen trennt. Im weiteren Verlauf degeneriert die Plasmamembran der Keimbahnzellen dann von posterior nach anterior. Da diese Phänotypen in *rngo*-Keimbahnklonen schon früh während der Oogenese auftreten und keine Stadium 10 Eikammer beobachtet werden konnten, beschränkt sich der Defekt auf die Destabilisierung des subkortikalen F-Aktins, da zytoplasmatische Aktinfilamente erst ab dem Stadium 10 etabliert werden.

4.4 *rngo*-Keimbahnklone zeigen eine atypische Morphologie der Nährzellkerne und des Oozytenkerns

Nach vier mitotischen Teilungen mit unvollendeter Zytokinese besteht eine Eikammer von *Drosophila* aus einer 16-Zellzyste, die eine Oozyte und 15 Nährzellen beinhaltet. Der Zellkern der Oozyte ist während der gesamten Oogenese transkriptionell inaktiv. Um das Wachstum der Oozyte zu unterstützen, werden die Nährzellkerne polyploid und produzieren Proteine und RNAs, die durch die Ringkanäle in die Oozyte transportiert werden. Die polyploiden Nährzellkerne entstehen durch Endoreplikation, bei der die DNA ohne anschließende Mitose repliziert wird. Das Einleiten der Mitose wird durch den Abbau von Cyclin A und B durch den APC (*anaphase promoting complex*) unterdrückt (Kashevsky et al., 2002; Reed und Orr-Weaver, 1997; Royzman und Orr-Weaver, 1998). Das Durchlaufen des Endozyklus und die damit verbundene Einleitung von der G₁- zur S-Phase wird durch Cyclin E (CycE) kontrolliert. CycE bindet an Cdk2 (*cyclin dependent kinase 2*) und aktiviert dadurch diese Kinase, welche im Anschluss die S-Phase einleitet (Lilly und Spradling, 1996). Eine negative Regulierung dieses aktiven Komplexes wird durch den CKI (*cyclin dependent kinase inhibitor*) Dacapo (Dap) vermittelt (de Nooij et al., 2000). In *rngo*-Keimbahnklonen konnten Nährzellkerne mit einer atypischen Morphologie beobachtet werden. Diese Kerne waren größer als im Wildtyp, was im ersten Moment auf eine erhöhte

Endoreplikation schließen lässt. Doch die Expression von CycE zeigt in diesen Mutanten keinen Unterschied zu Kontrollkeimbahnklonen. Falls eine erhöhte Anzahl an Endoreplikationen durchgeführt werden würde, wäre es zu erwarten, dass auch die Anzahl der Nährzellkerne, die CycE exprimieren, gesteigert wäre. Es könnten in einem potentiellen Mosaikkeimbahnklon aber auch kleinere, fragmentierte Nährzellkerne im Vergleich zu den benachbarten wildtypischen Kernen beobachtet werden. Diese untypische Morphologie wurde auch in Mutanten für *dap*, dem CycE/Cdk2 Inhibitor beschrieben. Es wurde gezeigt, dass durch das Fehlen dieses Inhibitors die S-Phase der Endozyklen verlängert und so mehr Heterochromatin repliziert wird. Dieses führt zu einer stärkeren Kondensation der Zellkerne, da Heterochromatin dichter gepackt ist als Euchromatin (Hong et al., 2003; Hong et al., 2007). Jedoch muss man mit der Interpretation des potentiellen Mosaikkeimbahnklons vorsichtig sein, da hier auch eine Fusion von zwei Eikammern stattgefunden haben könnte und die kleineren Kerne sich dann auf eine jüngere Eikammer zurückführen lassen. Außerdem konnte im Verlauf dieser Arbeit nur ein Mosaikklon beobachtet und so keine Vergleiche zu anderen Mosaikeikammern hergestellt werden. Interessanterweise wurden im Hinblick auf die Regulierung des Aktinzytoskeletts durch *Rngo* auch Aktin-assoziierte Proteine beschrieben, die eine Rolle während der Zellzykluskontrolle spielen. Zum Beispiel führen Mutationen in *tsr* (*Drosophila Cofilin*) und *diaphanous* (*dia*), einem Formin-ähnlichen Protein, zu polyploiden Neuroblasten in larvalen Gehirnen (Castrillon und Wasserman, 1994; Gunsalus et al., 1995). Auch konnte eine Rolle von Cofilin während der Zellzykluskontrolle in humanen Lungenkrebszelllinien beschrieben werden. Wird Cofilin in diesen Zellen überexprimiert, induziert dies die Expression von *p27^{kip}*, dem Säuger-Homolog von *dap*. Dies resultiert in einer Arretierung des Zellzyklus in der G₁-Phase (Tsai et al., 2009). Auch die Phosphotyrosin-Kinase Tec29 reguliert die Endoreplikation in *Drosophila*. In wildtypischen embryonalen Speicheldrüsen beginnen Zellen am distalen Ende mit der Endoreplikation und dies setzt sich dann in einer Wellenbewegung bis zum proximalen Ende der Drüse fort. In *tec29*-Mutanten ist diese synchronisierte Progression der Endoreplikation gestört und läuft unkoordiniert ab (Chandrasekaran und Beckendorf, 2005).

Im Gegensatz zu den polyploiden Nährzellkernen ist der Oozytenkern transkriptionell inaktiv. Im Stadium 3 der Oogenese kondensiert er zu einem kompakten sphärischen Karyosom. In *rngo*-Keimbahnklonen können Oozytenkerne beobachtet werden, die nicht mehr diese kondensierte Form aufweisen. Die Kerne sind länglich und nicht

mehr kompakt. Ähnliche Phänotypen konnten auch in Mutanten für Aktin-assoziierte Proteine wie Tec29, Src64, Kel, Spire (Spir) und Chic gezeigt werden (Djagaeva et al., 2005). Die Autoren spekulieren, dass die Regulierung von Aktin einen Einfluss auf die Kondensation von Chromatin haben könnte. In wildtypischen Ovarien lokalisiert G-Aktin am Karyosom. Doch in den oben genannten Mutanten ist diese G-Aktin-Akkumulation nahezu verschwunden bzw. reduziert. Das bedeutet, dass die Umsetzung von G-Aktin zu F-Aktin und umgekehrt eine entscheidende Rolle für die Verdichtung des Chromatins spielen könnte.

Auch die Funktion des Rngo-Homologs Ddi1 (*DNA damage inducible 1*) könnte einen Aufschluss über die atypische Morphologie des Oozytenkerns, in *rngo*-Keimbahnklonen geben. Ddi1 arretiert den Zellzyklus beim Übergang von der Metaphase zur Anaphase als Reaktion auf einen DNA-Doppelstrangbruch (Clarke et al., 2001; Diaz-Martinez et al., 2006; Zhu und Xiao, 1998). In *Drosophila* wurden drei Proteine (Okra, spindle-B und spindle-D) beschrieben, die ebenfalls in die DNA-Reparatur nach einem Doppelstrangbruch involviert sind. Mutationen in *okra*, *spindle-B* und *spindle-D* führen wie in *rngo*-Keimbahnklonen zu einer atypischen Morphologie des Karyosoms (Abdu et al., 2003; Ghabrial et al., 1998). Also könnte Rngo in zwei Funktionen die Kondensation des Oozytenkerns regulieren. Erstens als F-Aktin modulierendes Protein und zweitens als Faktor, der während der DNA-Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen benötigt wird. Für eine Funktion von Rngo während der DNA-Reparatur konnten bis jetzt noch keine Hinweise gesammelt werden. Die Lokalisierung von Rngo an den Zellkernen der Keimbahnzellen lässt jedoch darauf schließen, dass Rngo an einem dieser Prozesse beteiligt sein könnte.

4.5 Rngo könnte als extraproteasomaler Polyubiquitinrezeptor die Regulierung und Degradierung von Zielproteinen durch das Proteasom beeinflussen

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist für die kontrollierte intrazelluläre Degradierung von Proteinen zuständig. Für die verschiedenen Prozesse innerhalb des UPS werden eine Vielzahl von Proteinen benötigt. Manche sind für die Ubiquitinierung von Substraten verantwortlich, andere erkennen diese markierten Proteine und transportieren sie zum Proteasom. Die Proteine, die eine N-terminale UBQ- und eine C-terminale UBA-Domäne besitzen, gehören zu der Familie der extraproteasomalen Polyubiquitinrezeptoren und vermitteln die Interaktion von ubiquitinierten Proteinen mit dem Proteasom. Die am besten untersuchten UBQ-UBA-Proteine aus der Hefe sind Rad23, Dsk2 und das Hefehomolog von Rngo, Ddi1/Vsm1. Für alle drei Proteine konnte gezeigt werden, dass sie an verschiedene Untereinheiten des Proteasoms binden. Gemeinsam haben alle die Interaktion mit der regulatorischen Untereinheit des Proteasoms Rpn10/p54 (Hefe/*Drosophila*). Rpn10 ist ebenfalls in der Lage polyubiquitinierte Proteine zu erkennen und rekrutiert diese für die Degradierung in der katalytischen 20S Untereinheit zum Proteasom. Da auch Ddi1/Vsm1, Rad23 und Dsk2 aneinander binden und bereits beschrieben wurde, dass sie zusammen die Regulierung von Zielproteinen steuern, wird davon ausgegangen, dass die UBQ-UBA-Proteine gemeinsam mit Rpn10 eine kooperative Rolle in der Ubiquitin-abhängigen Proteolyse spielen (Kang et al., 2006; Saeki et al., 2002). In dieser Arbeit wurde *in vitro* eine Interaktion von Rngo mit Ubiquitin und p54 nachgewiesen. Zusätzlich wurde gezeigt, dass nur die UBA-Domäne für die Bindung an Ubiquitin benötigt wird. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass Rngo wie Ddi1/Vsm1 für den Transport von ubiquitinierten Proteinen zum Proteasom und für die damit verbundene Degradierung dieser Proteine zuständig ist. Die gezeigte Interaktion wird durch die Kolokalisierung von Rngo mit dem Proteasom und Ubiquitin in wildtypischen Ovarien unterstützt. Jedoch konnte in dieser Arbeit nicht herausgefunden werden, welche Proteine als Substrat für Rngo dienen könnten. Die Diversität von Phänotypen in *rngo*-Keimbahnklonen weist darauf hin, dass viele verschiedene Proteine als Substrat von Rngo in Frage kommen.

Als einziges Protein der UBQ-UBA-Familie besitzt Rngo eine RVP-Domäne, die von der UBQ- und UBA-Domäne flankiert wird (Krylov und Koonin, 2001). Für Rngo und Ddi1/Vsm1 wird angenommen, dass diese retrovirale Aspartatprotease-Domäne eine

Rolle während der Degradierung von Zielproteinen spielt (Sirakis et al., 2006). Bislang konnte jedoch keine proteolytische Aktivität der RVP-Domäne beschrieben werden. Im Verlauf dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Rngo, vermittelt durch die RVP-Domäne, Homodimere bildet. Im Gegensatz zu nicht-retroviralen Aspartatproteasen wird das katalytische Zentrum des Proteins aus zwei Aspartaten gebildet, wobei jedes von einem Rngo-Monomer gestellt wird. Das potentielle katalytische Aspartat²⁵⁷ wird für die Dimerisierung des Proteins jedoch nicht benötigt. Biochemisch konnte keine proteolytische Aktivität von Rngo beschrieben werden. Die Überexpression von Deletionskonstrukten der RVP-Domäne und von GFP-Fusionsproteinen, die einen Aminosäureaustausch des Aspartats 257 zu einem Alanin besitzen, lassen jedoch auf eine proteolytische Aktivität der RVP-Domäne von Rngo schließen. Die Überexpression dieser beiden Transgene führt im Gegensatz zu FLRngo-GFP, Δ UBA-GFP und Δ UBQ-GFP zu einer Degenerierung der Plasmamembran der Keimbahnzellen, ganz ähnlich den Phänotypen in *rngo*-Keimbahnklonen. Dies lässt sich durch einen dominant-negativen Effekt der beiden Fusionsproteine erklären, indem die Funktion des wildtypischen Proteins inhibiert wird. D257A-GFP könnte an das wildtypische Rngo-Protein binden, jedoch durch den Aminosäureaustausch kein katalytisches Zentrum mit dem zweiten Aspartat aufbauen. Hierdurch würden Zielproteine, deren Funktion z.B. darin besteht F-Aktin zu destabilisieren, nicht mehr gespalten werden. Dies würde zu einer Degenerierung der Plasmamembran führen. In der Literatur wird darüber spekuliert, dass Rngo bzw. Ddi1/Vsm1 durch ihre RVP-Domäne als Deubiquitinierungs-Enzyme (DUB) fungieren könnten (Krylov und Koonin, 2001). Die Hypothese besagt, dass Rngo/Ddi1/Vsm1 Ubiquitin von polyubiquitinierten Proteinen abspaltet und so die Degradierung dieser Proteine durch das Proteasom verhindert. Wäre dieser Mechanismus durch den dominant-negativen Effekt von D257A-GFP gestört, würden die polyubiquitinierten Proteine stärker als üblich durch das Proteasom degradiert. Falls diese Zielproteine in der Stabilisierung und Aufrechterhaltung des Aktinzytoskeletts beteiligt sind, könnten die beobachteten Phänotypen auch als sekundäre Konsequenz aus der Störung der Regulierung des UPS resultieren.

4.6 Die Identifizierung von potentiellen Interaktionspartnern von Rngo

Durch eine Immunpräzipitation mit anschließender Auswertung der Präzipitate mittels Massenspektrometrie konnten potentielle Interaktionspartner von Rngo identifiziert werden. Unter ihnen waren Aktin-assoziierte Proteine wie Tsr, Tropomyosin (Tm), Zipper (Zip) und Aktin selbst. Da ein Einfluss von Rngo auf das Aktinzytoskelett nachgewiesen werden konnte und Rngo wahrscheinlich an der Degradierung von Zielproteinen durch das Proteasom beteiligt ist, wurde untersucht, ob sich der Proteingehalt der erwähnten Proteine in zygotischen *rngo*-Mutanten von Kontrolltieren unterscheidet. In diesem Versuch (Kapitel 3.8) konnte jedoch keine Veränderung in den Proteinmengen der untersuchten Proteine festgestellt werden. Es stellt sich nun die Frage, ob Rngo für die Degradierung oder für eine mögliche Modifizierung dieser Proteine benötigt wird. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Eine weitere Erklärung der Ergebnisse aus Kapitel 3.8 wäre, dass die ermittelten Proteine unspezifisch an die Agarose-Beads des GFP[®]-Trap Kits gebunden haben und so durch die massenspektrometrische Analyse identifiziert wurden. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass bestimmte Proteinklassen unspezifisch an Agarose-Beads binden (Trinkle-Mulcahy et al., 2008). Die am häufigsten auftretenden Proteinklassen sind zytoskelettale Proteine wie Aktin, Cofilin (Tsr), Myosin und Tm sowie Hitzeschock- und ribosomale Proteine. Auch die beiden zuletzt genannten Proteinklassen konnten durch die massenspektrometrische Analyse als Interaktionspartner von Rngo ausgemacht werden. In Koimmunpräzipitationen von Rngo und Tsr in S2-Zellen konnte in ca. 50% aller Versuche die Bildung eines Komplexes der beiden Proteine detektiert werden. Trinkle-Mulcahy und Kollegen konnten ebenfalls zeigen, dass Cofilin in 66,7% aller Versuche mit Gesamtzellproteinextrakten unspezifisch an Agarose-Beads bindet. Daher kann die gezeigte Interaktion von Rngo und Tsr auch darauf zurückzuführen sein, dass Tsr, zusammen mit Rngo, unspezifisch an die Agarose-Beads gebunden hat und dann im Western Blot als Interaktionspartner detektiert werden konnte. Diese Ergebnisse lassen an einer spezifischen Identifizierung der Interaktionspartner zweifeln.

4.7 Die potentielle Interaktion von Rngo und Bazooka

In einem Hefe zwei-Hybrid-Screen mit den drei PDZ-Domänen von Bazooka (Baz) wurde Rngo als potentieller Interaktionspartner von Baz identifiziert. Aufgrund der Funktion des Hefehomologs (Ddi1/Vsm1) von Rngo während der Exozytose wurde angenommen, dass Rngo den vesikulären Transport von Baz zur apikalen Plasmamembran in Epithelien und Neuroblasten vermitteln könnte. Jedoch konnte im Rahmen dieser Arbeit weder die Interaktion mit Baz noch ein Effekt von *rngo*-Keimbahnklonen auf die Polarität von Epithelien oder eine Rolle von Rngo während des vesikulären Transportes bestätigt werden. Daher wäre es möglich, dass Rngo in diesem Screen als falsch positiver Interaktionspartner identifiziert wurde. Interessanterweise konnte aber in Bezug auf die Ringkanal-Phänotypen in *rngo*-Keimbahnklonen eine Lokalisierung von Baz, der atypischen Proteinkinase C (aPKC), DE-Cadherin (DE-Cad) und Armadillo (Arm) an ringartigen Strukturen im Germarium gezeigt werden. Diese Strukturen spiegeln aber nicht die Ringkanäle wider, da Kofärbungen von Baz und Phalloidin ergeben haben, dass diese „Baz-Ringe“ im Vergleich zu den Ringkanälen einen doppelt so großen Durchmesser aufweisen (Cox et al., 2001). Keimbahnklon-Analysen von *baz* und *apkc* Null-Mutanten haben ergeben, dass diese beiden Proteine nicht für die Etablierung der „Baz-Ringe“ benötigt werden, da DE-Cad und Arm dort immer noch korrekt lokalisieren. Im Gegensatz dazu zeigen *De-cad*-Keimbahnklone eine gestörte Anordnung dieser ringähnlichen Strukturen und der Keimbahnzellen (Gonzalez-Reyes und St Johnston, 1998). Baz und aPKC sind jedoch, anders als DE-Cad und Arm, für die Spezifizierung der Oozyte zuständig. Also gehen die Autoren davon aus, dass die Komponenten der „Baz-Ringe“ essentiell für verschiedene zelluläre Funktionen wie z.B. Zelladhäsion und die Polarisierung der Zyste sind. Es wäre also auch möglich, dass durch Mutationen in *rngo* die Zelladhäsion der Keimbahnzellen gestört ist, denn *arm*- sowie *rngo*-Keimbahnklone weisen binukleäre Keimbahnzellen auf. Eine Interaktion von Rngo mit Baz in der Keimbahn ist unwahrscheinlich, da die Determinierung der Oozyte in *rngo*-Keimbahnklonen korrekt verläuft und Mutationen in *baz* zu einem Verlust der Oozyte und in Folge dessen zu einer 16-Zellzyste mit 16 Nährzellen führen.

Proteine können aber in verschiedenen Geweben unterschiedliche Funktionen ausüben. Während eine Interaktion von Rngo mit Baz während der Oogenese unwahrscheinlich erscheint, bedeutet das nicht, dass die beiden Proteine nicht in späteren

Entwicklungsstadien kooperative Aufgaben erfüllen. Es wäre also interessant zu untersuchen, ob der Verlust von *Rngo* einen Effekt auf die Etablierung des zentralen oder peripheren Nervensystems hat. Es wurde bereits für Aktin-assoziiert Proteine, wie Kel und Tsr eine Rolle in der Neurogenese beschrieben. Kel reguliert die Verzweigung von Dendriten und Tsr wird für das Wachstum von Axonen und die Proliferation von Neuroblasten benötigt (Djagaeva und Doronkin, 2009; Ng und Luo, 2004). In MDCK-Zellen konnte ein Bezug von Par-3 (Säugerhomolog von Baz) zu Cofilin (Säugerhomolog von Tsr) hergestellt werden. Par-3 inhibiert die Funktion der Lim Kinase 3, welche im Gegenzug Cofilin reguliert (Chen und Macara, 2006). Versuche zu dieser Fragestellung konnten aber in dieser Arbeit nicht durchgeführt werden, da *rngo*-Keimbahnklone die Oogenese nicht vollenden und die maternale Komponente von *Rngo* mögliche Phänotypen von zygotischen Mutanten überdeckt.

5 Zusammenfassung

Die Oogenese von *Drosophila* ist ein attraktives Modellsystem, um die Anordnung des Aktinzytoskeletts zu untersuchen. Zu Beginn der Oogenese wird eine 16-Zellzyste etabliert, in der alle Zellen durch Aktin-reiche zytoplasmatische Brücken, die sogenannten Ringkanäle, miteinander verbunden sind. Durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie konnten Proteine identifiziert werden, die zusammen mit F-Aktin am inneren Ring der Ringkanäle lokalisieren sowie Proteine, die näher an der Plasmamembran, dem äußeren Ring, positioniert sind. Zusammen regulieren diese Proteine die Stabilität und das Wachstum der Ringkanäle. Des Weiteren wurden subkortikale Aktinfilamente an der Plasmamembran der Keimbahnzellen beschrieben, sowie zytoplasmatische Aktinfilamente die ab Stadium 10 der Oogenese gebildet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein bisher nicht charakterisiertes Gen untersucht, dessen Protein einen Einfluss auf die Regulierung des Aktinzytoskeletts während der Oogenese von *Drosophila* hat. Keimbahnklone diese Gens zeigen einen Verlust von Ringkanälen in der Keimbahn, weshalb dem Gen der Name *rings lost (rngo)* verliehen wurde. Die zygotische Nullmutante von *rngo* ist pupal letal, was bedeutet, dass *rngo* essentiell für das Überleben der Fliege ist. Diese Letalität kann durch Transgene, die für GFP-Rngo-Fusionsproteine kodieren, gänzlich gerettet werden. Neben dem Verlust von Ringkanälen zeigen *rngo*-Keimbahnklone Defekte in der Größenkontrolle der Ringkanäle und eine Fehlverteilung von Ringkanal-assoziierten Proteinen. Des Weiteren ist eine Degenerierung der Plasmamembran von Keimbahnzellen und damit einhergehend das Einwandern von Nährzellkernen in die Oozyte sowie eine atypische Morphologie der Nährzellkerne und des Oozytenkerns zu beobachten. In *rngo*-mutanten Eikammern arretiert die Oogenese vor dem Stadium 9-10 jedoch ohne die Ausbildung von apoptotischen Merkmalen. Rngo weist durch seine Ubiquitin-ähnliche (UBQ)- und Ubiquitin-assoziierte (UBA)-Domäne die typische Struktur eines extraproteasomalen Polyubiquitinrezeptors auf. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Rngo genau wie andere extraproteasomale Polyubiquitinrezeptoren an das Proteasom sowie, vermittelt durch seine UBA-Domäne, an Ubiquitin bindet. Außerdem konnte durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie gezeigt werden, dass Rngo mit Ubiquitin und dem Proteasom in Ovarien kolokalisiert. Diese Ergebnisse legen die

Vermutung nahe, dass Rngo an der proteasomalen Degradierung von Proteinen beteiligt ist, die für die Aufrechterhaltung des Aktinzytoskeletts notwendig sind. Unter den extraproteasomalen Polyubiquitinrezeptoren nimmt Rngo eine Sonderrolle ein, da die UBA- und UBA-Domäne eine retrovirale Aspartatprotease-Domäne (RVP) flankieren. Durch die Homodimerisierung von Proteinen, die eine solche RVP-Domäne aufweisen, wird das katalytische Zentrum von zwei Aspartaten gebildet. Bisher wurde jedoch für die humanen Homologe (HDdi1/HDdi2) und das Homolog in der Hefe (Ddi1/Vsm1) keine proteolytische Aktivität dieser RVP-Domäne beschrieben. Wie schon für Ddi1/Vsm1 gezeigt, bildet auch Rngo, vermittelt durch die RVP-Domäne, Dimere. Das potentielle katalytische Aspartat257 wird hierfür nicht benötigt. In der vorliegenden Arbeit lassen jedoch Überexpressionsversuche von GFP-Fusionsproteinen, in denen das katalytische Aspartat257 gegen ein Alanin ausgetauscht wurde, auf eine solche proteolytische Funktion der RVP-Domäne von Rngo schließen. Es ist zu vermuten, dass dominant-negative Effekte einer Überexpression dieses GFP-D257A-Fusionsproteins, ähnlich der *rngo*-Keimbahnklone, zu einer Degenerierung der Plasmamembran in den Keimbahnzellen führen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein bisher nicht charakterisiertes Protein beschrieben, welches für die Etablierung und Anordnung des Aktinzytoskeletts verantwortlich ist. Weiterhin konnte Rngo als erstem Protein der Ddi1-Familie eine katalytische Aktivität der RVP-Domäne zugeordnet werden.

6 Literatur

Abdu, U., Gonzalez-Reyes, A., Ghabrial, A. und Schupbach, T. (2003). The *Drosophila* spn-D gene encodes a RAD51C-like protein that is required exclusively during meiosis. *Genetics* **165**, 197-204.

Adam, G., Gausz, J., Noselli, S., Kurucz, E., Ando, I. und Udvardy, A. (2004). Tissue- and developmental stage-specific changes in the subcellular localization of the 26S proteasome in the ovary of *Drosophila melanogaster*. *Gene Expr Patterns* **4**, 329-33.

Adams, R. R., Tavares, A. A., Salzberg, A., Bellen, H. J. und Glover, D. M. (1998). pavarotti encodes a kinesin-like protein required to organize the central spindle and contractile ring for cytokinesis. *Genes Dev* **12**, 1483-94.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Walter, P. (2008). *Molecular Biology Of The Cell*. New York: *Garland Publishing, Inc.*

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

Bachmann, A. und Knust, E. (2008). The use of P-element transposons to generate transgenic flies. *Methods Mol Biol* **420**, 61-77.

Bailly, M., Ichetovkin, I., Grant, W., Zebda, N., Machesky, L. M., Segall, J. E. und Condeelis, J. (2001). The F-actin side binding activity of the Arp2/3 complex is essential for actin nucleation and lamellipod extension. *Curr Biol* **11**, 620-5.

Bastock, R. und St Johnston, D. (2008). *Drosophila* oogenesis. *Curr Biol* **18**, R1082-7.

Bear, J. E. und Gertler, F. B. (2009). Ena/VASP: towards resolving a pointed controversy at the barbed end. *J Cell Sci* **122**, 1947-53.

Bertolaet, B. L., Clarke, D. J., Wolff, M., Watson, M. H., Henze, M., Divita, G. und Reed, S. I. (2001). UBA domains of DNA damage-inducible proteins interact with ubiquitin. *Nat Struct Biol* **8**, 417-22.

Bloom, J., Amador, V., Bartolini, F., DeMartino, G. und Pagano, M. (2003). Proteasome-mediated degradation of p21 via N-terminal ubiquitylation. *Cell* **115**, 71-82.

Bohrmann, J. und Biber, K. (1994). Cytoskeleton-dependent transport of cytoplasmic particles in previtellogenic to mid-vitellogenic ovarian follicles of *Drosophila*: time-lapse analysis using video-enhanced contrast microscopy. *J Cell Sci* **107 (Pt 4)**, 849-58.

Brand, A. H. und Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-15.

- Castrillon, D. H. und Wasserman, S. A.** (1994). Diaphanous is required for cytokinesis in *Drosophila* and shares domains of similarity with the products of the limb deformity gene. *Development* **120**, 3367-77.
- Chan, C., Beltzner, C. C. und Pollard, T. D.** (2009). Cofilin dissociates Arp2/3 complex and branches from actin filaments. *Curr Biol* **19**, 537-45.
- Chandrasekaran, V. und Beckendorf, S. K.** (2005). Tec29 controls actin remodeling and endoreplication during invagination of the *Drosophila* embryonic salivary glands. *Development* **132**, 3515-24.
- Chen, J., Godt, D., Gunsalus, K., Kiss, I., Goldberg, M. und Laski, F. A.** (2001). Cofilin/ADF is required for cell motility during *Drosophila* ovary development and oogenesis. *Nat Cell Biol* **3**, 204-9.
- Chen, X. und Macara, I. G.** (2006). Par-3 mediates the inhibition of LIM kinase 2 to regulate cofilin phosphorylation and tight junction assembly. *J Cell Biol* **172**, 671-8.
- Chou, T. B. und Perrimon, N.** (1992). Use of a yeast site-specific recombinase to produce female germline chimeras in *Drosophila*. *Genetics* **131**, 643-53.
- Christerson, L. B. und McKearin, D. M.** (1994). orb is required for anteroposterior and dorsoventral patterning during *Drosophila* oogenesis. *Genes Dev* **8**, 614-28.
- Clarke, D. J., Mondesert, G., Segal, M., Bertolaet, B. L., Jensen, S., Wolff, M., Henze, M. und Reed, S. I.** (2001). Dosage suppressors of pds1 implicate ubiquitin-associated domains in checkpoint control. *Mol Cell Biol* **21**, 1997-2007.
- Condeelis, J.** (1993). Understanding the cortex of crawling cells: insights from *Dictyostelium*. *Trends Cell Biol* **3**, 371-6.
- Cooley, L.** (1998). *Drosophila* ring canal growth requires Src and Tec kinases. *Cell* **93**, 913-5.
- Cooley, L. und Theurkauf, W. E.** (1994). Cytoskeletal functions during *Drosophila* oogenesis. *Science* **266**, 590-6.
- Cox, D. N., Seyfried, S. A., Jan, L. Y. und Jan, Y. N.** (2001). Bazooka and atypical protein kinase C are required to regulate oocyte differentiation in the *Drosophila* ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14475-80.
- D'Avino, P. P., Takeda, T., Capalbo, L., Zhang, W., Lilley, K. S., Laue, E. D. und Glover, D. M.** (2008). Interaction between Anillin and RacGAP50C connects the actomyosin contractile ring with spindle microtubules at the cell division site. *J Cell Sci* **121**, 1151-8.
- Davies, D. R.** (1990). The structure and function of the aspartic proteinases. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **19**, 189-215.
- de Cuevas, M., Lee, J. K. und Spradling, A. C.** (1996). alpha-spectrin is required for germline cell division and differentiation in the *Drosophila* ovary. *Development* **122**, 3959-68.

- de Cuevas, M. und Spradling, A. C.** (1998). Morphogenesis of the *Drosophila* fusome and its implications for oocyte specification. *Development* **125**, 2781-9.
- de Nooij, J. C., Graber, K. H. und Hariharan, I. K.** (2000). Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor Dacapo is regulated by cyclin E. *Mech Dev* **97**, 73-83.
- Dej, K. J. und Spradling, A. C.** (1999). The endocycle controls nurse cell polytene chromosome structure during *Drosophila* oogenesis. *Development* **126**, 293-303.
- Diaz-Martinez, L. A., Kang, Y., Walters, K. J. und Clarke, D. J.** (2006). Yeast UBL-UBA proteins have partially redundant functions in cell cycle control. *Cell Div* **1**, 28.
- Djagaeva, I. und Doronkin, S.** (2009). COP9 limits dendritic branching via Cullin3-dependent degradation of the actin-crosslinking BTB-domain protein Kelch. *PLoS One* **4**, e7598.
- Djagaeva, I., Doronkin, S. und Beckendorf, S. K.** (2005). Src64 is involved in fusome development and karyosome formation during *Drosophila* oogenesis. *Dev Biol* **284**, 143-56.
- Dodson, G. S., Guarnieri, D. J. und Simon, M. A.** (1998). Src64 is required for ovarian ring canal morphogenesis during *Drosophila* oogenesis. *Development* **125**, 2883-92.
- Doronkin, S., Djagaeva, I. und Beckendorf, S. K.** (2003). The COP9 signalosome promotes degradation of Cyclin E during early *Drosophila* oogenesis. *Dev Cell* **4**, 699-710.
- Edgar, B. A. und Orr-Weaver, T. L.** (2001). Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell* **105**, 297-306.
- Edwards, K. A. und Kiehart, D. P.** (1996). *Drosophila* nonmuscle myosin II has multiple essential roles in imaginal disc and egg chamber morphogenesis. *Development* **122**, 1499-511.
- Elsasser, S. und Finley, D.** (2005). Delivery of ubiquitinated substrates to protein-unfolding machines. *Nat Cell Biol* **7**, 742-9.
- Elsasser, S., Gali, R. R., Schwickart, M., Larsen, C. N., Leggett, D. S., Muller, B., Feng, M. T., Tubing, F., Dittmar, G. A. und Finley, D.** (2002). Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. *Nat Cell Biol* **4**, 725-30.
- Ferron, F., Rebowski, G., Lee, S. H. und Dominguez, R.** (2007). Structural basis for the recruitment of profilin-actin complexes during filament elongation by Ena/VASP. *EMBO J* **26**, 4597-606.
- Field, C. M. und Alberts, B. M.** (1995). Anillin, a contractile ring protein that cycles from the nucleus to the cell cortex. *J Cell Biol* **131**, 165-78.

- Gabriely, G., Kama, R., Gelin-Licht, R. und Gerst, J. E.** (2008). Different domains of the UBL-UBA ubiquitin receptor, Ddi1/Vsm1, are involved in its multiple cellular roles. *Mol Biol Cell* **19**, 3625-37.
- Geiss-Friedlander, R. und Melchior, F.** (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 947-56.
- Ghabrial, A., Ray, R. P. und Schupbach, T.** (1998). okra and spindle-B encode components of the RAD52 DNA repair pathway and affect meiosis and patterning in *Drosophila* oogenesis. *Genes Dev* **12**, 2711-23.
- Glickman, M. H., Rubin, D. M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V. A. und Finley, D.** (1998). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* **94**, 615-23.
- Golic, K. G. und Lindquist, S.** (1989). The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* **59**, 499-509.
- Gonzalez-Reyes, A. und St Johnston, D.** (1998). The *Drosophila* AP axis is polarised by the cadherin-mediated positioning of the oocyte. *Development* **125**, 3635-44.
- Grabbe, C. und Dikic, I.** (2009). Functional roles of ubiquitin-like domain (ULD) and ubiquitin-binding domain (UBD) containing proteins. *Chem Rev* **109**, 1481-94.
- Guarnieri, D. J., Dodson, G. S. und Simon, M. A.** (1998). SRC64 regulates the localization of a Tec-family kinase required for *Drosophila* ring canal growth. *Mol Cell* **1**, 831-40.
- Guha, M., Zhou, M. und Wang, Y. L.** (2005). Cortical actin turnover during cytokinesis requires myosin II. *Curr Biol* **15**, 732-6.
- Guild, G. M., Connelly, P. S., Shaw, M. K. und Tilney, L. G.** (1997). Actin filament cables in *Drosophila* nurse cells are composed of modules that slide passively past one another during dumping. *J Cell Biol* **138**, 783-97.
- Gunsalus, K. C., Bonaccorsi, S., Williams, E., Verni, F., Gatti, M. und Goldberg, M. L.** (1995). Mutations in twinstar, a *Drosophila* gene encoding a cofilin/ADF homologue, result in defects in centrosome migration and cytokinesis. *J Cell Biol* **131**, 1243-59.
- Gutzeit, H. O.** (1986). The role of microfilaments in cytoplasmic streaming in *Drosophila* follicles. *J Cell Sci* **80**, 159-69.
- Hartmann-Petersen, R. und Gordon, C.** (2004). Integral UBL domain proteins: a family of proteasome interacting proteins. *Semin Cell Dev Biol* **15**, 247-59.
- Hartshorne, D. J., Ito, M. und Erdodi, F.** (1998). Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *J Muscle Res Cell Motil* **19**, 325-41.
- Hershko, A. und Ciechanover, A.** (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**, 425-79.

- Hickson, G. R. und O'Farrell, P. H.** (2008). Rho-dependent control of anillin behavior during cytokinesis. *J Cell Biol* **180**, 285-94.
- Hochstrasser, M.** (2009). Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature* **458**, 422-9.
- Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakis, G. und Jentsch, S.** (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**, 135-41.
- Hong, A., Lee-Kong, S., Iida, T., Sugimura, I. und Lilly, M. A.** (2003). The p27cip/kip ortholog dacapo maintains the *Drosophila* oocyte in prophase of meiosis I. *Development* **130**, 1235-42.
- Hong, A., Narbonne-Reveau, K., Riesgo-Escovar, J., Fu, H., Aladjem, M. I. und Lilly, M. A.** (2007). The cyclin-dependent kinase inhibitor Dacapo promotes replication licensing during *Drosophila* endocycles. *EMBO J* **26**, 2071-82.
- Hudson, A. M. und Cooley, L.** (2010). *Drosophila* Kelch functions with Cullin-3 to organize the ring canal actin cytoskeleton. *J Cell Biol* **188**, 29-37.
- Hudson, A. M. und Cooley, L.** (2002). A subset of dynamic actin rearrangements in *Drosophila* requires the Arp2/3 complex. *J Cell Biol* **156**, 677-87.
- Husnjak, K., Elsasser, S., Zhang, N., Chen, X., Randles, L., Shi, Y., Hofmann, K., Walters, K. J., Finley, D. und Dikic, I.** (2008). Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. *Nature* **453**, 481-8.
- Huynh, J. R. und St Johnston, D.** (2004). The origin of asymmetry: early polarisation of the *Drosophila* germline cyst and oocyte. *Curr Biol* **14**, R438-49.
- Ivantsiv, Y., Kaplun, L., Tzirkin-Goldin, R., Shabek, N. und Raveh, D.** (2006). Unique role for the Ubl-UbA protein Ddi1 in turnover of SCFUfo1 complexes. *Mol Cell Biol* **26**, 1579-88.
- Jackson, S. M. und Berg, C. A.** (1999). Soma-to-germline interactions during *Drosophila* oogenesis are influenced by dose-sensitive interactions between cut and the genes cappuccino, ovarian tumor and agnostic. *Genetics* **153**, 289-303.
- Jackson, S. M. und Berg, C. A.** (2002). An A-kinase anchoring protein is required for protein kinase A regulatory subunit localization and morphology of actin structures during oogenesis in *Drosophila*. *Development* **129**, 4423-33.
- Johnson, K. und Wodarz, A.** (2003). A genetic hierarchy controlling cell polarity. *Nat Cell Biol* **5**, 12-4.
- Kabsch, W. und Vandekerckhove, J.** (1992). Structure and function of actin. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **21**, 49-76.
- Kai, T. und Spradling, A.** (2004). Differentiating germ cells can revert into functional stem cells in *Drosophila melanogaster* ovaries. *Nature* **428**, 564-9.

- Kaiser, P. und Huang, L.** (2005). Global approaches to understanding ubiquitination. *Genome Biol* **6**, 233.
- Kalderon, D. und Rubin, G. M.** (1988). Isolation and characterization of *Drosophila* cAMP-dependent protein kinase genes. *Genes Dev* **2**, 1539-56.
- Kang, Y., Vossler, R. A., Diaz-Martinez, L. A., Winter, N. S., Clarke, D. J. und Walters, K. J.** (2006). UBL/UBA ubiquitin receptor proteins bind a common tetraubiquitin chain. *J Mol Biol* **356**, 1027-35.
- Kaplun, L., Tzirkin, R., Bakhrat, A., Shabek, N., Ivantsiv, Y. und Raveh, D.** (2005). The DNA damage-inducible Ubl-UbA protein Ddi1 participates in Mec1-mediated degradation of Ho endonuclease. *Mol Cell Biol* **25**, 5355-62.
- Karin, M. und Ben-Neriah, Y.** (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* **18**, 621-63.
- Kashevsky, H., Wallace, J. A., Reed, B. H., Lai, C., Hayashi-Hagihara, A. und Orr-Weaver, T. L.** (2002). The anaphase promoting complex/cyclosome is required during development for modified cell cycles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11217-22.
- Kelso, R. J., Hudson, A. M. und Cooley, L.** (2002). *Drosophila* Kelch regulates actin organization via Src64-dependent tyrosine phosphorylation. *J Cell Biol* **156**, 703-13.
- Kim, I., Mi, K. und Rao, H.** (2004). Multiple interactions of rad23 suggest a mechanism for ubiquitylated substrate delivery important in proteolysis. *Mol Biol Cell* **15**, 3357-65.
- King, R. C.** (1970). The meiotic behavior of the *Drosophila* oocyte. *Int Rev Cytol* **28**, 125-68.
- King, R. C., Mohler, D., Riley, S. F., Storto, P. D. und Nicolazzo, P. S.** (1986). Complementation between alleles at the ovarian tumor locus of *Drosophila melanogaster*. *Dev Genet* **7**, 1-20.
- King, R. C. und Storto, P. D.** (1988). The role of the *otu* gene in *Drosophila* oogenesis. *Bioessays* **8**, 18-24.
- Knust, E. und Bossinger, O.** (2002). Composition and formation of intercellular junctions in epithelial cells. *Science* **298**, 1955-9.
- Kondo, K. und Kaelin, W. G., Jr.** (2001). The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Exp Cell Res* **264**, 117-25.
- Krahn, M. P., Klopfenstein, D. R., Fischer, N. und Wodarz A.** (2010). Membrane targeting of Bazooka/PAR-3 is mediated by direct binding to phosphoinositide lipids. *Curr Biol*.
- Krylov, D. M. und Koonin, E. V.** (2001). A novel family of predicted retroviral-like aspartyl proteases with a possible key role in eukaryotic cell cycle control. *Curr Biol* **11**, R584-7.

- Kurz, T., Pintard, L., Willis, J. H., Hamill, D. R., Gonczy, P., Peter, M. und Bowerman, B.** (2002). Cytoskeletal regulation by the Nedd8 ubiquitin-like protein modification pathway. *Science* **295**, 1294-8.
- Li, M. G., Serr, M., Edwards, K., Ludmann, S., Yamamoto, D., Tilney, L. G., Field, C. M. und Hays, T. S.** (1999). Filamin is required for ring canal assembly and actin organization during *Drosophila* oogenesis. *J Cell Biol* **146**, 1061-74.
- Li, X., Su, V., Kurata, W. E., Jin, C. und Lau, A. F.** (2008). A novel connexin43-interacting protein, CIP75, which belongs to the UbL-UBA protein family, regulates the turnover of connexin43. *J Biol Chem* **283**, 5748-59.
- Lilly, M. A. und Spradling, A. C.** (1996). The *Drosophila* endocycle is controlled by Cyclin E and lacks a checkpoint ensuring S-phase completion. *Genes Dev* **10**, 2514-26.
- Lin, H., Yue, L. und Spradling, A. C.** (1994). The *Drosophila* fusome, a germline-specific organelle, contains membrane skeletal proteins and functions in cyst formation. *Development* **120**, 947-56.
- Liu, J. L., Buszczak, M. und Gall, J. G.** (2006). Nuclear bodies in the *Drosophila* germinal vesicle. *Chromosome Res* **14**, 465-75.
- Liu, Y. und Xiao, W.** (1997). Bidirectional regulation of two DNA-damage-inducible genes, MAG1 and DDI1, from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **23**, 777-89.
- Lu, N., Guarnieri, D. J. und Simon, M. A.** (2004). Localization of Tec29 to ring canals is mediated by Src64 and PtdIns(3,4,5)P3-dependent mechanisms. *EMBO J* **23**, 1089-100.
- Lustgarten, V. und Gerst, J. E.** (1999). Yeast VSM1 encodes a v-SNARE binding protein that may act as a negative regulator of constitutive exocytosis. *Mol Cell Biol* **19**, 4480-94.
- Manseau, L., Calley, J. und Phan, H.** (1996). Profilin is required for posterior patterning of the *Drosophila* oocyte. *Development* **122**, 2109-16.
- Marash, M. und Gerst, J. E.** (2003). Phosphorylation of the autoinhibitory domain of the Sso t-SNAREs promotes binding of the Vsm1 SNARE regulator in yeast. *Mol Biol Cell* **14**, 3114-25.
- McCall, K.** (2004). Eggs over easy: cell death in the *Drosophila* ovary. *Dev Biol* **274**, 3-14.
- McGough, A., Pope, B., Chiu, W. und Weeds, A.** (1997). Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *J Cell Biol* **138**, 771-81.
- McNeil, G. P., Smith, F. und Galioto, R.** (2004). The *Drosophila* RNA-binding protein Lark is required for the organization of the actin cytoskeleton and Hu-li tai shao localization during oogenesis. *Genesis* **40**, 90-100.

- Melchior, F.** (2000). SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 591-626.
- Mullins, R. D., Heuser, J. A. und Pollard, T. D.** (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6181-6.
- Murphy, A. M. und Montell, D. J.** (1996). Cell type-specific roles for Cdc42, Rac, and RhoL in *Drosophila* oogenesis. *J Cell Biol* **133**, 617-30.
- Murthy, K. und Wadsworth, P.** (2005). Myosin-II-dependent localization and dynamics of F-actin during cytokinesis. *Curr Biol* **15**, 724-31.
- Ng, J. und Luo, L.** (2004). Rho GTPases regulate axon growth through convergent and divergent signaling pathways. *Neuron* **44**, 779-93.
- O'Reilly, A. M., Ballew, A. C., Miyazawa, B., Stocker, H., Hafen, E. und Simon, M. A.** (2006). Csk differentially regulates Src64 during distinct morphological events in *Drosophila* germ cells. *Development* **133**, 2627-38.
- Ohh, M., Kim, W. Y., Moslehi, J. J., Chen, Y., Chau, V., Read, M. A. und Kaelin, W. G., Jr.** (2002). An intact NEDD8 pathway is required for Cullin-dependent ubiquitylation in mammalian cells. *EMBO Rep* **3**, 177-82.
- Ong, S. und Tan, C.** (2010). Germline cyst formation and incomplete cytokinesis during *Drosophila melanogaster* oogenesis. *Dev Biol* **337**, 84-98.
- Petrella, L. N., Smith-Leiker, T. und Cooley, L.** (2007). The Ovhts polyprotein is cleaved to produce fusome and ring canal proteins required for *Drosophila* oogenesis. *Development* **134**, 703-12.
- Petronczki, M. und Knoblich, J. A.** (2001). DmPAR-6 directs epithelial polarity and asymmetric cell division of neuroblasts in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* **3**, 43-9.
- Pickart, C. M.** (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* **70**, 503-33.
- Pollard, T. D. und Cooper, J. A.** (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* **326**, 1208-12.
- Rao, H. und Sastry, A.** (2002). Recognition of specific ubiquitin conjugates is important for the proteolytic functions of the ubiquitin-associated domain proteins Dsk2 and Rad23. *J Biol Chem* **277**, 11691-5.
- Reed, B. H. und Orr-Weaver, T. L.** (1997). The *Drosophila* gene *morula* inhibits mitotic functions in the endo cell cycle and the mitotic cell cycle. *Development* **124**, 3543-53.
- Riparbelli, M. G. und Callaini, G.** (1995). Cytoskeleton of the *Drosophila* egg chamber: new observations on microfilament distribution during oocyte growth. *Cell Motil Cytoskeleton* **31**, 298-306.

- Robinson, D. N., Cant, K. und Cooley, L.** (1994). Morphogenesis of *Drosophila* ovarian ring canals. *Development* **120**, 2015-25.
- Robinson, D. N. und Cooley, L.** (1997a). *Drosophila* kelch is an oligomeric ring canal actin organizer. *J Cell Biol* **138**, 799-810.
- Robinson, D. N. und Cooley, L.** (1997b). Genetic analysis of the actin cytoskeleton in the *Drosophila* ovary. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 147-70.
- Robinson, D. N., Smith-Leiker, T. A., Sokol, N. S., Hudson, A. M. und Cooley, L.** (1997). Formation of the *Drosophila* ovarian ring canal inner rim depends on cheerio. *Genetics* **145**, 1063-72.
- Robinson, R. C., Turbedsky, K., Kaiser, D. A., Marchand, J. B., Higgs, H. N., Choe, S. und Pollard, T. D.** (2001). Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science* **294**, 1679-84.
- Rodesch, C., Pettus, J. und Nagoshi, R. N.** (1997). The *Drosophila* ovarian tumor gene is required for the organization of actin filaments during multiple stages in oogenesis. *Dev Biol* **190**, 153-64.
- Roulier, E. M., Panzer, S. und Beckendorf, S. K.** (1998). The Tec29 tyrosine kinase is required during *Drosophila* embryogenesis and interacts with Src64 in ring canal development. *Mol Cell* **1**, 819-29.
- Royzman, I. und Orr-Weaver, T. L.** (1998). S phase and differential DNA replication during *Drosophila* oogenesis. *Genes Cells* **3**, 767-76.
- Saeki, Y., Saitoh, A., Toh-e, A. und Yokosawa, H.** (2002). Ubiquitin-like proteins and Rpn10 play cooperative roles in ubiquitin-dependent proteolysis. *Biochem Biophys Res Commun* **293**, 986-92.
- Schreiner, P., Chen, X., Husnjak, K., Randles, L., Zhang, N., Elsassner, S., Finley, D., Dikic, I., Walters, K. J. und Groll, M.** (2008). Ubiquitin docking at the proteasome through a novel pleckstrin-homology domain interaction. *Nature* **453**, 548-52.
- Scott, J. D. und McCartney, S.** (1994). Localization of A-kinase through anchoring proteins. *Mol Endocrinol* **8**, 5-11.
- Sherman, M. Y. und Goldberg, A. L.** (2001). Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron* **29**, 15-32.
- Sirkis, R., Gerst, J. E. und Fass, D.** (2006). Ddi1, a eukaryotic protein with the retroviral protease fold. *J Mol Biol* **364**, 376-87.
- Small, J. V.** (1989). Microfilament-based motility in non-muscle cells. *Curr Opin Cell Biol* **1**, 75-9.
- Sokol, N. S. und Cooley, L.** (1999). *Drosophila* filamin encoded by the cheerio locus is a component of ovarian ring canals. *Curr Biol* **9**, 1221-30.

- Stelter, P. und Ulrich, H. D.** (2003). Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature* **425**, 188-91.
- Storto, P. D. und King, R. C.** (1989). The role of polyfusomes in generating branched chains of cystocytes during *Drosophila* oogenesis. *Dev Genet* **10**, 70-86.
- Tan, C., Stronach, B. und Perrimon, N.** (2003). Roles of myosin phosphatase during *Drosophila* development. *Development* **130**, 671-81.
- Theriot, J. A. und Mitchison, T. J.** (1993). The three faces of profilin. *Cell* **75**, 835-8.
- Theurkauf, W. E., Smiley, S., Wong, M. L. und Alberts, B. M.** (1992). Reorganization of the cytoskeleton during *Drosophila* oogenesis: implications for axis specification and intercellular transport. *Development* **115**, 923-36.
- Trinkle-Mulcahy, L., Boulon, S., Lam, Y. W., Urcia, R., Boisvert, F. M., Vandermoere, F., Morrice, N. A., Swift, S., Rothbauer, U., Leonhardt, H. et al.** (2008). Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes. *J Cell Biol* **183**, 223-39.
- Tsai, C. H., Chiu, S. J., Liu, C. C., Sheu, T. J., Hsieh, C. H., Keng, P. C. und Lee, Y. J.** (2009). Regulated expression of cofilin and the consequent regulation of p27(kip1) are essential for G(1) phase progression. *Cell Cycle* **8**, 2365-74.
- van Nocker, S., Sadis, S., Rubin, D. M., Glickman, M., Fu, H., Coux, O., Wefes, I., Finley, D. und Vierstra, R. D.** (1996). The multiubiquitin-chain-binding protein Mcb1 is a component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a nonessential, substrate-specific role in protein turnover. *Mol Cell Biol* **16**, 6020-8.
- Verheyen, E. M. und Cooley, L.** (1994). Profilin mutations disrupt multiple actin-dependent processes during *Drosophila* development. *Development* **120**, 717-28.
- Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W. H., Yates, J. R., 3rd, Koonin, E. V. und Deshaies, R. J.** (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* **298**, 611-5.
- Verma, R., Oania, R., Graumann, J. und Deshaies, R. J.** (2004). Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system. *Cell* **118**, 99-110.
- Voges, D., Zwickl, P. und Baumeister, W.** (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* **68**, 1015-68.
- Volkman, N., Amann, K. J., Stoilova-McPhie, S., Egile, C., Winter, D. C., Hazelwood, L., Heuser, J. E., Li, R., Pollard, T. D. und Hanein, D.** (2001). Structure of Arp2/3 complex in its activated state and in actin filament branch junctions. *Science* **293**, 2456-9.
- von Stein, W.** (2005). Charakterisierung von PTEN, FKBP59 und CG4420, Interaktionspartnern des PDZ-Domänen-Proteins Bazooka aus *Drosophila melanogaster*. *Doktorarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*.

- Warn, R. M. und Robert-Nicoud, M.** (1990). F-actin organization during the cellularization of the *Drosophila* embryo as revealed with a confocal laser scanning microscope. *J Cell Sci* **96** (Pt 1), 35-42.
- Wheatley, S., Kulkarni, S. und Karess, R.** (1995). *Drosophila* nonmuscle myosin II is required for rapid cytoplasmic transport during oogenesis and for axial nuclear migration in early embryos. *Development* **121**, 1937-46.
- Wodarz, A., Ramrath, A., Grimm, A. und Knust, E.** (2000). *Drosophila* atypical protein kinase C associates with Bazooka and controls polarity of epithelia and neuroblasts. *J Cell Biol* **150**, 1361-74.
- Wodarz, A., Ramrath, A., Kuchinke, U. und Knust, E.** (1999). Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* **402**, 544-7.
- Wu, C. J., Conze, D. B., Li, T., Srinivasula, S. M. und Ashwell, J. D.** (2006). Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation [corrected]. *Nat Cell Biol* **8**, 398-406.
- Xie, T. und Spradling, A. C.** (2000). A niche maintaining germ line stem cells in the *Drosophila* ovary. *Science* **290**, 328-30.
- Yao, T. und Cohen, R. E.** (2002). A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* **419**, 403-7.
- Yue, L. und Spradling, A. C.** (1992). hu-li tai shao, a gene required for ring canal formation during *Drosophila* oogenesis, encodes a homolog of adducin. *Genes Dev* **6**, 2443-54.
- Zhu, Y. und Xiao, W.** (1998). Differential regulation of two closely clustered yeast genes, MAG1 and DDI1, by cell-cycle checkpoints. *Nucleic Acids Res* **26**, 5402-8.

7 Anhang

Abkürzungsverzeichnis:

°C	Grad Celsius
α -	anti-
A	Alanin
amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNS
C-terminal	Carboxy-terminal
D	Aspartat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
DSHB	Developmental Studies Hybridoma Bank
E_{xxx}	Extinktion bei xxx nm
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FLP	Flipase
g	Gramm
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HRP	Meerrettich-Peroxidase
kB	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LB-Medium	Luria Bertani Broth-Medium
M	Molarität (mol/l)
m	milli (10^{-3})
MBP	Maltose Bindeprotein
min	Minuten

μ	mikro (10 ⁻⁶)
mRNA	messenger-RNA
n	nano
N-terminal	Amino-terminal
NHS	normales Pferdeserum
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
Rb	Rabbit (Kaninchen)
rpm	revolutions per minute (Umdrehung pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
U	Unit
UAS	upstream activating sequence
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Tobias Morawe
Geburtsdatum: 12.11.1979
Geburtsort: Hamm, Westfalen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulausbildung

1986 – 1990 Overberg Grundschule, Oelde
1990 – 1999 Thomas Morus Gymnasium, Oelde
Mai 1999 Abitur

Hochschulausbildung

09/2000 – 03/2006 Studium der Biologie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
Anfertigung der Diplomarbeit im Institut für Zoophysiologie in der Arbeitsgruppe von Professor Rüdiger J. Paul mit dem Thema:
Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit von Stoffwechselprozessen bei *Daphnia*

Promotion

05/2006 Beginn der Promotion in der Abteilung Stammzellbiologie, Georg-August-Universität Göttingen in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Andreas Wodarz