

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biologe Philip Laupsien
aus Saarbrücken

Tag der mündlichen Prüfung:

Die Funktion von *slow-as-molasses (slam)* während der
Zellularisierung von *Drosophila melanogaster*

Gutachter: Prof. Dr. Herbert Steinbeisser
Prof Dr. Jörg Großhans

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Wenzl, C., Yan, S., Laupsien, P. and Grosshans, J. (2010). Localization of RhoGEF2 during *Drosophila* cellularization is developmentally controlled by Slam. *MechDev*.127(7-8):371-84.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	XX
Zusammenfassung	XX
Summary	XX
Abkürzungsverzeichnis	XX
1. Einleitung	XX
1.1 Embryonalentwicklung in Drosophila	XX
1.3 Zellularisierung und Bildung des Furchungskanals	XX
1.4 Genetische Faktoren der Zellularisierung	XX
1.4.1 maternale Faktoren	XX
1.4.2 zygotische Faktoren	XX
1.5 Rolle des Zytoskeletts in der Zellularisierung	XX
1.6 Ziel dieser Arbeit	XX
2. Materialien	XX
2.1 Chemikalien	XX
2.2 Enzyme	XX
2.3 Oligonukleotide	XX
2.4 Vektoren	XX
2.5 Antikörper und Fluorophore	XX
2.6 Bakterienstämme	XX
2.7 Zelllinien	XX
2.8 Fliegenstämme	XX
2.9 Kulturmedien und Fliegenfutter	XX
2.10 Puffer und Lösungen	XX
2.11 Reageziensätze (Kits)	XX
2.12 sonstige Materialien	XX
2.13 Geräte	XX
2.14 Mikroskopie	XX
2.15 Software	XX
3. Methoden	XX
3.1 Arbeiten mit <i>Drosophila melanogaster</i>	XX
3.1.1 Fliegenhaltung und Kreuzungen	XX

3.1.2 EMS-Mutagenese	XX
3.1.3 Erzeugung von Keimbahnklonen	XX
3.1.4 Dechorionieren und Fixieren von Fliegenembryonen	XX
3.1.5 Antikörperfärbung an Fliegenembryonen	XX
3.1.6 Immuno-EM von Fliegenembryonen	XX
3.1.7 <i>In situ</i> -Hybridisierung an Fliegenembryonen	XX
3.1.8 Mikroinjektion von Fliegenembryonen	XX
3.1.9 Keimbahntransformationen	XX
3.2 Arbeiten mit DNA	XX
3.2.1 Restriktionsverdau	XX
3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese	XX
3.2.3 Phenolische Extraktion und alkoholische Fällung	XX
3.2.4 DNA-Extraktion aus Agarosegelen	XX
3.2.5 DNA-Extraktion aus Fliegen	XX
3.2.6 5'-Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	XX
3.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten	XX
3.2.8 Transformation von <i>E. coli</i>	XX
3.2.9 Plasmid-Präparation ‚Mini prep‘	XX
3.2.10 Plasmid-Präparation ‚Midi prep‘	XX
3.2.11 Polymerase-Kettenreaktion	XX
3.2.12 DNA-Mutagenese mittels ‚site directed mutagenesis‘	XX
3.2.13 DNA-Sequenzierung	XX
3.2.14 Konstrukte	XX
3.3 Arbeiten mit RNA	XX
3.3.1 DEPC-Behandlung zur Inaktivierung von RNasen	XX
3.3.2 <i>in vitro</i> Transkription	XX
3.4 Arbeiten mit Proteinen	XX
3.4.1 SDS-PAGE und Coomassie-Färbung	XX
3.4.2 Western Blot	XX
3.4.3 <i>in vitro</i> Translation	XX
3.5 Zellkulturarbeiten	XX
3.5.1 Kultur von <i>Drosophila</i> S2-Zellen	XX
3.5.2 Transfektion	XX
3.5.3 Fixierung und Antikörperfärbung	XX

4. Ergebnisse

4.1 Funktionsanalyse von Slam in der Zellularisierung mittels genetischer Methoden

- 4.1.1 Genetik von *slam*
- 4.1.2 Rettung des Zellularisierungsphänotyps
- 4.1.3 Generation eines neuen *slam*-Allels mittels Exzision transposabler Elemente
- 4.1.4 Generation eines *slam*-Nullallels
- 4.1.5 Invaginationsanalyse der maternalen und zygotischen *slam*-Kontribution
- 4.1.6 Analyse des Nullphänotyps in *slam*-Keimbahnklonen
- 4.1.7 Lokalisation verschiedener Zellularisierungsmarker in *slam*-Keimbahnklonen
- 4.1.8 Aktin-Lokalisation am Furchungskanal in Abwesenheit von Slam und Nullo

4.2 Lokalisationen und Dynamik in der Zellularisierung

- 4.2.1 Lokalisation von Slam während der Zellularisierung
- 4.2.2 live imaging der Slam-Lokalisationsdynamik
- 4.2.3 Lokalisation von Slam am Furchungskanal in Relation zu E-Cadherin
- 4.2.4 Abhängigkeit der E-Cadherin Lokalisation von Slam und Nullo
- 4.2.5 Abhängigkeit der RhoGEF2-Lokalisation von Slam
- 4.2.6 Zellularisierung in Embryonen mit zusätzlichen Zentrosomen
- 4.2.7 Lokalisation von Slam in Abhängigkeit von Glued und Dynamitin
- 4.2.8 Abhängigkeit der Slam-Lokalisation von Rab11
- 4.2.9 Lokalisation von Slam und endosomalen Markern in der Zellularisierung
- 4.2.10 FRAP-Analyse der Lokalisationsdynamik von Slam

4.3 Lokalisation der *slam* mRNA

- 4.3.1 Kolokalisation von *slam* mRNA und Protein

4.3.2 live imaging endogener *slam* mRNA mittels MS2-Konstrukt

4.3.3 FRAP-Analyse der Lokalisationsdynamik von *slam* mRNA

4.4 molekulare Interaktionen von Slam

4.4.1 HYBRIGENICS ULTImate Yeast-Two-Hybrid-Screen

4.4.2 Interaktion mit Spire

4.4.3 Interaktion mit FMN/CG32138

4.4.4 Kolokalisation mit Myosin10A

5. Diskussion

5.1 Definition der Invaginationsstellen und Furchungskanalbildung

5.2 Slam ist essentiell für die Membraninvagination

5.3 Interaktion von Slam mit dem Zytoskelett

5.4 Lokalisationsdynamik von Slam

5.5 Rolle der *slam* mRNA-Lokalisation

5.6 Modell der genetischen Kontrolle der Zellularisierung

6. Literaturverzeichnis

Danksagung

Zusammenfassung

Summary

Development of the *Drosophila* embryo starts with 13 rounds of nuclear division in a syncytium. At the onset of cycle 14 zygotic gene expression starts and the plasma membrane invaginates between adjacent nuclei to form a single-layered polarized cellular blastoderm in a process related to cytokinesis called cellularization.

slow as molasses (slam) is a novel gene conserved in drosophilids with no known functional domains that is required for plasma membrane invagination during cellularization. Slam localizes to the tip of the invaginating membrane, the furrow canal (FC) and *slam* deficient embryos show a lethal cellularization phenotype. Using hypomorphic alleles that do not show the severe early cellularization phenotype, Slam has also been reported to play a role in germ cell migration in later development when no *slam* expression is detected.

Despite its expression peak at the onset of zygotic gene expression, generation of *slam* deficient germline clones revealed a crucial maternal contribution that can only partially be rescued by zygotic expression. In the absence of *slam* initial accumulation of actin at the future invagination site is not affected as well as localization of Nullo and Dia. Besides the initial formation of the FC membrane invagination is completely abolished in *slam* deficient embryos and MyosinII does not localize to the future invagination site. Slam recruits RhoGEF2 to the FC and ectopic sites by direct interaction with the PDZ domain thus promoting local actin assembly. The Slam protein can be visualized throughout the whole process of cellularization. FRAP analyses revealed that Slam localizes to the FC in a small time window at the onset of cellularization followed by stable binding. Strikingly *slam* mRNA and protein colocalize at the FC and in basal particles with the mRNA showing a very similar localization and diffusion behaviour as the protein. Slam colocalizes with Myosin10A in the basal particles at the onset of cellularization and later at the FC.

The results show that *slam* is a key regulator of cellularization having a dual function in membrane invagination and maintenance of the FC. There seem to be two separate pathways required for proper membrane invagination, one being Slam-dependent and the other being independent of Slam requiring Nullo. Initial definition of the invagination site is not affected in the absence of both Slam and Nullo.

Abkürzungsverzeichnis

'	Minuten
"	Sekunden
3' UTR	3-prime untranslated region
5' UTR	5-prime untranslated region
aa	amino acid(s)
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	base pairs
BAC	bacterial artificial chromosome
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CDS	coding sequence (proteincodierende Exons)
<i>D.</i>	<i>Drosophila</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIC	differential interference contrast
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
Δ	Deletion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMS	Ethylmethansulfonat
FCS	fetal calf serum
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FRAP	fluorescence recovery after photobleaching
FRT	FLP-recombinase target
g	Gramm
G-α-...	Antikörper aus Ziege (goat)
GP-α-...	Antikörper aus Meerschweinchen (guinea pig)
GEF	guanidyl nucleotide exchange factor
GFP	green fluorescent protein
GLC	germline clone (Keimbahnklon)
GST	Glutathion-S-Transferase

GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
H ₂ O _{dd}	zweifach destilliertes Wasser
HA	Hämagglutinin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
m	Meter
m	Milli (1x10 ⁻³)
min	Minuten
M-α-...	Antikörper aus Maus
MBT	mid-blastula transition
μ	Mikro (1x10 ⁻⁶)
n	Nano (1x10 ⁻⁹)
Nr.	Nummer
N/A	keine Angabe (not available)
PAA	Acrylamis/Bisacrylamid (19:1)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
R-α-...	Antikörper aus Ratte
Rb-α-...	Antikörper aus Kaninchen (rabbit)
RFP	red fluorescent protein
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur (ca. 21-22°C)
SDM	site directed mutagenesis
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
Slam	Slow as molasses (Protein)
<i>slam</i>	<i>slow as molasses</i> (Gen/Mutante)

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	volume per volume
w	<i>white-Gen</i>
wt	Wildtyp
w/v	weight per volume
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
y	<i>yellow-Gen</i>
Y2H	Yeast-two-Hybri

1. Einleitung

2. Materialien

2.1 Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien von einer der folgenden Firmen bezogen.

- AppliChem GmbH (Darmstadt)
- Gibco BRL (life technologies) (Eggenstein)
- Invitrogen (life technologies) (Carlsbad , USA)
- Merck (Darmstadt)
- Roth (Karlsruhe)
- Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

2.2 Enzyme

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Enzyme von einer der folgenden Firmen bezogen. Des Weiteren wurde eine im Labor selbst exprimierte und aufgereinigte Taq-Polymerase verwendet.

Enzym

- Restriktionsenzyme
- Pfu DNA-Polymerase
- Shrimp Alkaline Phosphatase
- T4 DNA-Ligase

Quelle

- Fermentas (St. Leon-Rot)
- New England Biolabs (Ipswich, USA)
- Roche (Mannheim)
- Stratagene (La Jolla, USA)
- Fermentas
- Fermentas

2.3 Oligonukleotide

Die nachfolgend aufgeführten Oligonukleotide wurden alle von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen oder waren bereits im Labor vorhanden. Unterstrichene Sequenzabschnitte markieren Substrate von Restriktionsendonukleasen. Start- und Stopcodons sind fett markiert.

PL1: GCG GAA TTC **ATG** CCA GAA AGC CAC AGT TAC AAA

PL2: GCG GAA TTC GAG ACG CCA CGC TCT GCA TAT C

PL3: GCG GAA TTC GAG TCC AAG AAG GAG ACA CAA GTC
PL4: GCG GAA TTC GAG TTC TTC GCC AAT GCC C
PL5: GCG AGA TCT **TCA** GAC CTC CAC GGC CC
PL6: GCG GTC GAC **TCA** GAC CTC CAC GGC CC
PL7: AGA CTA CTA GTA TTG CGT ATG CGG TTC GCA TCT G
PL8: ACA ACC CGG ATT CAC TTT CCT CA
PL9: TAA CGA GTC CAA GAA GGA GAC ACA
PL10: AGA CTG CGG CCG CGA ACT ATG TGC GAT TCC ATT TTA ATA
PL11: GCA AGC GGT CGG TTT CGC
PL12: CTC CAC TCG GCT CGG CTG
PL13: CCA ACT GAC CAA CTA CTG TC
PL14: CCT TCC CAT GTA AAC AAC TTC
PL15: GCA GTA GCT CGC TGA GAT C
PL16: CAT TGA CAA CAT TGG ACG CG
PL17: CAA CAT AAA ATA AAA GTC CCG TC
PL28: GGG ATC TGA CTT TAT TTT AAG CCA TGG ATT TTA TAA ACA ATT AGT
PL29: GGA ACT AAT TGT TTA TAA AAT CCA TGG CTT AAA ATA AAG TCA GAT
PL30: GCG CCA TGG AGA ACT ATA GCT AGC ATG CGC
PL31: GCG CCA TGG CCA TGA TTA CGA ATT CGA ATG G
PL32: AGA ATA CAT TTA ATT TAG AAA ATG C
PL35: TCC ATC GAT CCG ACA GCT G
PL36: TGA GAT CAT CAC TGT TCA TGG
PL41: GAC GCG ACG ATG GCT TCC
PL42: TGG ACT CTG CAT GCC CAA
PL43: TGC GTT TGC AAA CAA AAA TCG TCG
PL44: CCT CGA TAT ACA GAC CGA TAA AAC
PL45: TAC TAT TCC TTT CAC TCG CAC TTA TTG
PL46: TGC ACA TAC TAA TAC TGG AAA TTC TGC
PL48: GAT ATT TAA CGG GAA AGC GAA AGG C
PL49: GCC CAG CGG TTT CGA GGG
PL50: TTT GTT CCG CTC GGG GAG CAA G
PL51: CGA AGC CGA TGC ATA CGA TTA GC
PL52: GAC CTG GCC TTC GGA ATC G
PL53: TGGCACCTGTCTGCAGACC

PL54: CAG GCG ATC AAG ACC AGC G
 PL55: ATG GCC CGG ATG ATG GAG C
 JG258: TTG AAG ATC TGG CTG CCA TGT
 JG260: CCG ACT CGA GTT ATG CAG TGG
 JG262: ACC TCT CGA GTT ATC CGC TGA
 MW-N1: GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CGA CCA TTC TCA AGA AAT CTC
 AAA
 MW-N2: GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CGC GTG GCT GCG CAG ACT C
 MW-S1: GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CGA GCA CAT CTG ATA GAA CAG C
 MW-S2: GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CGA CTA TGC TGG CCA GCT GG

2.4 Vektoren

Vektor

- pBS-KS (+)
 - pUASp
 - pUAS-K10 attB
 - Δ2-3 Turbo
 pJG4-5
 - pEG202
 pCS/slam9
 pCS/slam6
 pMT/GFP
 pMT/mCherry
 pQE-H10-GFP
 pSL-MS2-6

Quelle

Stratagene (Agilent)(La Jolla, USA)
 J. Großhans (Rørth, 1998)
 J. Großhans
 E. Gavis

BAC

RP98-5J4
 attB-P[acman]-Cm^R-BW-CH321-69B06
 attB-P[acman]-Cm^R-BW-CH322-177I04

Quelle

CHORI/BPRC (Oakland, USA)
 CHORI/BPRC (Oakland, USA)
 CHORI/BPRC (Oakland, USA)

2.5. Antikörper und Fluorophore

Primärer Antikörper

- GP- α -Slam

- M- α -Dlg

- M- α -GFP

- M- α -Myc

- M- α -MyosinII

- M- α -Nullo

- Rb- α -Dia

- Rb- α -Nuf

- Rb- α -Rab5

- Rb- α -Slam

- M- α - β -Gal

Quelle

J. Großhans (Wenzl *et al.*, 2010)

Developmental Studies Hybridoma

Bank University of Iowa (Iowa, USA)

Chemicon (Temecula, USA)

J. Großhans

B. Mechler

J. Großhans

J. Großhans

J. Großhans

J. Großhans

J. Großhans (Brandt *et al.*, 2006)

Roche

Sekundäre Antikörper

Alle sekundären Antikörper wurden von der Firma Molecular Probes (life technologies) bezogen und in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt.

- G- α -GP IgG gekoppelt mit Alexa 488, 546 oder 647

- G- α -M IgG gekoppelt mit Alexa 488, 546 oder 647

- G- α -Rb IgG gekoppelt mit Alexa 488, 546 oder 647

andere Färbereagentien

Färbereagenz

DAPI

Phalloidin + Alexa 488, 546, 647

GFP-trap_atto488

Quelle

Sigma-Aldrich

Molecular Probes (life technologies)

ChromoTek (Planegg-Martinsried)

Einbettungsmedien

Reagenz

Aquapolymount

Quelle

Polysciences (Eppelheim)

2.6 Bakterienstämme

- E.coli DH5- α F-, ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rK-, mK+), *phoA*, *supE44*, λ -, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*
- E.coli BL21(DE) B, F-, *dcm*, *ompT*, *hsdS*(rB-, mB-), gal λ (DE3)

2.7 Zelllinien

Zelllinie	Quelle
- Drosophila S2 R+	M. Boutros, DKFZ, Heidelberg

2.8. Fliegenstämme

Die verwendeten Fliegenstämme entstammen soweit nicht anders vermerkt der laboreigenen Stammsammlung der Forschungsgruppe Großhans (www.uni-bc.gwdg.de/index.php?id=502) oder dem Bloomington Stock Center (www.flystocks.bio.indiana.edu). Weiterführende Informationen zu den Fliegenstämmen sind auch bei flybase (www.flybase.org) hinterlegt.

Genotyp	Quelle
<i>ore</i> ^R +/+	Labor Nr. A401
<i>w</i>	Labor Nr. A101
<i>w; al dp b pr c px sp/CyO</i>	Labor Nr. A211
<i>w; al dp b pr Bl c px sp/SM1</i>	Labor Nr. A212
<i>w[*]; al dp b pr FRT2L^{neo}{ry⁺/CyO hid {w⁺}</i>	Labor Nr. A419
<i>w; ru h th st cu sr e^s ca/Tm3 Tb</i>	Labor Nr. A312
<i>w; ru h th st cu sr e^s Pr ca/Tm2</i>	Labor Nr. A313
<i>w; Sp/CyO P{ry⁺, hb-lacZ}; Dr/TM3 Sb {ry⁺, hb-lacZ}</i>	Labor Nr. A217
<i>w; slam^{waldo1}</i>	R. Lehmann
<i>w; slam^{waldo2}</i>	R. Lehmann
<i>w; noc[Sco]/SM6a, P{w[+mC]=hsILMiT}2.4</i>	Bloomington Nr. 24613
<i>w; Mi{ET1}MB04833</i>	Bloomington Nr. 24231
<i>w; Mi{ET}slam[MB06922]/SM6a</i>	Bloomington Nr: 25533
<i>w; PBac{WH} f00173/CyO</i>	Exelixis Collection HMS
<i>w; P{XP} d03327/CyO</i>	Exelixis Collection HMS
<i>w; Df(2L)BSC5{w⁺}/SM6a</i>	Bloomington Nr. 6299
<i>y w Flp122{ry+};ovoD2L{w+}Frt2L[]{neoR}/CyO, hs-hid{w+}</i>	Labor Nr. B406

M{vas-int.Dm}ZH-2A, M{3xP3-RFP.attP}ZH-51C	Bloomington Nr. 24482
M{vas-int.Dm}ZH-2A, M{3xP3-RFP.attP}ZH-86Fb	Bloomington Nr. 24749
w[*]; P{w[+mC]=UAS-Dmn.D}2; TM3, Sb[1]/TM6B, Tb[1]	Bloomington Nr. 8784
Gl[1] Sb[1]/LVM	Bloomington Nr. 510
P{w[+mC]=UASp-Myo10A.RFP}11, w[*]	Bloomington Nr. 24783
w; Amph-YFP{w+}; CyO	DGRC Nr. 115330
w; Sp/Cyo P{ry+, hb-lacZ}; P {w+ tub-Gal4-VP16}15	Labor Nr. A220
P{w+, UAS-4xPDZRG2-RFP}/TM3 Sb P{ry+, hb-lacZ}	Labor Nr. G028
Rab11[93Bi] e[LE1] cd[1]/TM3, Sb[1] Ser[1]	Bloomington Nr. 4158
Rab11 ^{J2D1} /TM3 Sb	DGRC Nr. 111420

2.9 Kulturmedien und Fliegenfutter

- LB-Medium	10g Bactotrypton
	10g NaCl
	5g Hefeextrakt
	ad 1l mit H ₂ O _{dd}

Das Nährmedium wurde anschließend autoklaviert. Für Platten wurden noch 15g Bactoagar zugegeben und unter Erhitzen gelöst. Nach Abkühlung unter 55°C wurde bei Selektionsplatten Antibiotikum zugegeben.

- Zellkulturmedium	Schneiders Drosophila Medium (GIBCO life technologies) FCS (GIBCO life technologies)
- Fliegenfutter	256g Fadenagar 800g Bäckerhefe 320g Sojabohnenmehl 2,56kg Maismehl 700g Zuckerrübensirup 2,56g Malz 320ml Nipagin (13,3% in Ethanol) 400ml Propionsäure 32l H ₂ O

SDS-PAGE

- Trenngel
 - 375 mM Tris-HCl (pH 8,8)
 - 0,1% SDS
 - 10% PAA
 - 0,1% APS
 - 0,06% TEMED

- Sammelgel
 - 125 mM Tris-HCl (pH6,8)
 - 5% PAA
 - 0,1% APS
 - 0,1% TEMED

- Laemmli
 - 45 mM Tris-HCl (pH 6,8)
 - 3% SDS
 - 0,3% Bromphenolblau
 - 10% Glycerin
 - 3% β -Mercaptoethanol

- Laufpuffer
 - 150g Glycin
 - 10g SDS
 - 32,8g Tris
 - ad 1l H₂O_{dd}

- Coomassie Färbelösung
 - 200 ml Methanol (tech.)
 - 200 ml H₂O_{dd}
 - 80 ml Essigsäure (tech.)
 - 0,5 g Coomassie R-250 (0,1% w/v)

- Entfärbelösung
 - 600 ml Methanol (tech.)
 - 200 ml Essigsäure (tech.)
 - 1200 ml H₂O_{dd}

Western Blot

- Anodenpuffer
 - 3,06 g Tris
 - 100 ml Methanol
 - ad 1l H₂O_{dd}

- Kathodenpuffer
 - 3,02 g Tris
 - 5,25 g 6-Aminohexansäure
 - 100 ml Methanol
 - ad 1l H₂O_{dd}

- Blockierlösung
 - 5 % Magermilchpulver in PBT (w/v)

- Hybridisierungslösung
 - 25 ml Formamid
 - (*in situ*-Hybridisierung) 12,5 ml 20x SSC
 - 50 µl Heparin (50 µg/ µl)
 - 500 µl Tween 20
 - 100 µl tRNA (50 µg/µl)

- ad 50 ml H₂O_{dd} (DEPC-behandelt)

2.11 Reagenziensätze (Kits)

Produkt	Quelle
- Plasmid Midi Kit Nucleobond AX	Macherey-Nagel (Düren)
- QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
- Expand High Fidelity PCR Kit	Roche
- MEGAscript High Yield Transcription Kit	Ambion (life technologies)
- mMMESSAGE mMACHINE SP6 High Yield Capped RNA Transcription Kit	Ambion (life technologies)
- ECL plus Western Blotting Detection System	GE Healthcare(Chalfont St Giles, UK)
- Effectene Transfection Reagent Kit	Qiagen

2.12. sonstige Materialien

Produkt	Quelle
- 1 kb DNA ladder	NEB
- low molecular weight DNA marker	NEB
- Prestained Protein Molekular Weight Marker	Fermentas
- Fuji Medical X-Ray Film, 13x18cm	Fujifilm (Tokio, Japan)
- Protran Nitrocellulosemembran	Whatman (Maidstone, UK)
- 3MM Chr Blotpapier	Whatman
- Objektträger	Menzel (Braunschweig)

- Deckgläschen Nr. 1,5 22x22mm/22x40mm		Menzel
- Fliegenröhrchen PE		Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
- Petrischalen	1	Greiner Bio-One
- Pasteurpipetten		Brand GmbH & Co KG (Wertheim)
- Glaspipetten 5ml/10ml/20ml		Brand GmbH & Co KG
- Pipetboy Pipettierhilfe		IBS Integra Biosciences (Fernwald)
- Mikroliterpipetten 2µl/10µl/200µl/1000µl		Gilson (Middleton, USA)
- Pipettenspitzen 2µl/200µl/1000µl		Sarstedt AG (Nümbrecht)
- Mikroreaktionsgefäße 1,5ml/2ml		Sarstedt AG, (Nümbrecht)
- Reaktionsgefäße 15ml/50ml		Sarstedt AG (Nümbrecht)
- 10S Voltalef Halocarbonöl		Lehmann & Voss & Co (Hamburg)
- 30S Voltalef Halocarbonöl		Lehmann & Voss & Co
- doppelseitiges Klebeband		tesa (Hamburg)
- Glaskapillare mit Filament		Narishige (Tokio, Japan)

2.13. Geräte

Gerät	Hersteller
- Zentrifuge 5415D	Eppendorf (Hamburg)
- Zentrifuge 5417R	Eppendorf
- Vakuumzentrifuge 'SpeedVac'	Eppendorf
- Thermocycler PTC-200	MJ Research (St Bruno, Canada)
- Trans-blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad (Hercules, USA)
- FemtoJet Mikroinjektor	Eppendorf
- Elektroporationsgerät Gene Pulser	BIO-RAD
- Injektionsnadelzieher PN-30	Narishige
(settings: heat: 80,6, magnet sub: 27,7, magnet main: 79,5)	
- DNA-Gelelektrophoresekammern	ZMBH Feinmechanikwerkstatt
- Spannungsquelle Thermo EC 135-90	Thermo Scientific (Waltham, USA)
- Wasserbäder	Julabo (Seelbach)

2.14 Mikroskopie

- Zeiss LSM 510 konfokales Fluoreszenzmikroskop
- Zeiss LSM 710 konfokales Fluoreszenzmikroskop
- Zeiss LSM 780 konfokales Fluoreszenzmikroskop
- Leica DM IRE2 konfokales Fluoreszenzmikroskop
- Zeiss Cell Observer SD/Yokogawa CSU-X1 Spinning Disk konfokales Fluoreszenzmikroskop
- Zeiss Axiovert 200M/PerkinElmer Ultra-View Spinning Disk konfokales Fluoreszenzmikroskop
- Olympus IX81/ PerkinElmer Ultra-View Spinning Disk konfokales Fluoreszenzmikroskop
- Nikon Ti/ PerkinElmer Ultra-View Spinning Disk konfokales Fluoreszenzmikroskop
- Zeiss Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskop
- Zeiss Stemi 2000 Stereomikroskop
- Leica MZ12₅ Stereomikroskop

2.15 Software

Software

- ZEN 2011
- Axiovision 4.8
- Leica Confocal Software
- Volocity
- DNASTAR
(SeqBuilder, SeqMan, MegAlign, EditSeq)
- Vector NTI 9.0
- Adobe Photoshop 9.0
- Adobe Illustrator
- ImageJ 1.38x
- MS Office (Word, Excel, PowerPoint)

Quelle

- Carl Zeiss AG
- Carl Zeiss AG
- Leica
- PerkinElmer
- Lasergene
- Invitrogen
- Adobe Systems Inc.
- Adobe Systems Inc.
- NIH
- Microsoft Inc.

3. Methoden

Soweit nicht anders vermerkt wurden alle molekularbiologischen Standardmethoden entsprechend den Angaben in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Third Edition) (Sambrook J *et al*, 2000) durchgeführt.

3.1 Arbeiten mit *Drosophila melanogaster*

3.1.1 Fliegenhaltung und Kreuzungen

Die Haltung der Fliegen erfolgte in mit Futter gefüllten Polyethylenröhrchen, die mit feinporigen Schaumstoffstopfen verschlossen wurden. Aktuell nicht in Gebrauch befindliche Stämme (Stammsammlung) wurden bei 18°C gehalten. Die Amplifikation von Stämmen sowie Kreuzungen wurden bei Raumtemperatur bzw. zur beschleunigten Entwicklung bei 25°C durchgeführt. Zur Gewinnung von Embryonen wurden die Fliegen in mit Apfelsaftagarplatten versehenen Plastikgefäßen bei 25°C gehalten. Die Platten wurden regelmäßig gewechselt, um Embryonen des gewünschten Stadiums anzureichern. Sowohl Futterröhrchen als auch Apfelsaftagarplatten wurden zur Stimulation der Eiablage dünn mit Bäckerhefe bestrichen.

3.1.2 EMS-Mutagenese

Mutagenesen wurden mittels Ethylmethansulfonat (EMS, Sigma) durchgeführt. EMS-Gabe führt hauptsächlich zu einer Alkylierung von Guanin zu O-6-Ethylguanin. Bei der anschließenden Replikationsrunde kommt es zu einem Einbau von Thymin statt Cytosin gegenüber dem O-6-Ethylguanin. EMS-induzierte Mutationen bestehen also zu über 99% aus Einzelbasentauschen von G/C nach A/T (Lewis & Bacher, 1968).

Junge Männchen wurden bei 18°C für 4h auf in Röhrchen ohne Futter auf wassergesättigten Papiertüchern ausgehungert. Eine 1%ige Glucoselösung (w/v) wurde mit 10mM EMS versetzt und auf Papiertücher in Röhrchen ohne Futter geträufelt. Die Fliegenmännchen wurden bei RT über Nacht in diesen EMS-Röhrchen belassen. Nach einer Erholungsphase von 6h in normalen Futterröhrchen wurden die mutagenisierten Männchen dann mit Jungfrauen verpaart. Die Kreuzungen wurden bei 25°C gehalten und täglich in neue Futterröhrchen mit Hefe überführt. Die

Männchen wurden nach drei Tagen entfernt. Alle potentiell EMS-exponierten Gegenstände wurden anschließend in einer 10%igen Natriumthiosulfatlösung (w/v) dekontaminiert.

Die Mutagenese wurde im konkreten Fall durchgeführt, um das *white*-Gen, welches das den *slam*-Lokus umfassende Defizienzallel $Df(2L)BSC5\{w^+\}$ markiert, zu mutieren, was für weiterführende Kreuzungen in Rettungsexperimenten notwendig war. Es wurden 3x je 150 *w*; $Df(2L)BSC5\{w^+\}/SM6a$ Männchen mit 4ml EMS/Glucoselösung inkubiert und anschließend mit je 100 *w*; *Sp/CyO* Jungfrauen verpaart. Weißäugige *Cy*-Fliegen unter den Nachkommen wurden selektiert und um weitere zweichromosomale Mutationen auszuschließen mit *w*; *a dp b pr c px sp/CyO*-Fliegen rekombiniert.

3.1.3 Erzeugung von Keimbahnklonen

Die Erzeugung homozygoter Keimbahnklone erfolgte mittels des Flp/FRT-Systems (Chou & Perrimon, 1996). Larven entsprechenden Genotyps wurden im Alter von 24-48h und erneut im Alter von 48-72h für 1h einem Hitzeschock von 37°C ausgesetzt, wodurch die Expression der Flipase induziert wurde.

3.1.4 Flipase-induzierte Rekombination zwischen FRTs in Transposons

Die sequenzspezifische Rekombination zwischen FRTs in transposablen Elementen bediente sich ebenfalls des Flp/FRT-Systems (Thibault *et al.*, 2004; Parks *et al.*, 2004). Larven entsprechenden Genotyps wurden im Alter von 24-48h und erneut im Alter von 48-72h für 1h einem Hitzeschock von 37°C ausgesetzt, wodurch die Expression der Flipase induziert wurde. Anschließend wurde die erfolgreiche Rekombination per PCR-Analyse verifiziert.

In dieser Arbeit wurde eine den *slam*-Lokus enthaltende Deletion durch Rekombination zwischen den Transposons PBac{WH}f00173 (2L 6363074.. 6363074 [-]) und P{XP}d03327 (2L 6411326..6411326 [+]) generiert. Die PCR-Analyse erfolgte mittels der *two-sided*-Strategie mit Hilfe der Primerpaare PL43/PL44 und PL45/PL46.

3.1.5 Transposase-induzierte Mobilisierung transposabler Elemente

Die Mobilisierung transposabler Elemente erfolgte ebenfalls durch Hitzeschock-induzierte Aktivierung der Transposase in Larven entsprechenden Genotyps im Alter von 24-48h und erneut im Alter von 48-72h für jeweils 1h bei 37°C.

Die Minos-Transposons Mi{ET1} MB04833 (2L 6367782.. 6367782 [+]) und (2L 6376625.. 6376625 [+]) wurden mittels Minos-Transposase mobilisiert. Die durch Mi{ET1} MB06922-Mobilisierung erzeugte partielle *slam*-Deletion wurde dann per PCR mit den Primerpaaren PL35/PL36, PL41/PL42, PL52/PL53 und PL54/PL55 charakterisiert.

3.1.6 Dechorionieren und Fixieren von Fliegenembryonen

Embryonen des gewünschten Stadiums wurden von Apfelsaftplatten in ein Edelstahlnetz überführt und für 90 sec mit Danklorix (50% in H₂O_{dd}) inkubiert. Anschließend wurden die Embryonen ausgiebig unter fließendem Wasser gespült. Zur Formaldehydfixierung wurden die Embryonen in ein Szintillationsröhrchen mit Fixierlösung überführt und danach für 30 min bei 200 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die untere wässrige Phase verworfen und durch 5 ml Methanol ersetzt. Nach 30 sec kräftigem Schütteln wurden die devitellinisierten, abgesunkenen Embryonen mittels einer Pasteurpipette vom Gefäßboden abgenommen und mehrfach kurz in Methanol gewaschen. Sie wurden bei -20°C in Methanol gelagert oder direkt für Färbungen verwendet. Für bestimmte methanolsensitive Färbungen (z.B. Phalloidinfärbungen des Aktinzytoskeletts) war eine manuelle Entfernung der Vitellinmembran nötig. Nach der Fixierung wurde die wässrige Phase durch 5 ml PBT ersetzt und die Fixierlösung mit den Embryonen durch ein Stahlnetz gegossen, welches die Embryonen zurückhielt. Zur vollständigen Entfernung des Heptans wurden die Embryonen im Netz mehrfach in PBT geschwenkt und dazwischen auf Papiertüchern von überschüssiger Flüssigkeit befreit. Danach wurden sie mit einem feinen Pinsel auf doppelseitiges Klebeband aufgebracht und mit PBT überschichtet. Mittels einer Injektionskanüle wurden sie dann manuell unter dem Stereomikroskop devitellinisiert und anschließend bei 4°C in PBT gelagert oder direkt verwendet.

Bestimmte Zellstrukturen (z.B. Mikrotubuli) werden durch Formaldehydfixierung zerstört, was durch Hitzefixierung vermieden werden kann. Zur Hitzefixierung wurden 5 ml Fixierlösung in der Mikrowelle kurz aufgeköcht und dechorionierte Embryonen im Stahlnetz zugegeben. Nach 10 sec wurde die Lösung durch Zugabe eines Wasser-/Eisgemischs abgekühlt. Danach wurden die Embryonen manuell oder mittels Heptan/Methanol devitellinisiert.

3.1.7 Antikörperfärbungen

Um das Methanol zu entfernen wurden Embryonen dreimal kurz und dreimal für 5 min auf dem Drehrad in PBT gewaschen. Anschließend wurden sie für 1 h in 5% BSA in PBT blockiert bevor sie mit dem primären Antikörper in PBT mit 0,1% BSA für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert wurden. Danach wurden sie dreimal kurz und viermal für 15 min auf dem Drehrad mit PBT gewaschen und dann mit dem sekundären Antikörper in PBT mit 0,1% BSA für 2 h bei RT inkubiert. Nun wurde erneut dreimal kurz und viermal für 15 min auf dem Drehrad mit PBT gewaschen. Anschließend wurde gegebenenfalls für 30 min mit Phalloidin (1:1000 in PBT) gefärbt. Abschließend erfolgte eine DAPI-Färbung (0,8µg/ml 1:250 in PBT) für 3 min., die Embryonen wurden dreimal kurz und einmal für 5 min in PBT gewaschen und dann in Aquapolymount eingebettet. Objektträger mit gefärbten Embryonen wurden bei 4°C aufbewahrt.

3.1.8 Immuno-EM von Fliegenembryonen

Embryonen wurden dechorioniert, mit Formaldehyd fixiert und in PBS von Hand devitellinisiert. Die anschließende Immuno-EM wurde an der Zentralen Abteilung für Elektronenmikroskopie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter Leitung von Herrn Prof. G. Krohne durchgeführt.

3.1.9 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) an Fliegenembryonen

Formaldehydfixierte und dechorionierte Embryonen wurden in PBT überführt und dreimal kurz und zweimal für 5 min in PBT auf dem Drehrad gewaschen. Sie wurden dann für 10 min in Hybridisierungslösung/PBT (1:1) und anschließend für 10 min in Hybridisierungslösung inkubiert. Es folgte die Prähybridisierung für 1h bei 55°C in 100 µl Hybridisierungslösung. Nach Zugabe der vorbereiteten Sonde (s. 3.3.2) wurde über Nacht bei 55°C inkubiert und die Sonde dann für erneute Verwendung aufgehoben. Nach 3 kurzen und 3 30-minütigen Waschschritten in vorgewärmter Hybridisierungslösung bei 55°C folgte ein stufenweiser Austausch der Hybridisierungslösung durch PBT (4:1 für 10 min bei 55°C, 3:2 für 10 min bei 55°C, 2:3 für 10 min bei 55°C, 1:4 für 10 min bei RT). Anschließend wurde zweimal für 20 min in PBT + 1% BSA gewaschen und kurz in PBT gespült. Ein Peroxidasegekoppelter Anti-Digoxigenin-Antikörper wurde 1:200 zugegeben und für 2h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Es folgten drei kurze und 4 15-minütige

Waschschritte in PBT. Nach Verdünnung des Cy3-gekoppelten TSA in Reaktionspuffer (1:200) wurde die Färbereaktion lichtgeschützt für 10 min in 200 µl Volumen durchgeführt. Durch 3 kurze und einen 15-minütigen Waschschritt in PBT wurde das Cy3-TSA entfernt und die Reaktion somit gestoppt. Die Embryonen waren anschließend bereit für Antikörperfärbungen, wobei ein erneutes Blocken in PBT + BSA nicht nötig war.

3.1.10 Mikroinjektion von Fliegenembryonen

Zur Injektion von mRNA, dsRNA oder DNA wurden Embryonen im gewünschten Stadium dechorioniert und auf einem Stück Apfelsaftagar mittels einer feinen Nadel in gleicher Orientierung aufgereiht. Anschließend wurden sie auf ein dünn mit Heptankleber bestrichenes Deckgläschen aufgeklebt, im Exsikkator für ca- 10-12 min. getrocknet und nach dem Trocknen mit Voltalef 10S-Öl als Austrocknungsschutz überschichtet. Die Spitze einer mittels Nadelzieher aus einer Glaskapillare mit Filament gezogenen Injektionsnadel wurde unter dem Stereomikroskop mit einer Pinzette gebrochen. Anschließend wurde die Nadel mittels Eppendorf Microloader-Pipettenspitzen mit der Injektionslösung gefüllt, in einen Mikromanipulator eingespannt und an den Injektionsapparat angeschlossen. Durch Anpassung von Injektionsdruck und -dauer an die Größe der Nadelöffnung, Viskosität der Injektionslösung und Trocknungszustand der Embryonen wurden dann konstante Injektionsmengen von ca. 100 pl in das posteriore Ende der Embryonen injiziert.

Im Falle anschließender Fixierung wurden die Embryonen nach gewünschter Entwicklungszeit bei 25°C mittels Heptan vom Öl befreit und anschließend mit Heptan in ein Glasröhrchen gespült. Nach mehrmaligen Austausch des Heptans wurden sie dann wie beschrieben fixiert. Eine Devitellinisierung injizierter Embryonen mittels Methanol ist nicht möglich, die Embryonen verbleiben in der Interphase des Fixiergemischs und wurden nach Aufbringung auf doppelseitiges Klebeband mit PBS überschichtet und von Hand devitellinisiert.

3.1.11 Keimbahntransformationen

Die Erzeugung transgener Fliegenlinien erfolgte mittels zweier Strategien. Zum einen wurde das klassische System ungerichteter P-Element-vermittelter Keimbahn-

transformation verwendet (Rubin & Spradling, 1982), zum anderen die auf der Φ C31-Integrase basierende gerichtete Methode (Groth *et al.*, 2004; Bischof *et al.*, 2007).

Bei der P-Element-basierten Methode wurde der Transformationsvektor mit dem die Δ 2-3 Transposase codierenden Helferplasmid im Verhältnis 3:1 gemischt, mittels Ethanol und Natriumacetat gefällt, in 70% Ethanol gewaschen und dann bei einer Konzentration von 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ aufgenommen. Die Injektionslösung wurde dann wie beschrieben in die spätere Polzellregion von w^{1118} -Fliegen injiziert. Die injizierten Embryonen wurden bei 18°C gehalten und die resultierenden Fliegen wurden mit w^{1118} -Fliegen verpaart. Eine erfolgreiche Transformation wurde anhand rotäugiger Nachkommen, verursacht durch das auf dem Transformationsvektor enthaltene *mini-white* Gen, sichtbar. Einzelne rotäugige Männchen wurden dann mit Jungfrauen des Genotyps *Sp/Cyo P{ry+, hb-lacZ}; Dr /TM3 Sb {ry+, hb-lacZ}* verpaart, um balancierte Stämme zu erhalten und um die chromosomale Lokalisation des Transgens zu ermitteln.

Das Φ C31-System benötigt kein Helferplasmid, da hier das Transposasegen auf dem X-Chromosom des Injektionsstammes liegt. Konstrukte bis 10kb wurden in einer Konzentration von 50-200 $\text{ng}/\mu\text{l}$ in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ injiziert. Für größere Konstrukte wurde die Konzentration bis zu 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ erhöht. Je nach gewünschtem Integrationsort wurde ein entsprechender Fliegenstamm mit passender attP-site gewählt. Integration auf dem zweiten Chromosom erfolgte durch Injektion in den Stamm *M{vas-int.Dm}ZH-2A*, *M{3xP3-RFP.attP}ZH-51C*. Für drittchromosomale Integration wurde der Stamm *M{vas-int.Dm}ZH-2A*, *M{3xP3-RFP.attP}ZH-86Fb* verwendet. Injektion und nachfolgende Behandlung der Embryonen erfolgte wie für das P-Element-System beschrieben. Resultierende Fliegen wurden direkt mit zweit- bzw. drittchromosomalen Balancerstämmen verpaart, da eine Kartierung des Integrationsortes entfiel. In den folgenden Filialgenerationen wurden zweimal rotäugige Einzelmännchen mit Balancerjungfrauen verpaart, um das auf dem X-Chromosom integrierte und durch RFP-Expression markierte Integrasegen zu entfernen.

3.2 Arbeiten mit DNA

3.2.1 Restriktionsverdau

Analytische Restriktion von Plasmiden erfolgte mit 0,5-1 μg DNA und 5 U Enzym in einem 10 μl -Ansatz in geeignetem Puffer entsprechend den Herstellerangaben für 1-

2 h bei 37°C. Bei Plasmiden aus Mini-Präparationen wurden noch 0,5 µl RNase zugesetzt. Für präparative Restriktionen wurden ca. 5 µg DNA mit 10 U Enzym über Nacht bei 37°C bei einem Gesamtvolumen von 10-50 µl inkubiert.

3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

In der Regel wurden 1%ige Agarosegele zur elektrophoretischen Trennung von DNA-Fragmenten verwendet. Hierzu wurden 150 ml TAE--Puffer mit 1,5 g Agarose bis zur vollständigen Auflösung der Agarose erhitzt. Nach Abkühlung unter ca. 60°C wurden 7,5 µl Ethidiumbromid (10µg/µl) zugegeben, was einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml entspricht.

3.2.3 Phenolische Extraktion und alkoholische Fällung von DNA

Phenolische Extraktion

Um hochreine DNA frei von Proteinen, Salzen und anderen Kontaminationen zu gewinnen, wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender alkoholischer Fällung durchgeführt. Die DNA-Lösung wurde nach Zugabe von 1 µl tRNA (50µg/µl) mit dem gleichen Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, kräftig gemischt und 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen an Chloroform versetzt, gemischt und erneut für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die obere Phase sauber abgenommen und einer alkoholischen Fällung unterzogen.

Alkoholische Fällung

Es wurden 0,1 Volumina 3M NaCl und entweder 2,5 Volumina Ethanol oder 0,7 Volumina Isopropanol zugegeben. Nach mindestens 30 min bei -20°C wurde die DNA für 15 min bei 4°C und 13000 rpm pelletiert, für weitere 5 min bei 13000 rpm mit 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen des DNA-Pellets in H₂O_{dd} oder TE gelöst.

3.2.4 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente aus Agarosegelen zu extrahieren, wurde das QiaQuick Gel Extraction Kit von Qiagen entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

3.2.5 DNA-Extraktion aus *Drosophila*

Ein bis fünf betäubte Fliegen wurden in 30 µl Puffer B mit 200 µg/ml Proteinase K in einem Reaktionsgefäß aufgenommen und mit einem Pistill homogenisiert. Anschließend wurden 2 µl 10% SDS zugesetzt und der Ansatz für 1-2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 3 µl 3M NaCl zugesetzt und eine Extraktion mit 35 µl Phenol/Chloroform durchgeführt. Die wässrige Phase wurde abgenommen, mit 50 µl Ethanol für 20 min auf Eis inkubiert und für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol 5 min bei 13000 rpm gewaschen und nach Trocknung in der Vakuumzentrifuge in 30 µl TE gelöst.

3.2.6 5'-Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um eine Religation kompatibler Plasmidenden zu vermeiden, wurde eine Dephosphorylierung der 5'-Enden mittels SAP (shrimp alkaline phosphatase) durchgeführt. Hierzu wurden nach Verdau des Plasmids 10 U SAP zum Ansatz zugegeben, anschließend für 15 min bei 37°C inkubiert und danach die SAP für 10 min bei 65°C hitzeinaktiviert.

3.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

50-100 ng des verdauten und dephosphorylierten Vektors wurden mit einem molaren Überschuß an Insert (1:3 - 1:5) und 5 U T4 DNA-Ligase in einem 10 µl-Ansatz mit dem passenden Ligationspuffer über Nacht bei 16°C inkubiert. Anschließend wurde die Ligation durch Erhitzen auf 65°C für 10 min gestoppt.

3.2.8 Transformation von *E. coli*

Transformation durch Hitzeschock

100 µl Hitzeschock-kompetente *E. coli* DH5α (hergestellt nach der Rubidiumchloridmethode) wurden auf Eis langsam aufgetaut. Ca. 50 ng eines geschlossenen Plasmids oder ein kompletter Ligationsansatz wurden zugegeben und für 20 min auf Eis mit den Bakterien inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 90 sec bei 42°C wurde der Ansatz erneut für 5 min auf Eis gestellt, anschließend mit 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikum für 45 min bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert und

nach Ausplattieren auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht bei 37°C inkubiert.

Transformation durch Elektroporation

Bei Klonierungen mit geringer Transformationseffizienz wurden 100 µl elektrokompetente DH5α langsam auf Eis aufgetaut und 1 min mit 1-2 µl Ligationsansatz auf Eis inkubiert, anschließend mit einer Pasteurpipette in eine gekühlte Elektroporationsküvette transferiert und bei 2,5 kV im Elektroporationsgerät transformiert. Anschließend wurde 1 ml LB-Medium zugegeben, die Suspension in ein Reaktionsgefäß überführt, für 45 min bei 37°C geschüttelt, auf Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.9 Plasmid-Präparation ‚Mini prep‘

Eine mit einer Einzelkolonie inokulierte Übernachtskultur von 1,5 ml wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und für 1 min bei 13000 rpm pelletiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in 200 µl Lösung 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung 2 und einer Inkubation von 5 min bei RT wurden 200 µl Lösung 3 zugegeben und erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer wurden 10 min bei 13000 rpm pelletiert und 500 µl Überstand mit der Plasmid-DNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 350 µl Propanol wurde die DNA für mindestens 10 min auf Eis gefällt. Nach 10 min bei 13000 rpm wurde das DNA-Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol für weitere 5 min bei 13000 rpm gewaschen und anschließend in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Das Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und nach Lösen bei -20°C gelagert.

3.2.10 Plasmid-Präparation ‚Midi prep‘

Zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA wurde eine mit einer Einzelkolonie angeimpfte Übernachtskultur von 100ml verwendet. Die Präparation erfolgte mittels des Plasmid Midi Kit Nucleobond AX von Macherey-Nagel entsprechend den Herstellerangaben. Anschließend wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt und auf 1 µg/µl in TE eingestellt.

3.2.11 Polymerase-Kettenreaktion

Standard PCR

Die *Polymerase Chain Reaction* (PCR) wurde je nach Anwendung mit *Taq*-Polymerase oder *Pfu*-Polymerase durchgeführt. Ein Standardansatz einer präparativen PCR enthielt bei einem Gesamtvolumen von 50 µl 1 µg Template-DNA, je 200 nM dNTP-Mix (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), je 1 µM Primermix, 1-2 U Polymerase und den entsprechenden Puffer. Die PCR wurde in einem Thermocycler nach folgendem Standardprotokoll durchgeführt, wobei Anzahl der Amplifikationszyklen, Annealingtemperatur und Dauer des Elongationsschritts individuell angepasst wurden.

Schritt 1:	initiale Denaturierung	95°C für 1 min
Schritt 2:	Denaturierung	95°C für 30 sec
Schritt 3:	Annealing	50-60°C für 1 min
Schritt 4:	Elongation	68°C (<i>Pfu</i>)/72°C (<i>Taq</i>) für 1 min/kb
Schritt 5:	29x Wiederholung Schritte 2-4	
Schritt 6:	Endelongation	68°C (<i>Pfu</i>)/72°C (<i>Taq</i>) für 7 min

Für analytische PCRs wurde der Reaktionsansatz auf 10 µl Gesamtvolumen herabskaliert. Die Templatemenge lag bei 50-200 ng DNA. Zur Amplifikation großer DNA-Fragmente bis 10 kb wurde das Expand High Fidelity PCR Kit von Roche entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

Colony PCR

Die Identifikation korrekter Klone bei einer Klonierung kann entweder wie beschrieben per Plasmidpräparation und anschließender Restriktionsanalyse erfolgen oder die Einzelkolonien können ohne vorherige Plasmidpräparation direkt einer analytischen Colony PCR unterzogen werden.

Für eine Colony PCR wurde ein 12,5 µl Ansatz mit *Taq*-Polymerase wie oben beschrieben hergestellt. Anschließend wurde eine Einzelkolonie mittels sterilem Zahnstocher gepickt, kurz im Reaktionsansatz geschwenkt und anschließend auf

einer neuen Platte mit Selektionsmedium ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert, um positive Klone später weiter für eine Plasmidpräparation verwenden zu können. Nach der PCR wurden die Reaktionsansätze einer Gelelektrophorese unterzogen, um positive Klone an korrekten PCR-Produkten zu identifizieren.

3.2.12 DNA-Mutagenese mittels ‚site directed mutagenesis‘

Mittels dieser PCR-basierten Technik können gezielt gewünschte Punktmutationen in DNA eingeführt werden. Dazu wurden zwei komplementäre, den zu mutierenden Locus umfassende Primer verwendet, die die gewünschte Mutation aufweisen. Da die Primer komplementär sind, muss das gesamte Template-Plasmid amplifiziert werden, was bei der Dauer des Elongationsschritts zu berücksichtigen ist. Die Template-Menge betrug 1-10 ng und es wurden 20 Amplifikationszyklen durchgeführt. Ansonsten entspricht der Ansatz einer Standard-PCR mit *Pfu*-Polymerase. Nach der PCR wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt und das Template mittels eines DpnI-Verdau für 2h bei 37°C abgebaut. DpnI ist ein methylierungssensitives Restriktionsenzym, das nur die methylierte Template-DNA schneidet, das unmethylierte PCR-Produkt jedoch nicht. Das Template musste somit zunächst aus einem *dam*⁺ *E. coli*-Stamm isoliert werden. Nach dem Verdau wurde eine erneute Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender alkoholischer Fällung durchgeführt und das PCR-Produkt mittels Elektroporation in *E. coli* transformiert, auf Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert. Aus den gewachsenen Kolonien wurde die Plasmid-DNA isoliert und sequenziert, um Klone mit der gewünschten Mutation zu identifizieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels der Primer PL28 und PL29 eine NcoI-Restriktionsschnittstelle im 3'UTR von *slam* eingeführt.

3.2.13 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen wurden entweder durch die Firma SeqLab (Göttingen) oder mit Hilfe des Sequenzierungs-Service der Abteilung für Entwicklungsbiochemie, GZMB, Universität Göttingen durchgeführt.

Für SeqLab-Sequenzierungen wurden ca. 600 ng Plasmid-DNA mit 20 pmol des entsprechenden Sequenzierprimers in ein Gesamtvolumen von 7 µl in H₂O_{dd} aufgenommen und eingesendet.

Im Falle von durch den abteilungseigenen Sequenzierservice durchgeführten Sequenzierungen wurden 200-400 ng Plasmid-DNA mit 8 pmol Primer, 1,5 µl Seq-Mix und 1,5 µl Seq-Puffer in ein Gesamtvolumen von 10 µl in H₂O_{dd} aufgenommen und einer PCR unterzogen.

- Schritt 1: 96°C für 10 sec
- Schritt 2: 50-55°C für 15 sec
- Schritt 3: 60°C für 4 min
- Schritt 4: 24x Wiederholung Schritt 1-3

Anschließend wurden 1 µl 125 mM EDTA, 1 µl 3 M Natriumacetat und 50 µl 100% Ethanol zugegeben, 5 min bei RT inkubiert und anschließend 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach Waschen mit 70% Ethanol für 5 min bei 13000 rpm wurde das Pellet in der Vakuumzentrifuge getrocknet, in 15 µl HiDi gelöst und bis zur Sequenzierung durch den Service bei -20°C gelagert.

3.2.14 Konstrukte

pEG202/*slam1-4*

Um Interaktoren von Slam per Yeast-two-Hybrid screen (Y2H) zu identifizieren wurden 4 überlappende Fragmente der *slam* CDS (*slam1-4*) sowie die vollständige *slam* CDS (*slam* FL) in den prey-Vektor pEG202 inkloniert.

slam1 (900bp): Die bp 1-900 der *slam* CDS wurden aus pOT/*slam*EST mit den Primern PL1 (EcoRI) und JG258 (BglII) amplifiziert und dann in pEG202 EcoRI-BamHI kloniert. BglII und BamHI generieren kompatible Schnittstellen.

slam2 (1356bp): Die bp 529-1884 der *slam* CDS wurden aus pOT/*slam*EST mit den Primern PL2 (EcoRI) und JG260 (XhoI) amplifiziert und dann in pEG202 EcoRI-XhoI kloniert.

slam3 (1305bp): Die bp 1522-2826 der *slam* CDS wurden aus pOT/*slam*EST mit den Primern PL3 (EcoRI) und JG262 (XhoI) amplifiziert und dann in pEG202 EcoRI-XhoI kloniert.

slam4 (1089bp): Die bp 2434-3522 der *slam* CDS wurden aus pOT/*slam*EST mit den Primern PL4 (EcoRI) und PL5 (BglII) amplifiziert und dann in pEG202 EcoRI-BamHI kloniert.

slamFL (3522bp): Die bp 1-3522 der *slam* CDS wurden aus pOT/*slam*EST mit den Primern PL1 (EcoRI) und PL5 (BglII) amplifiziert und dann in pEG202 EcoRI-BamHI kloniert.

pUASp/GFP-*slam*

Zunächst wurde ein N-terminales *slam*-Fragment (*slam9*) EcoRI-EcoRI aus pCS/*slam9* ausgeschnitten und EcoRI-EcoRI in pMT/GFP einkloniert. Anschließend wurde das C-terminale *slam*-Fragment *slam6* aus pCS/*slam6* SacII-NotI ausgeschnitten und die NotI-Schnittstelle mittels Klenow-Fragment aufgefüllt. Das Fragment wurde dann SacII-EcoRV in pMT/GFP-*slam9* einkloniert. Das entstandene Konstrukt pMT/GFP-*slam* kodiert ein Fusionsprotein aus GFP und Vollängen-Slam. Schließlich wurde GFP-*slam* XbaI-XbaI aus pMT/GFP-*slam* ausgeschnitten und XbaI-XbaI in pUASP einkloniert.

pUASp-K10 attB/mCherry-*slam*

Vollängen-*slam* wurde aus pUASp/GFP-*slam* EcoRI-NotI ausgeschnitten und EcoRI-NotI in pMT/mCherry einkloniert. Anschließend wurde mCherry-*slam* XbaI-XbaI aus pMT/mCherry-*slam* ausgeschnitten und XbaI-XbaI in pUASp-K10 attB einkloniert.

pUASp-K10 attB/*slam* genomisch

Mittels des High Fidelity Expand PCR Kits (Roche) und den Primerpaaren PL7(SpeI)/PL8 und PL8/PL10(NotI) wurden aus dem BAC RP98-5J04 zwei überlappende Fragmente der genomischen *slam*-Region amplifiziert. Die Fragmente wurden SpeI-KasI bzw. KasI-NotI verdaut und SpeI-NotI in pBKS(+) einkloniert. Anschließend erfolgte eine Sequenzierung mittels der Primer PL1, PL2, PL3, PL4, PL5, PL11, PL12, PL13, PL14, PL15, PL16, PL17, JG107, JG257, JG258, JG262 und JG266. Das genomische 8,6kb *slam*-Fragment wurde dann SpeI-NotI aus pBKS(+)/*slam* genomic ausgeschnitten und nach Auffüllung der SpeI-Schnittstelle mittels Klenow-Fragment HpaI-NotI in pUASp-K10 attB einkloniert.

pUASp-K10 attB/*slam*-MS2-BSx6

Amplifikation der MS2-BSx6 erfolgte mittels der Primer PL26 (NcoI) und PL27 (NcoI) aus pSL-MS2-6. Aus pBKS(+)/*slam* genomic wurde ein 1,8kb-Fragment SacII-KspI ausgeschnitten und SacII-KspI in pBKS(+) einkloniert. Anschließend wurde eine site directed mutagenesis mit den Primern PL28 und PL29 durchgeführt, was den Einbau einer NcoI-Schnittstelle ca. 50 bp hinter dem Stopcodon von *slam* zur Folge hatte. Die MS2-BSx6 wurde dann NcoI-NcoI einkloniert und das entstandene *slam*-MS2-BSx6-Fragment SacII-SacII ausgeschnitten und wieder SacII-SacII in pBKS(+)/*slam* genomic einkloniert. Danach wurde *slam* genomic-MS2-BSx6 SpeI-NotI aus pBKS(+)/*slam* genomisch-MS2-BSx6 ausgeschnitten, die SpeI-Schnittstelle mittels Klenow-Fragment aufgefüllt und HpaI-NotI in pUASp-K10 attB einkloniert.

pUASp-K10 attB /CG9505

GFP wurde BglII-XhoI aus pQE-H10-GFP ausgeschnitten. Ein CG9505 enthaltendes 5,6kb-Fragment (2L 6365346..6370943) wurde aus attB-P[acman]-Cm^R-BW-CH322-177I04 BglII-XhoI ausgeschnitten und BglII-XhoI in pQE-H10 einkloniert. Anschließend wurde das CG9505-Fragment BglII-XhoI ausgeschnitten und BglII-XhoI in pUASp-K10 attB einkloniert.

3.3 Arbeiten mit RNA

3.3.1 DEPC-Behandlung zur Inaktivierung von RNasen

Um einen enzymatischen Abbau von RNA durch ubiquitäre RNasen zu verhindern, wurden für die Arbeit mit RNA bestimmte Lösungen mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. Die aktivierten Ethylreste des zerfallenden DEPC binden hierbei an protonierte Histidine im katalytischen Zentrum von RNase A und inaktivieren diese somit. DEPC wurde 1:1000. Die Lösungen wurden über Nacht bei Raumtemperatur mit DEPC inkubiert und anschließend autoklaviert.

3.3.2 *in vitro* Transkription

Synthese doppelsträngiger RNA für RNAi

Injektion doppelsträngiger RNA in Embryonen führt über mehrere intrazelluläre Prozessierungsstufen zu RNA-Interferenz (RNAi), d.h. zum Abbau komplementärer endogener mRNA und somit zu stark verminderter Expression des entsprechenden Proteins. Diese Technik findet breite Anwendung bei genetischen Untersuchungen in Zellkulturen und *in vivo* und wurde bereits erfolgreich für die funktionelle Analyse früher zygotischer Gene während der Zellularisierung in *Drosophila* angewendet (Pilot *et al*, 2006).

Mittels PCR wurde an intronfreier cDNA ein Teil des zu untersuchenden Gens amplifiziert. Die Primer trugen dabei an ihren 5'-Enden Bindestellen für T7 RNA-Polymerase, welche somit auch Bestandteil des PCR-Produkts sind. Nach gelelektrophoretischer Trennung und Reisolation mittels Qiaquick Gel Extraction Kit wurde das PCR-Produkt als Template für eine *in vitro* Transkription mittels Megascript T7 Kit (Ambion) entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt. Durch simultane Transkription entsteht zu gleichen Teilen sense und antisense-RNA, welche selbstständig paart und somit doppelsträngige RNA bildet.

In der vorliegenden Arbeit wurde dsRNA gegen *slam* mit den Primer MW-S1 und MW-S2 sowie gegen *nullo* mit den Primer MW-N1 und MW-N2 hergestellt. Nach Transkription für 4h bei 37°C wurde die Template-DNA per DNase-Verdau abgebaut und die RNA entsprechend den Angaben des Megascript T7 Kit per Phenol/Chloroform-Extraktion und alkoholischer Fällung aufgereinigt, in nukleasefreiem Wasser gelöst und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Synthese fluoreszenzmarkierter mRNA

Zur Herstellung fluoreszenzmarkierter *slam* mRNA wurde der Templatevektor CS-*slam* zunächst mittels eines NotI-Restriktionsverdau downstream von *slam* linearisiert und anschließend durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung gereinigt. Nun wurde eine Transkriptionsreaktion mittels des mMESSAGING MACHINES High Yield Capped RNA SP6 Kits (Ambion) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt, wobei 1-7% des UTP durch Aminoallyl-UTP (Jena

Biosciences, Jena) substituiert wurden. Nach DNase-Abbau des Templates und erneuter Reinigung mittels Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die aaUTP-mRNA der Markierungsreaktion unterzogen.

1 mg Rhodamine Red-X succinimidylester (RRSE) wurde in 50 µl DMSO gelöst. 14 µl RRSE in DMSO wurden mit ca. 100 µg aaUTP-mRNA und 75 µl 0,1M NaBorat pH 9,0 versetzt und mit nukleasefreiem Wasser auf 100 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach Inkubation für 6h bei RT auf dem Drehrad, wurde eine Alkoholfällung durchgeführt und die fluoreszenzmarkierte mRNA in 100 µl nukleasefreiem Wasser gelöst.

Um ungebundenen Farbstoff zu entfernen, wurde die mRNA auf eine Sephadex G50-Säule gegeben. Hierzu wurde eine 1 ml Spritze mit autoklavierter Glaswolle abgedichtet. Sephadex G50 wurde mit nukleasefreiem Wasser versetzt und für min. 30 min quellen gelassen. Das Säulenmaterial wurde in die Spritze gegeben, mehrfach gespült und für 10 min bei 1000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die zu reinigende mRNA wurde auf die Säule gegeben und erneut für 10 min bei 1000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach erneuter Ethanol-fällung wurde die fluoreszenzmarkierte mRNA in 10 µl nukleasefreiem Wasser gelöst und bis zur Injektion bei -20°C gelagert.

Synthese Dig-markierter RNA-Sonden für *in situ*-Hybridisierungen

Das Plasmid CS-*slam* welches die zu detektierende *slam*-mRNA codiert, wurde zunächst upstream des Startkodons mit HindIII geschnitten und anschließend per Phenol/ Chloroform-Extraktion und alkoholischer Fällung gereinigt. 1 µg DNA wurde mit 2 µl 10x NTP + Dig labelling mix, 2 µl 10x Transkriptionspuffer, 2 µl T7 RNA Polymerase und 1 µl RNase-Inhibitor (20U) in einem Gesamtvolumen von 20 µl in nukleasefreiem Wasser für 2h bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 2 µl DNaseI und erneute Inkubation für 15 min bei 37°C wurde dann die Template-DNA abgebaut. Nun wurden 0,8 µl 0,5M EDTA, 2 µl 5M LiCl und 75 µl Ethanol (-20°C) zugegeben und die RNA für 30 min bei 4°C gefällt. Nach Zentrifugation für 30 min bei 14000 rpm und 4°C und Waschen für 10 min bei 14000 rpm und 4°C wurde das Pellet in 20 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2 µl der Sonde wurden dann mit 1 µl tRNA (50 µg/µl) und 20 µl DEPC-Wasser für 4 min bei 100°C inkubiert, schnell mit Eiswasser abgekühlt, mit 200 µl Hybridisierungslösung versetzt und für die *in situ*-Hybridisierung eingesetzt.

3.4 Arbeiten mit Proteinen

3.4.1 SDS-PAGE und Coomassie-Färbung

Die elektrophoretische Trennung von Proteinextrakten erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Zunächst wurde das Trenngel in die Gelapparatur eingefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach Aushärtung für mindestens 15 min wurde das Isopropanol abgegossen, das Sammelgel eingefüllt und der Kamm luftblasenfrei aufgesteckt. Nach weiteren 15 min war das Sammelgel polymerisiert, der Kamm wurde entfernt und die Taschen wurden mit H₂O_{dd} gespült. Das fertige Gel wurde nun direkt in die Elektrophoresekammer eingespannt und mit SDS-Puffer überschichtet oder eingeschlagen in feuchte Tücher bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Proben wurden mit gleichen Volumina an 2x Laemmli-Puffer versetzt, 10 min bei 96°C inkubiert und neben einem Molekulargewichtsmarker mittels Hamilton-Pipette in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophoretische Trennung erfolgte bei 20 mA und konstanter Spannung für 1-1,5 h. Anschließend wurde das Gel aus der Kammer entnommen, das Sammelgel verworfen und das Trenngel für 30 min in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Unter mehrmaligem Austausch der Entfärbelösung wurde das Gel dann schwenkend entfärbt bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Soweit nicht anders vermerkt wurden 10%ige Gele verwendet.

3.4.2 Western Blot

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen aus embryonalen Extrakten wurde das Trans-Blot SD Semy-Dry Transfersystem benutzt. Drei Lagen Whatmanpapier wurden in Kathodenpuffer getränkt und in die Transferkammer gelegt gefolgt vom Acrylamidgel, einer in Anodenpuffer getränkten Nitrocellulosemembran und weiteren drei in Anodenpuffer getränkten Whatmanpapieren. Anschließend erfolgte der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran bei 60 mA für 2 h. Die Membran wurde dann für 30 min in Blockierlösung geschwenkt und über Nacht bei

4°C mit dem primären Antikörper in PBT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 20 min in PBT wurde der POD-gekoppelte sekundäre Antikörper in PBT zugegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Es wurde erneut dreimal für 20 min in PBT gewaschen. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mittels des ECL plus Western Blotting Detection Systems entsprechend den Herstellerangaben.

3.4.3 *in vitro* Translation

In vitro Translationen erfolgten mittels Reticulocytenlysat aus Kaninchen. 35 µl Lysat, 1 µl Aminosäuremix ohne Methionin (je 1 mM), 1 µl Methionin (1mM), 2 µl RNasin und 1 µg translationskompetente RNA wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl in nucleasefreies Wasser aufgenommen und für 90 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 50 µl 2x Laemmli-Puffer zugegeben und die Proben für 10 min bei 96°C inkubiert. Die Translationsansätze wurden dann wie beschrieben per Western Blot analysiert.

3.5 Zellkulturarbeiten

3.5.1 Kultur von *Drosophila* S2-Zellen

Die Kultivierung nicht adhärenter *Drosophila*-S2-Zellen erfolgte bei 25-27°C in Schneider-Medium mit 10% FCS. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage passagiert und mit neuem Medium 1:10 verdünnt.

3.5.2 Transfektion von *Drosophila* S2-Zellen

Die Transfektion von S2-Zellen erfolgte mittels des Effectene Transfection Kits von Qiagen entsprechend den Herstellerangaben für nicht adhärente Zellen. 1 Tag nach dem Splitten wurden die Zellen abzentrifugiert und nachdem der Überstand verworfen wurde in 10 ml sterilem PBS gewaschen. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert und in neuem Medium zu einer Dichte von $1-5 \times 10^6$ Zellen/ml ausgebracht. Die Transfektion wurde mit je 0,5 µg/µl Plasmid-DNA durchgeführt und die Zellen anschließend für weitere 24h kultiviert. Durch Waschen in PBS wurde dann die Transfektion beendet und die Zellen bis zum weiteren Gebrauch in neuem Medium weiter kultiviert.

3.5.3 Fixierung und Antikörperfärbung von *Drosophila* S2-Zellen

Einen Tag nach der Transfektion wurden 200 µl Zellsuspension auf ein mit Concanavalin A beschichtetes rundes Deckglas pipettiert. Nach 15 min bei Raumtemperatur wurde das Deckglas kurz in PBS getaucht und dann sofort in Fixierpuffer (4% Formaldehyd in PBS) gegeben. Nach Fixierung für 20 min bei RT wurde zweimal kurz in PBS gewaschen und die Zellen dann für 10 min bei RT in 0,5% NP-40 in PBS permeabilisiert. Das Deckglas mit den Zellen wurde dann einmal kurz in PBS gewaschen und für 15 min in PBS + 5% BSA blockiert. Es folgte die Inkubation mit den primären Antikörpern für 1h bei RT in PBS + 0,5% BSA. Nach mehrmaligem kurzem Waschen in PBS wurden die sekundären Antikörper für 1h bei RT in PBS + 0,5% BSA zugegeben. Anschließend wurde wieder mehrfach kurz in PBS gewaschen und eine DAPI-Färbung durchgeführt. Hierzu wurden 50 µl PBS mit DAPI (1:250) auf Parafilm pipettiert und das Deckglas aufgelegt. Nach max 3 min wurde ca. 40x kurz in PBS und einmal in Wasser gewaschen, überschüssige Flüssigkeit auf Papier abgetropft und das Deckglas mit Aqua Polymount auf einen Objektträger aufgebracht.

3.6. Mikroskopie

3.6.1 live imaging von Fliegenembryonen

Embryonen wurden wie unter 3.1.10 beschrieben auf Apfelsaftagarplatten gesammelt, dechorioniert, aufgereiht und auf ein Deckgläschen geklebt. Das Deckgläschen wurde mittels doppelseitigem Klebeband auf einen speziell angefertigten Aluminiumobjektträger geklebt und anschließend die Embryonen mit Voltalef 10S-Öl überschichtet. An einem inversen Mikroskop konnte dann die Entwicklung dokumentiert werden.

3.6.2 FRAP-Analyse (fluorescence-recovery after photobleaching)

Als Tiff-Dateien exportierte FRAP-Mikroskopaufnahmen von Fliegenembryonen wurden nach Z-Ebenen getrennt in ImageJ importiert. Nach Fusion geeigneter Z-Ebenen zur Erfassung aller Signale wurden die Helligkeitsintensitäten von Hintergrund und den zu messenden FRAP-Bereichen in ImageJ gemessen. Die Messdaten wurden dann in MS-Excel übertragen. Nach Abzug des Hintergrundsignals wurden für jeden Zeitpunkt der Aufnahme die relativen Fluoreszenzintensitäten des FRAP-Bereichs errechnet und in MS Excel graphisch

dargestellt. Referenz für die Berechnung der relativen Fluoreszenz war die gemittelte Signalstärke des FRAP-Bereichs vor dem Bleichen.

4. Ergebnisse

4.1 Funktionsanalyse von Slam in der Zellularisierung mittels genetischer Methoden

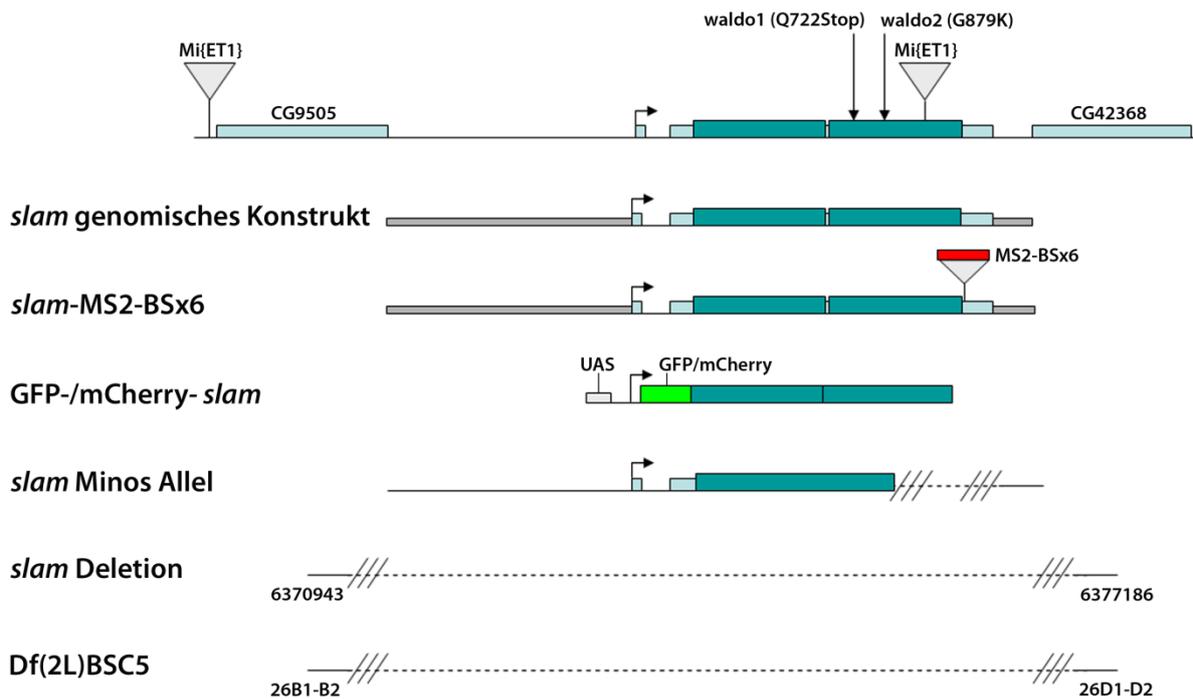
4.1.1 Genetik von *slam*

Vor Beginn dieser Arbeit existierten zur Untersuchung der Funktion von *slam* während der Zellularisierung lediglich die *slam*-Allele *slam*^{waldo1} und *slam*^{waldo2}, die Punktmutation tragen, welche ein C-terminal verkürztes (*slam*^{waldo1} Q722Stop) bzw. verändertes Protein codieren (*slam*^{waldo2} G879K), sowie den *slam*-Lokus und viele andere Gene umfassende cytologische Defizienzen (u.A. Df(2L)BSC5 (2L 26B1-2..26D1-2), nachfolgend als Df*slam* bezeichnet) (Lecuit *et al.*, 2002, Stein *et al.*, 2002). In der Arbeit wurden eine Reihe von Fliegenstämmen mit transgenen *slam*-Konstrukten und -Deletionen generiert, die nachfolgend beschrieben werden (s. Abb4.1)

Zunächst wurden Fliegen erzeugt, die Fusionen aus Slam und Fluoreszenzproteinen exprimieren, um die Lokalisation mittels live imaging in lebenden Embryonen zu verfolgen. Ein UASp-GFP-*slam* wurde mittels klassischer Keimbahntransformation auf dem dritten Chromosom lokalisiert, was in Kombination mit mat67 Gal4 eine starke maternale und zygotische Expression von GFP-Slam ermöglicht. Außerdem wurden mit Hilfe des PhiC31-Systems Fliegen erzeugt, die ein UASp-mCherry-*slam* Konstrukt auf dem dritten Chromosom tragen, das ebenfalls durch mat67 Gal4 maternal und zygotisch exprimiert wird (s. 3.1.11 und 3.2.14).

Es wurde weiterhin ein PhiC31-Transgen des genomischen *slam*-Lokus auf dem dritten Chromosom erzeugt, um die Expression von *slam* mittels des endogenen Promotors und somit wildtypischen Proteinlevels zu ermöglichen. Das 8,6kb-Konstrukt (2L 6370196..6378843) umfasst den gesamten *slam*-Lokus bis zu den flankierenden Genen CG9505 und CG42368, da die genaue Lage des *slam*-Promotorbereichs unbekannt ist. Zur Untersuchung der mRNA-Lokalisationsdynamik in lebenden Embryonen wurde ein genomisches *slam*-MS2-BSx6-Transgen hergestellt, das im 3'UTR sechs MS2-bindestellen trägt. In Kombination mit MCP-GFP ermöglicht seine Expression somit eine Fluoreszenzmarkierung der *slam*-mRNA unter dem endogenen Promotor.

A *slam* Lokus - Konstrukte & Deletionen



B *slam* genomische Region 2L 26C4 - *slam* Deletion

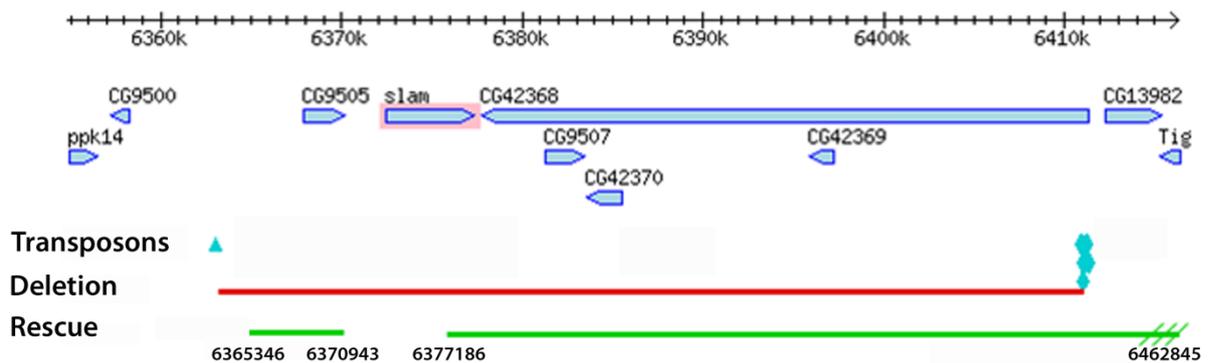


Abb. 4.1:

Genomische Region von *slam*, transgene Konstrukte und Deletionen

A: Genomischer Lokus von *slam* sowie in dieser Arbeit generierte bzw. genutzte transgene *slam*-Konstrukte und Deletionen. B: Genomische *slam*-Region und Darstellung der zur FRT-basierten Erzeugung der *slam*-Deletion (Nullallel) genutzten Transposons und der zur Rettung der flankierenden deletierten Gene verwendeten BACs.

4.1.2 Rettung des Zellularisierungsphänotyps

Um die Funktionalität der *slam*-Transgene zu verifizieren wurden Rettungsexperimente mit *Dfslam* und *slam^{waldo1}* durchgeführt, die beide im homozygoten Zustand einen letalen Zellularisierungsphänotyp zeigen. Abb. 4.2 zeigt die erfolgreiche Rettung des von *Df slam* verursachten Phänotyps durch *mat67/UASp GFP-slam* und das genomische *slam*-Konstrukt. Da die Defizienz weitere essentielle Gene betrifft entwickelten sich jedoch keine lebensfähigen Fliegen. Die Rettung von *slam^{waldo1}* durch das MS2-BSx6-Transgen resultierte hingegen in lebensfähigen Imagines (nicht gezeigt).

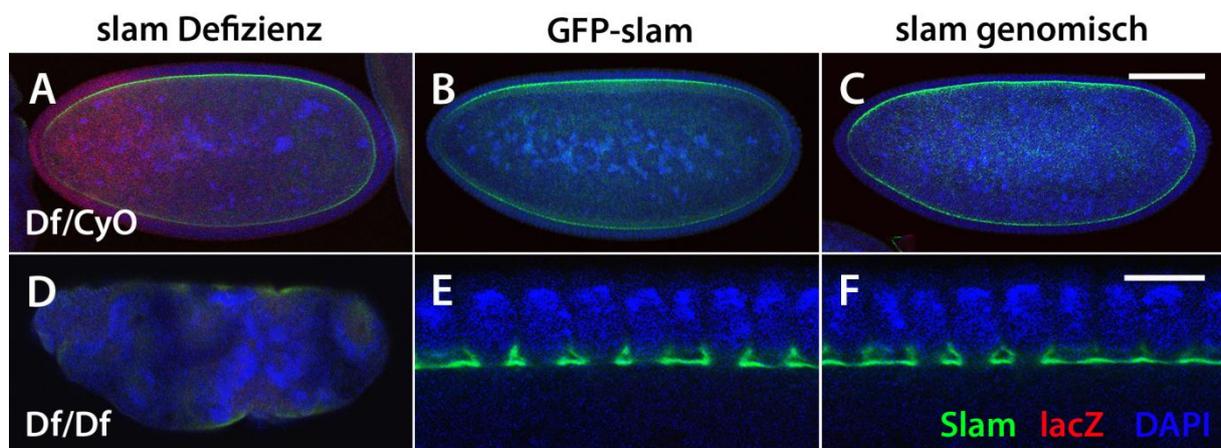


Abb. 4.2:

Rettung des Zellularisierungsphänotyps der *slam*-Defizienz durch *mat67/UASp-GFP-slam* und genomisches *slam*-Konstrukt

A-D: Übersichtsaufnahme von mit α -Slam und α -lacZ Antikörpern sowie DAPI gefärbten Embryonen in der Zellularisierung. Gezeigt sind Embryonen heterozygot für *Df(2L)BSC5* mit wildtypischer Zellularisierung (A) bzw. homozygot für *Df(2L)BSC5* mit Zellularisierungsphänotyp (D) sowie die Rettung des Zellularisierungsphänotyps homozygot defizienter Embryonen durch *mat67/UASp-GFP-slam* (B) und genomisches *slam*-Transgen (C). Der weiße Balken entspricht einer Länge von 100 μ m. E-F: Detailansichten der Embryonen aus B (E) und C (F). Der weiße Balken entspricht einer Länge von 10 μ m.

4.1.3 Generation eines neuen *slam*-Allels mittels Exzision transposabler Elemente

Die GFP-markierten Minos-Transposons *Mi{ET1}MB06922* und *Mi{ET1}MB04833* wurden mittels Minos-Transposase mobilisiert um durch unpräzises Ausschneiden der Transposons ein *slam*-Nullallel zu erzeugen (s. 3.1.5 und Abb. 4.1). Ca. 200 GFP-negative Stämme wurden anschließend gegen *Dfslam* gekreuzt und so auf Letalität der Exzision getestet. Mit *Mi{ET1}MB04833* konnten keine letale Allele

generiert werden. Die Mobilisierung von Mi{ET1}MB06922 führte zu sieben letalen Revertanten, die anschließend näher auf Zellularisierungsdefekte hin untersucht wurden.

Lediglich ein Allel (nachfolgend Minos-Deletion genannt) zeigte in homozygoten Embryonen einen in Abb. 4.3 dargestellten letalen Zellularisierungsphänotyp. PCR-basierte Kartierung der Exzision ergab, dass der C-Terminus von *slam* deletiert ist, das erwünschte Nullallel jedoch mit dieser Strategie nicht erhalten wurde. Das 5'-Ende der Deletion konnte nicht exakt ermittelt werden, muss allerdings aufgrund des Zellularisierungsphänotyps, der in *slam*^{waldo1} nicht auftritt 5' von Q722 liegen. Ähnlich wie *slam*^{waldo1} lokalisiert das C-terminal trunke Slam weiterhin am Furchungskanal, was bestätigt, dass der C-Terminus keine Funktion bei der Lokalisation des Proteins hat.

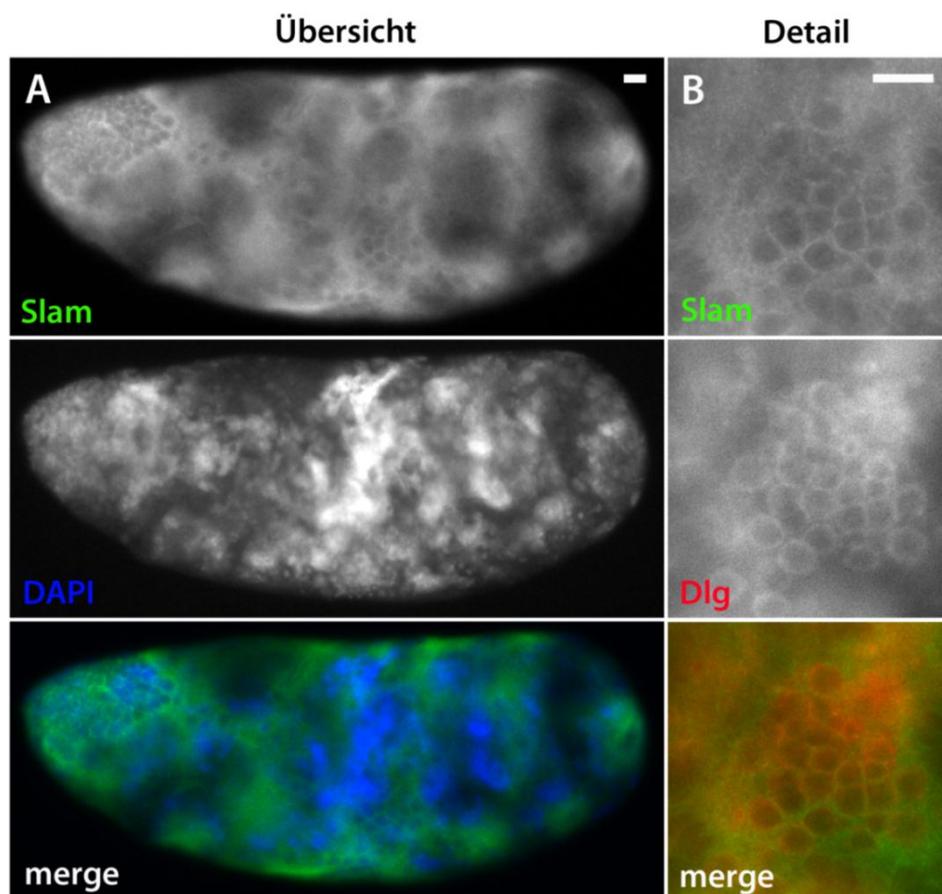


Abb. 4.3:

Zellularisierungsphänotyp der durch Minos-Translokation erzeugten partiellen *slam*-Deletion

A: Übersichtsaufnahme des Zellularisierungsphänotyps der durch Minos-Translokation erzeugten partiellen *slam*-Deletion in einem mit α -Slam-Antikörper und DAPI gefärbten Embryo. B: Detailausschnitt aus A gefärbt mit α -Slam- und α -Dlg-Antikörpern. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 10 μ m.

4.1.4 Generation eines *slam*-Nullallels

Die zweite Strategie zur Erzeugung eines *slam*-Nullallels bediente sich der Flipase-induzierten sequenzspezifischen Rekombination zwischen FRTs. Mittels Rekombination zwischen den FRT-tragenden Transposons PBac{WH}f00173 (2L 6363074.. 6363074 [-]) und P{XP}d03327 (2L 6411326..6411326 [+]), welche durch den Nachweis des entstandenen Hybridtransposons per PCR verifiziert wurde, konnte der gesamte *slam*-Lokus erfolgreich deletiert werden. (s.3.1.4). Die ebenfalls deletierten flankierenden Gene wurden mittels zweier Transgene gerettet. Ein CG9505 beinhaltendes 5,6kb-Transgen (2L 6365346..6370943) auf dem zweiten Chromosom wurde mit dem Nullallel rekombiniert. Die Rettung der Gene CG9507, CG42368, CG42369 und CG42370 erfolgte durch ein 86kb-BAC (2L 6377186..6462845), das auf dem dritten Chromosom integriert wurde (s. 3.2.14 und Abb 4.1). Die *slam*-Deletion wurde mit einem FRT auf dem linken Arm des zweiten Chromosoms rekombiniert. Durch hitzeschockinduzierte Flipase-Expression konnten somit *slam*-Keimbahnklone (*germline clones*, GLC) generiert werden (s.3.1.3).

4.1.5 Invaginationsanalyse der maternalen und zygotischen *slam*-Kontribution

slam RNAi-Experimente, bei denen durch Injektion geeigneter Mengen an *slam* dsRNA ein Slam-Gradient erzeugt wurde, geben einen guten Hinweis auf die Abhängigkeit der Membraninvagination während der Zellularisierung von der Slam-Dosis. Die Invaginationstiefe korreliert mit der am Furchungskanal detektierten Menge an Slam. Trotz des sprunghaften Expressionsanstiegs mit Einsetzen der zygotischen Expression zu Beginn von Zyklus 14 (*mid blastula transition*, MIB) auch in Embryonen, die homozygot für *Dfslam* sind, ein schwaches Slam-Signal am Furchungskanal erkennbar (Wenzl *et al.* 2010). Dies deutet auf eine maternale *slam*-Expression hin.

Durch das in dieser Arbeit erzeugte *slam*-Transgen mit endogenem Promotor sowie das *slam*-Nullallel konnte nun die Abhängigkeit der Membraninvagination von der maternal und zygotisch exprimierten *slam*-Expression genauer analysiert werden. Abb. 4.4 zeigt Bilderserien aus time-lapse-Aufnahmen in Embryonen mit unterschiedlicher maternaler und zygotischer *slam*-Dosis. Die Invaginationsfront wurde hierbei mittels DIC-Optik sichtbar gemacht. Als Referenz wurde die Invagination in Wildtyp-Embryonen betrachtet, die zwei maternale und zwei zygotische Genkopien tragen. Transgene mit dem genomischen *slam*-Konstrukt

sowie dem endogenen Locus tragen die doppelte maternale und zygotische *slam*-Gendosis. Kreuzt man Fliegenweibchen mit *slam*-defizienter Keimbahn gegen heterozygote *Dfslam*-Männchen exprimiert die Hälfte der Nachkommen keinerlei maternales oder zygotisches *slam*. Die andere Hälfte der resultierenden Embryonen hat kein maternales *slam*, trägt jedoch eine zygotische Kopie des Gens. Durch Verpaarung heterozygoter *Dfslam*-Fliegen wurden Embryonen mit einer maternale *slam*-Kopie aber ohne zygotisches *slam* erhalten.

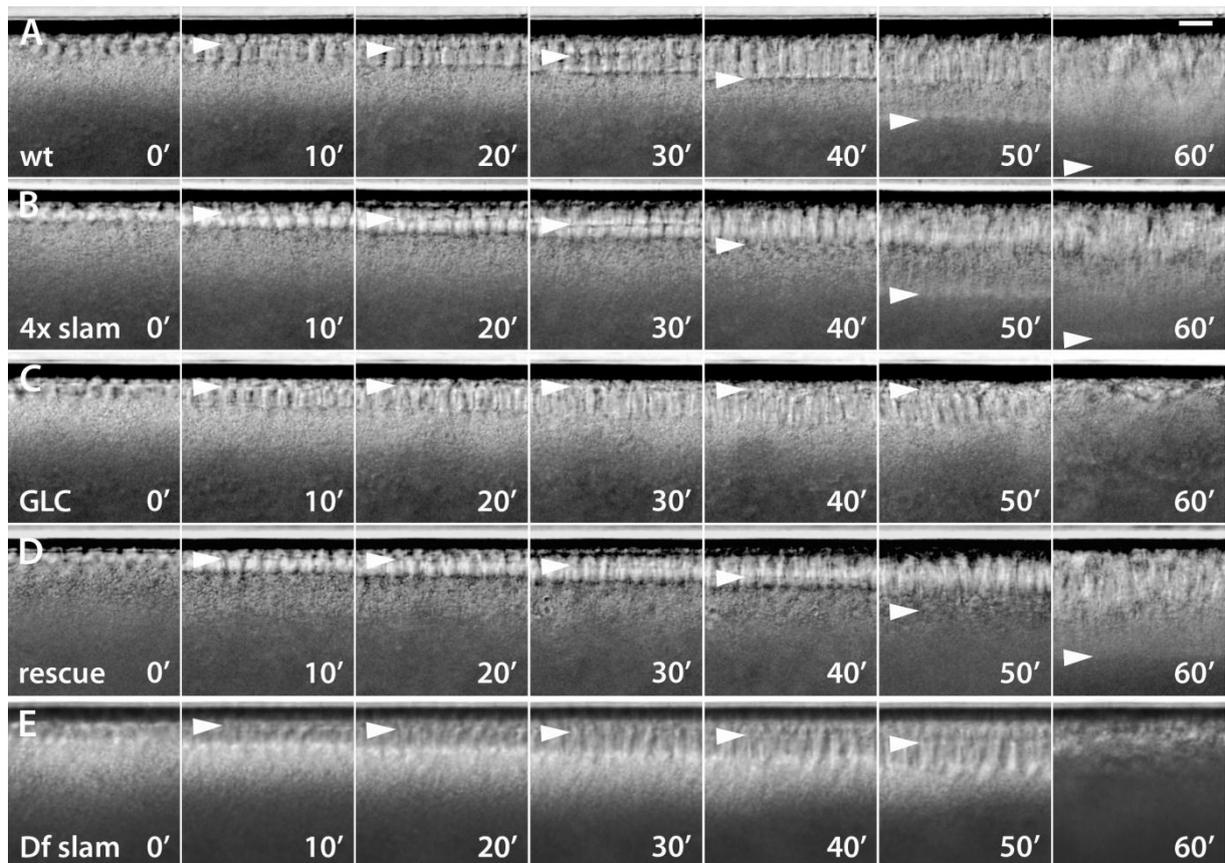


Abb. 4.4:

Zellularisierung in Abhängigkeit der maternalen und zygotischen *slam*-Expression

A-E: Bilderfolge aus DIC-Timelapse-Aufnahmen in Embryonen mit unterschiedlicher maternaler und zygotischer *slam*-Gendosis. A: wildtypischer Embryo (2 maternale und 2 zygotische Genkopien). B: Embryo mit doppelter Gendosis (4 maternale und 4 zygotische Kopien des endogenen Locus). C: *slam*-Keimbahnklon ohne zygotische Rettung (0 maternale und 0 zygotische Genkopien). D: *slam*-Keimbahnklon mit zygotischer Rettung (0 maternale und 1 zygotische Genkopie). E: zygotische Defizienz (1 maternale und 0 zygotische Genkopien). Die Position der invaginierenden Membranfront ist jeweils mit einer weißen Pfeilspitze markiert. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 10 μ m.

Abb.4.5 zeigt die graphische Darstellung der Invaginationsdynamiken in Zyklus 14 in Abhängigkeit von der *slam*-Dosis. Die beschriebene zweiphasige Kinetik mit deutlich verschiedenen Invaginationsgeschwindigkeiten in wildtypischen Fliegen konnte bestätigt werden. Zunächst invaginiert die Membran relativ langsam (*slow phase*) für ca. 35-40 min mit annähernd konstanter Geschwindigkeit, legt dabei aber nur etwa 30% des Invaginationsweges zurück. Danach erhöht sich die Invaginationsgeschwindigkeit deutlich (*fast phase*) und in den verbleibenden 15-20 min werden 70% der Invaginationslänge bis zur *basal closure* und somit der Bildung geschlossener Zellen zurückgelegt (vgl. Lecuit *et al*, 2002).

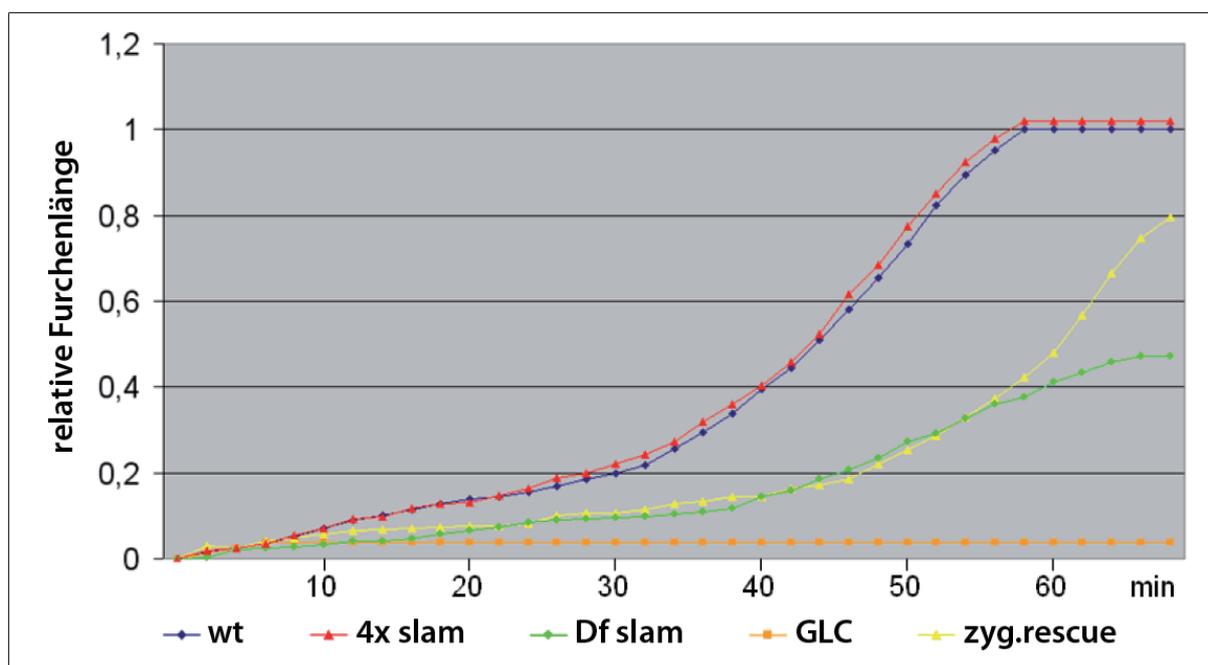


Abb. 4.5:

Invaginationsanalyse während der Zellularisierung in Abhängigkeit der maternalen und zygotischen *slam*-Gendosis

Graphische Darstellung der Membraninvagination während der Zellularisierung in Abhängigkeit der maternalen und zygotischen *slam*-Gendosis. Gezeigt sind die Messdaten eines wildtypischen Embryos (blau), eines Embryos mit doppelter maternaler und zygotischer Gendosis (rot), eines zygotisch defizienten Embryos mit maternaler Expression (grün,) eines *slam*-Keimbahnklons ohne maternale und zygotische Expression (orange) und eines *slam*-Keimbahnklons mit zygotischer Expression (gelb).

Eine Verdoppelung der *slam*-Gendosis hat gegenüber dem Wildtyp keine signifikante Veränderung der Invaginationsgeschwindigkeit und der Länge der entstehenden Zellen zur Folge. Die Wildtyp-Expression scheint somit bereits die maximal verwendbare bzw. benötigte Menge an Slam bereitzustellen.

In Keimbahnklonen ohne jegliche maternale oder zygotische *slam* Expression findet lediglich eine geringe initiale Membraneinstülpung statt. Eine weitere Invagination bleibt während des gesamten Zeitraums der Zellularisierung aus. Der Nullphänotyp ist wesentlich stärker als der bislang von zygotischen *slam*-Mutanten (*slam*^{waldo1}, *slam*^{waldo2}, *Dfslam*) bekannte, bei denen es lediglich zu einer verzögerten Invagination kommt. *slam* ist essentiell für die Membraninvagination an sich und nicht nur für eine schnelle wildtypische Invagination. Trotz des auf ein rein zygotisch exprimiertes Gen hinweisenden sprunghaften Anstiegs der *slam*-Expression zu Beginn von Zyklus 14, zeigt sich, dass *slam* auch maternal exprimiert wird und diese maternale Kontribution wichtig für die Invagination ist.

Die Invagination in Keimbahnklonen mit zygotischer Rettung erweist sich sowohl in der *slow phase* als auch in der *fast phase* als gegenüber dem Wildtyp verlangsamt. Die beschleunigte Invagination zum Ende der Zellularisierung setzt auch später ein als im Wildtyp. Desweiteren ist die finale Invaginationstiefe variabel. Abb.4.4 und 4.5 zeigen die maximal erreichte Invaginationsgeschwindigkeit und -tiefe in Embryonen mit zygotischer Rettung. Nur ca. 40% der Embryonen werden zygotisch gerettet und bilden geschlossene Zellen vor Einsetzen der Gastrulation. Auch in diesen geretteten Embryonen erreichen die gebildeten Zellen nur höchstens 80% der Länge des Wildtyps, was ein weiterer Beweis für den Beitrag der maternalen *slam*-Expression ist.

Zygotisch *slam*-defiziente Embryonen mit maternalem *slam* zeigen ähnlich den maternal defizienten Embryonen mit zygotischer Rettung eine über den gesamten Zeitraum der Zellularisierung verlangsamte Invagination. Der Effekt ist jedoch drastischer und weniger variabel als bei der zygotischen Rettung. Die maximale Invaginationstiefe übersteigt nie 50% des Wildtyps und es kommt immer zu einem letalen Zellularisierungsphänotyp ohne Bildung geschlossener Zellen vor Beginn der Gastrulation. Die zygotische *slam*-Expression ist somit essentiell und von größerer Bedeutung als die maternale, was auch angesichts des sprunghaften Anstiegs der *slam*-Expression mit Beginn von Zyklus 14, der den Übergang von maternaler zu zygotischer Genexpression darstellt, zu erwarten ist.

4.1.6 Analyse des Nullphänotyps in *slam*-Keimbahnklonen

Wie aus der Invaginationsanalyse hervorgeht, spielen sowohl die maternale als auch die zygotische *slam*-Expression eine Rolle bei der Invagination. Der Nullphänotyp in Embryonen ohne maternales oder zygotisches *slam* wurde anschließend eingehender analysiert (Abb.4.6). Das vollständige Fehlen von Slam während der Zellularisierung hat zur Folge, dass die Membraninvagination während der gesamten Dauer von Zyklus 14 unterbleibt. Wie an der Lokalisation von Dlg in Abb.4.6A erkennbar, kommt es allerdings auch in Abwesenheit von Slam zu einer initialen Einstülpung der Membran. Slam ist im Gegensatz zur essentiellen Rolle für die weitere Invagination somit nicht an der Definition der neuen Zellgrenzen und der initialen Furchungskanalbildung beteiligt.

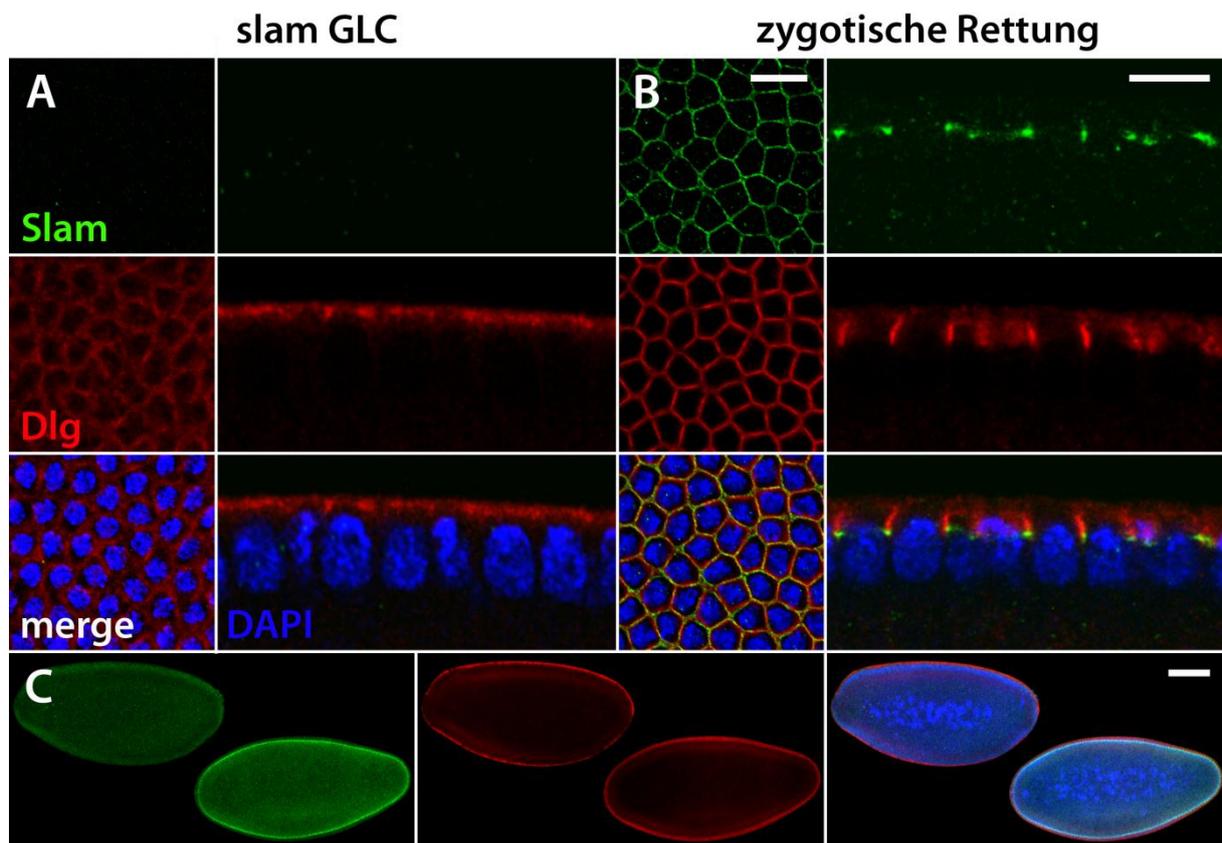


Abb. 4.6:

Zellularisierungsphänotyp in Keimbahnklonen des *slam*-Nullallels und zygotische Rettung

A-B: Färbung *slam*-defizienter Keimbahnklone ohne (A) bzw. mit zygotischer *slam*-Expression (B) mit α -Slam- und α -Dlg-Antikörpern sowie DAPI in Aufsicht und Seitenansicht zu Beginn von Zyklus 14. C: Übersichtsaufnahme der Embryonen in A (links) und B (rechts). Die weißen Balken entsprechen einer Länge von 10 μ m (A, B) bzw. 100 μ m (C).

4.1.7 Lokalisation verschiedener Zellularisierungsmarker in *slam*-Keimbahnklonen

Die erzeugte Nullmutante ermöglichte nun eine Analyse der Auswirkungen des vollständigen Fehlens von Slam am Furchungskanal auf die Lokalisation anderer bekannter Proteine, die eine Funktion während der Zellularisierung haben.

Abb.4.7 zeigt eine Färbung von MyosinII in *slam*-Keimbahnklonen. Es wurde beschrieben, dass die Anwesenheit von MyosinII am Furchungskanal in *slam* RNAi nur wenig betroffen ist (Lecuit *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu zeigt Abb.4.7A, dass die Lokalisation von MyosinII am Furchungskanal in Abwesenheit von Slam vollständig ausbleibt. Zygotische *slam*-Expression rettet diesen Phänotyp. Die Lokalisation von MyosinII am Furchungskanal ist somit eindeutig von Slam abhängig.

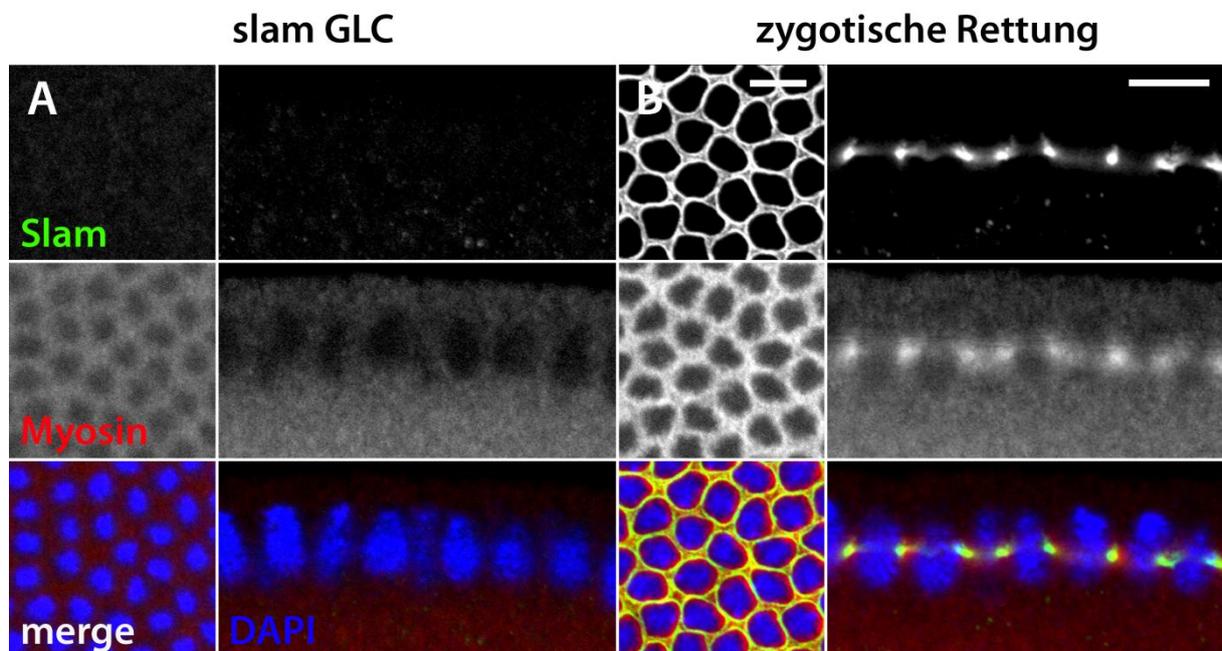


Abb. 4.7:

Lokalisation von MyosinII in *slam*-Keimbahnklonen

A-B: Färbung *slam*-defizienter Keimbahnklone ohne (A) bzw. mit zygotischer *slam*-Expression (B) in Zyklus 14 mit α -Slam- und α -MyosinII-Antikörpern und DAPI. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 10 μ m.

Aktin lokalisiert im Gegensatz zu MyosinII in Abwesenheit von Slam weiterhin am initialen Furchungskanal, wie in Abb.4.8 zu erkennen ist. Auch hier zeigt sich deutlich, dass Slam nicht an der Definition der Invaginationsstellen während der Zellularisierung beteiligt ist. Neben einer diffusen apikalen Aktinlokalisierung sind eindeutig definierte Membraneinstülpungen erkennbar.

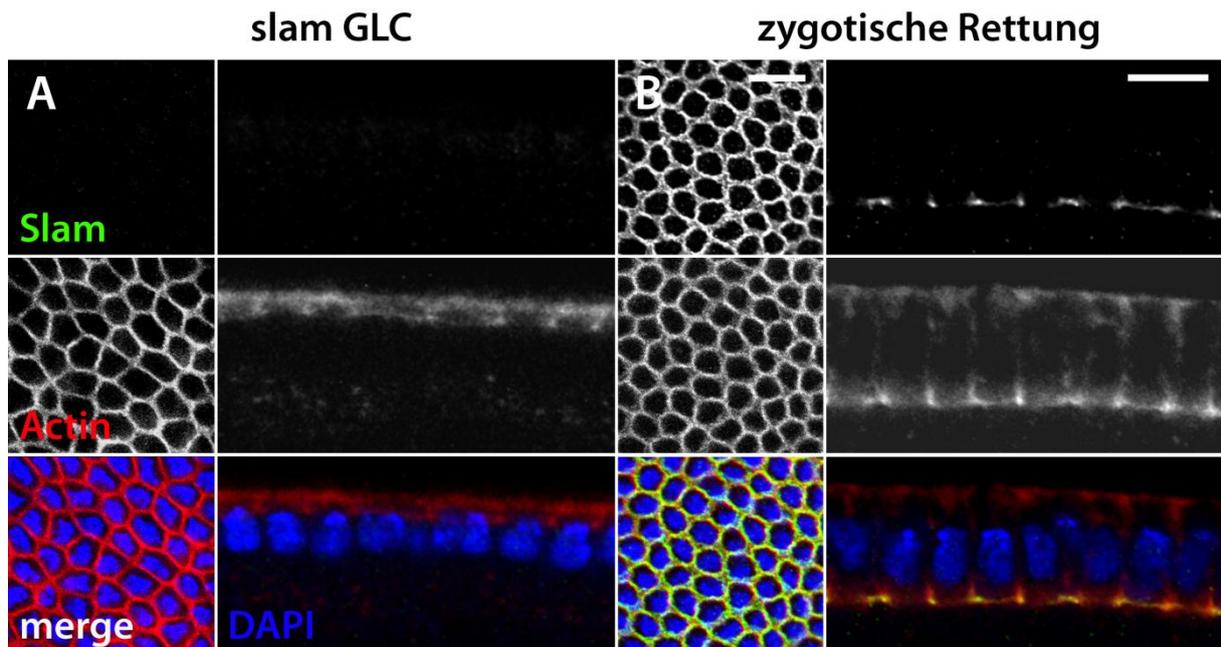


Abb. 4.8:

Lokalisation von Aktin in *slam*-Keimbahnkonen

A-B: Färbung *slam*-defizienter Keimbahnklone ohne (A) bzw. mit zygotischer *slam*-Expression (B) in Zyklus 14 mit α -Slam- und α -Actin-Antikörpern und DAPI. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 10 μ m.

Nullu reguliert die Lokalisation von den Furchungskanal stabilisierendem Aktin. In Nullu-Mutanten zeigen einen Phänotyp im späteren Verlauf der Zellularisierung nach Bildung des initialen Furchungskanals. Einzelne zunächst korrekt gebildete Zellgrenzen brechen bei fortschreitender Invagination wieder auf. Es ist somit wie Slam nicht an der anfänglichen Bildung des Furchungskanals beteiligt (Großhans *et al.*, 2005, Sokac und Wieschaus, 2008). Die Lokalisation von Nullu an der Invaginationfront ist durch die Abwesenheit von Slam nicht betroffen. Wie Abb.4.9 zeigt kommt es auch in den Keimbahnklonen zu einer Lokalisation an den initialen Furchen.

Gleichermaßen verhält sich Dia. Auch wenn eine weitere Invagination durch das Fehlen von Slam unterbleibt, lokalisiert Dia an den neuen Grenzen (Abb.4.10). Dies ist in Einklang mit der wildtypischen Aktinlokalisierung am initialen Furchungskanal. Dia ist als Formin an der Stabilisierung von F-Aktin an der Invaginationfront beteiligt (Großhans *et al.*, 2005) Allerdings ist Slam im weiteren Verlauf der Zellularisierung an der Aktivierung von Dia beteiligt, wie weiter unten ausgeführt wird (Wenzl *et al.*, 2010 und Abb. 4.18)

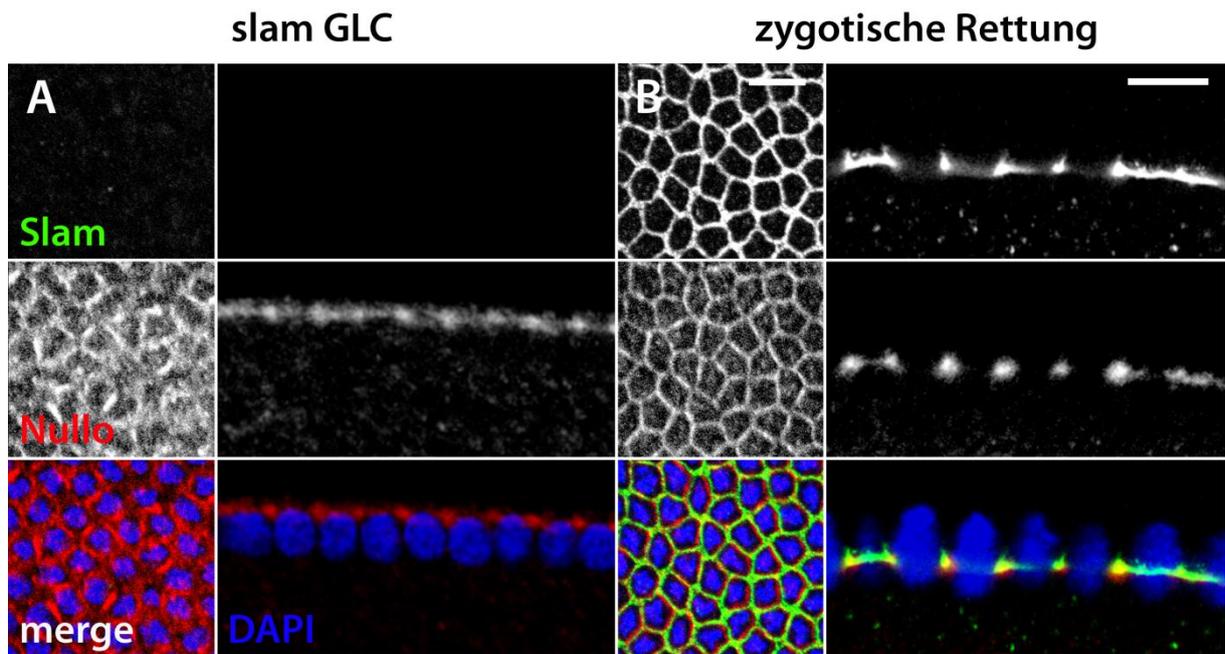


Abb. 4.9:

Lokalisation von Nullo in *slam*-Keimbahnkonen

A-B: Färbung *slam*-defizienter Keimbahnklone ohne (A) bzw. mit zygotischer *slam*-Expression (B) mit α -Slam und α -Nullo-Antikörpern und DAPI in Zyklus 14. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 10 μ m.

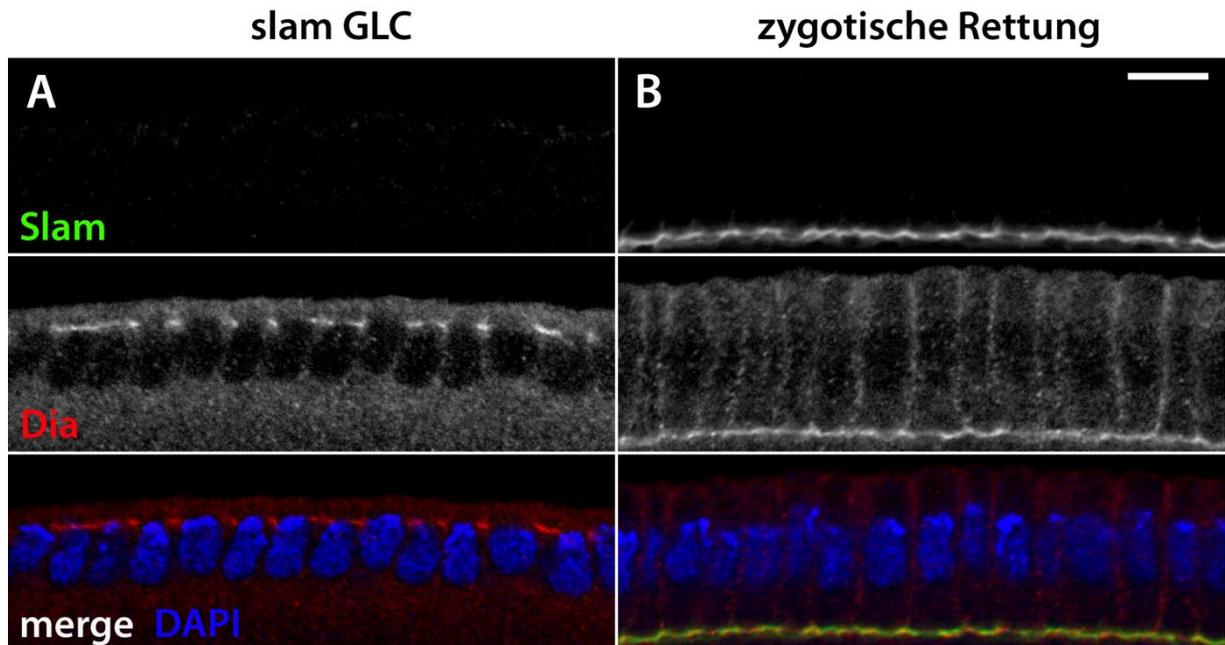


Abb. 4.10:

Lokalisation von Dia in *slam*-Keimbahnkonen

A-B: Färbung *slam*-defizienter Keimbahnklone ohne (A) bzw. mit zygotischer *slam*-Expression (B) in Zyklus 14 mit α -Slam- und α -Dia-Antikörpern und DAPI. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 10 μ m.

Da es während der Zellularisierung zu einer umfassenden Reorganisation der Membran durch endosomalem Transport kommt, wurde eine mögliche Auswirkung der in Abwesenheit von Slam unterbleibenden Membraninvagination auf die Lokalisation des *recycling endosome*-Markers Nuf untersucht. Die pericentrosomale Lokalisation von Nuf ist während Zyklus 14 in *slam*-Keimbahnklonen ebenfalls wildtypisch und unabhängig von der Membraninvagination (s. Abb. 4.11).

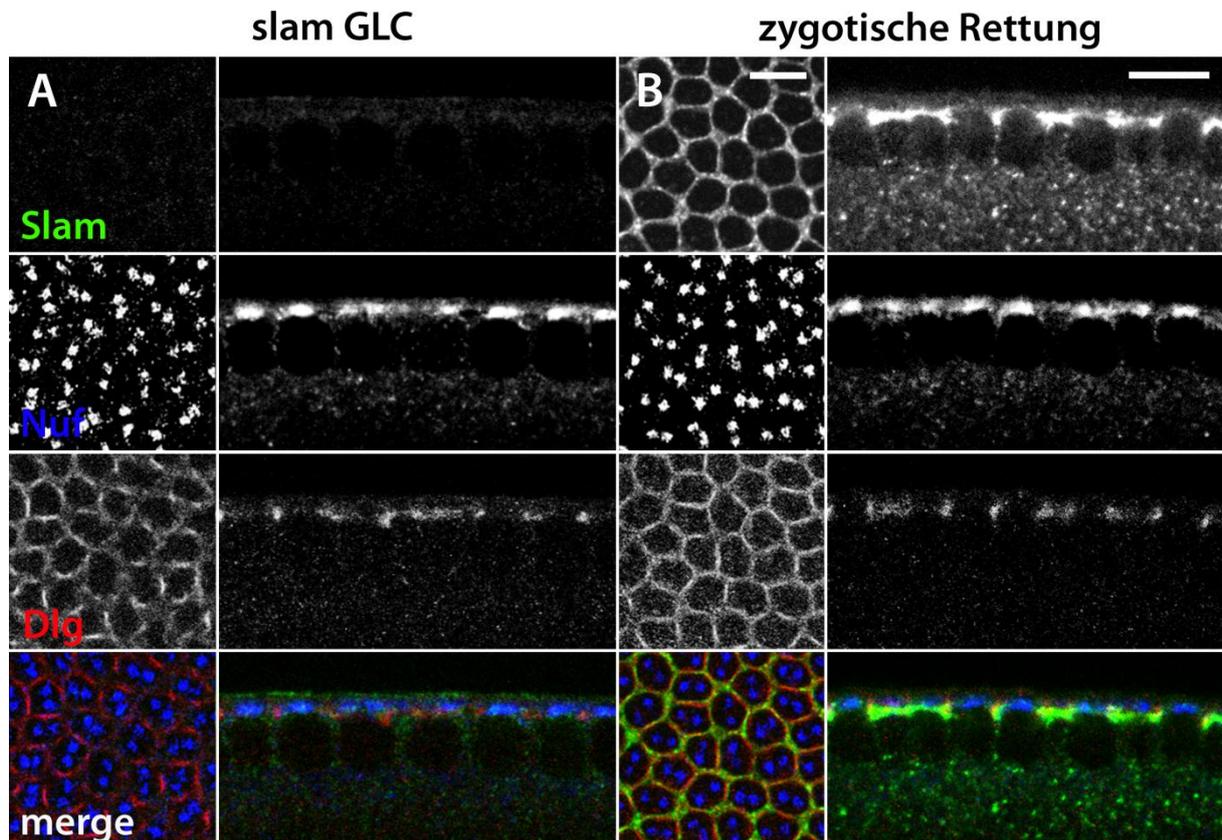


Abb. 4.11:

Lokalisation von Nuf in *slam*-Keimbahnklonen

A-B: Färbung *slam*-defizienter Keimbahnklone ohne (A) bzw. mit zygotischer *slam*-Expression (B) zu Beginn von Zyklus 14 mit α -Slam-, α -Nuf und α -Dlg-Antikörpern sowie DAPI. Die weißen Balken entsprechen einer Länge von 10 μ m.

4.1.8 Aktin-Lokalisation in Abwesenheit von Slam und Nullo

Über die Auswirkungen des Fehlens von Slam hinaus wurde auch die Lokalisation von Aktin in Doppelmutanten von *slam* und *nullo* untersucht. Dass die Nullo-Lokalisation nicht von Slam abhängt, wurde bereits in Abb.4.9 gezeigt. *slam*-Keimbahnklone wurden mit *nullo* dsRNA injiziert und nach einer gewissen Entwicklungszeit in Zyklus 14 fixiert und einer Aktinfärbung unterzogen.

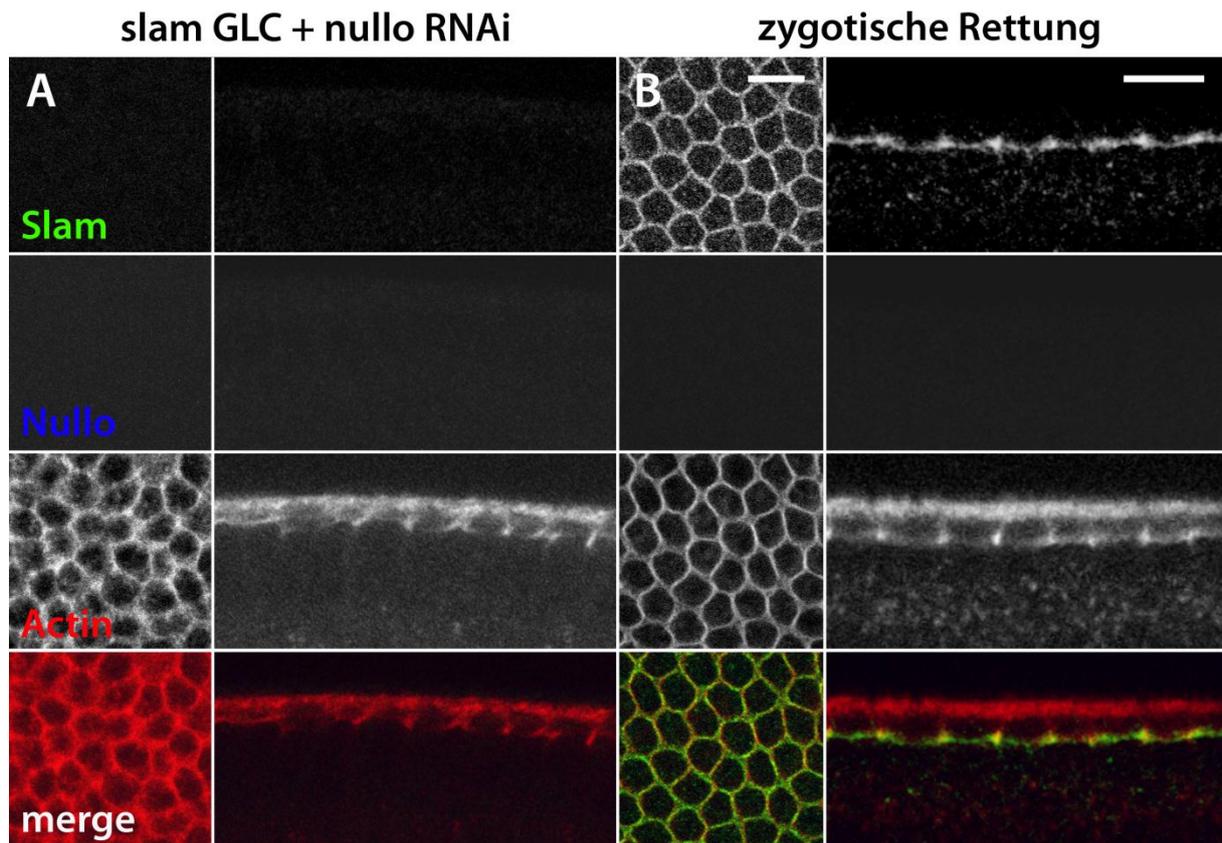


Abb. 4.12:

Lokalisation von Aktin am Furchungskanal in Abwesenheit von Slam und Nullo

A-B: Färbung von mit *nullo* dsRNA injizierten *slam*-Keimbahnklonen mit α -Slam-, α -Nullo- und α -Aktin-Antikörpern während der Zellularisierung ohne (A) und mit zygotischer *slam*-Expression (B). Die weißen Balken entsprechen einer Länge von 10 μ m.

Wie in Abb.4.12 erkennbar lokalisiert kortikales Aktin weiterhin definiert an den sich bildenden Zellgrenzen. Auch in Embryonen ohne Slam und Nullo findet eine initiale Membraninvagination statt. Somit muss es andere Faktoren geben, die für die Definition der Invaginationsstellen verantwortlich sind. Auffällig ist jedoch die teilweise veränderte Morphologie dieses initialen Furchungskanals in den Doppelmutanten. Wie in der Seitenansicht der Aktinfärbung in Abb.4.12A erkennbar, bilden sich z.T. doppelte Invaginationsfronten. Dies konnte in *slam*-Keimbahnklonen sonst nie beobachtet werden. Der *nullo*-Phänotyp einzelner kollabierender Invaginationsfronten später in der Zellularisierung ist auch in der Aufsicht der Aktinfärbung in *slam/nullo*-Doppelmutanten erkennbar. Das Auftreten des *nullo*-Phänotyps ist also ebenfalls unabhängig von der *slam*-abhängigen Membraninvagination. Zusammen mit der in Abb. 4.9 gezeigten Unabhängigkeit der Nullo-Lokalisation am Furchungskanal von Slam zeigt dies, dass *slam* und *nullo* die Zellularisierung in getrennten Signalwegen regulieren.

4.2 Lokalisationen und Dynamik in der Zellularisierung

4.2.1 Lokalisation von Slam während der Zellularisierung

Die Lokalisationsdynamik von Slam wurde zunächst in fixierten Wildtypembryonen untersucht (Abb.4.13). Zu Beginn der Zellularisierung lokalisiert Slam sowohl am Furchungskanal als auch in Partikel basal der Kerne (Abb.4.13A). Später in Zyklus 14 verschwinden die basalen Slam-Partikel. Slam bleibt während der gesamten Zellularisierung bis zur *basal closure* an der Invaginationsfront lokalisiert (Abb.4.13B). Die membranassoziierte Lokalisation am Furchungskanal kann auch per Immunoelektronenmikroskopie bestätigt werden (Abb.4.13C).

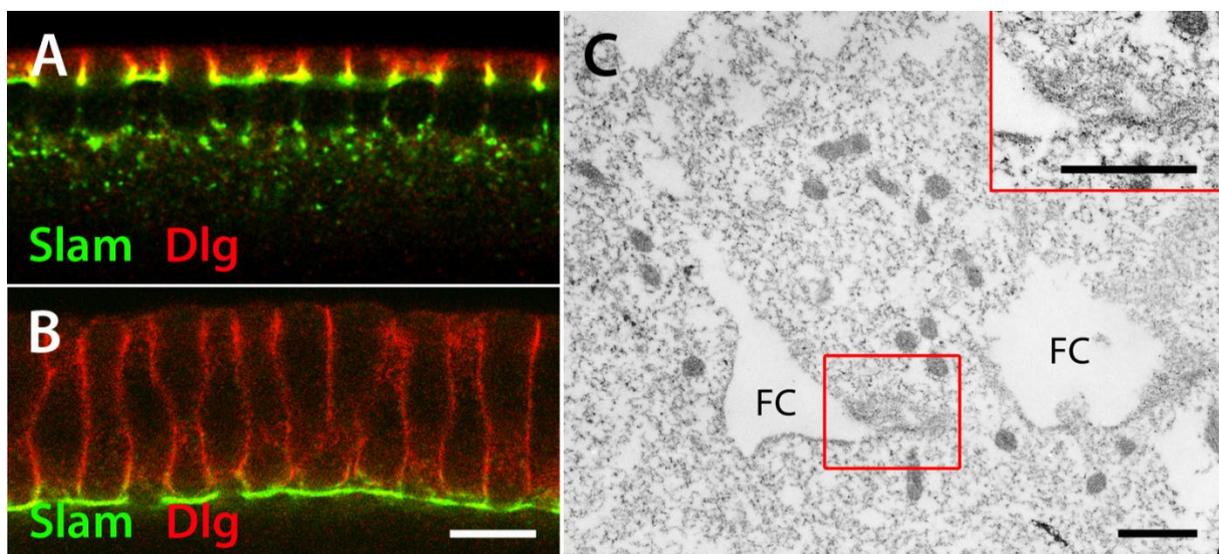


Abb. 4.13:

Lokalisation von Slam am Furchungskanal während der Zellularisierung

A und B: Antikörperfärbung von wt-Embryonen zu Beginn der Zellularisierung (A) und gegen Ende der Zellularisierung (B) mit α -Slam- und α -Dlg-Antikörpern. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 10 μ m. C: elektronenmikroskopische Aufnahme (Immuno-EM) eines mit α -Slam-Antikörper und Immuno-Gold gefärbten Fliegenembryos zu Beginn der Zellularisierung. FC = Furchungskanal, der schwarze Balken entspricht einer Länge von 1 μ m.

4.2.2 live imaging der Slam-Lokalisationsdynamik während der Zellularisierung

Mit Hilfe transgener Fliegen, die Fluoreszenzfusionen von Slam und anderen Zellularisierungsmarkern exprimieren, wurde die Lokalisationsdynamik am Furchungskanal durch schnelle Konfokalmikroskopie lebender Embryonen untersucht. Abb.4.14 zeigt eine Bilderserie aus Timelapse-Aufnahmen eines mat67 Gal4/ UASp-GFP-Slam Embryos zu Beginn der Zellularisierung in der Seitenansicht.

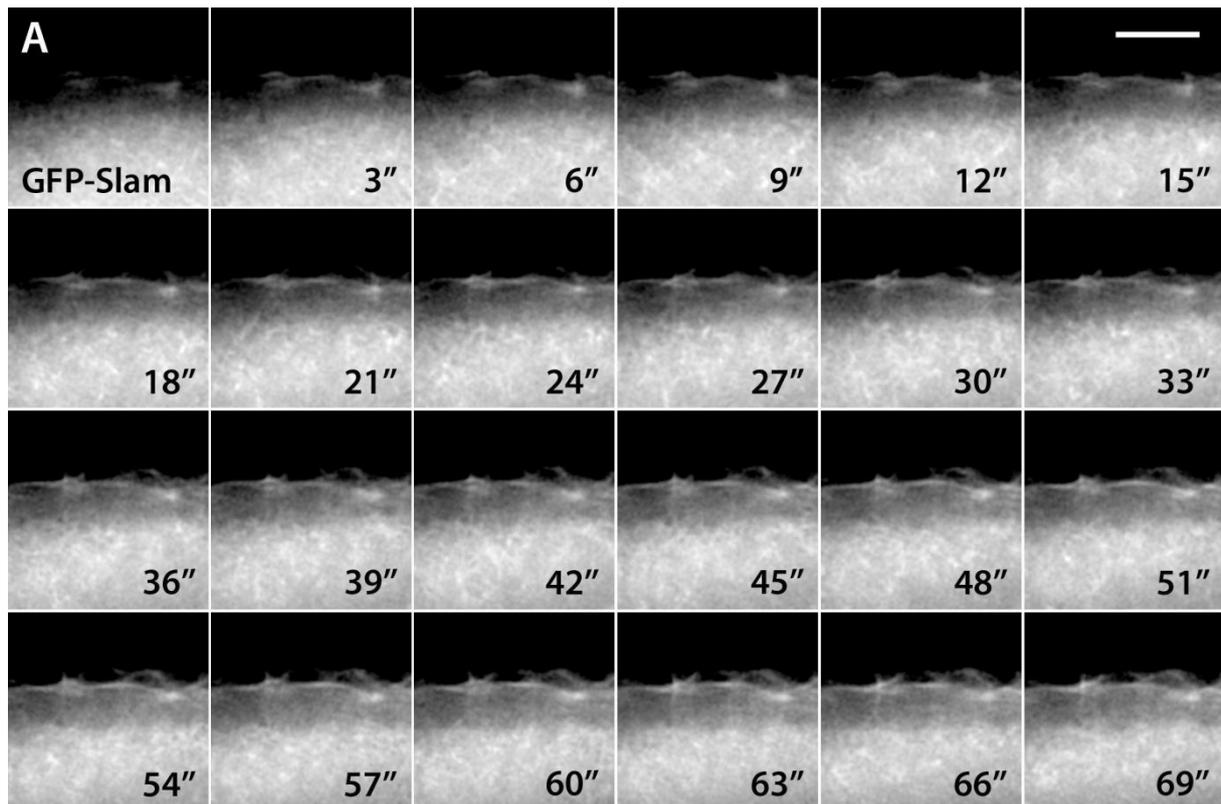


Abb. 4.14:

Lokalisationsdynamik von GFP-Slam in basalen Partikeln zu Beginn der Zellularisierung

A: Bilderserie aus Timelapse-Aufnahmen eines mat67/GFP-Slam Embryos zu Beginn der Zellularisierung. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 5 μ m.

GFP-Slam lokalisiert in einem hochdynamischen Netzwerk basaler Partikel sowie in zunehmender Intensität am Furchungskanal. Das Partikelnetzwerk erscheint zu Beginn der Zellularisierung und nähert sich schnell von basal der Invaginationsfront an. Innerhalb des Netzwerks sind GFP-Slam-markierte Fasern erkennbar, an denen GFP-Slam-Partikel unterschiedlicher Größe ruckartig entlang wandern um dann wieder zu verweilen. Andere Partikel bewegen sich kaum. Die Translokation mobiler Partikel erfolgt überwiegend von basal nach apikal innerhalb des Netzwerks. Eine direkte Wanderung an den Furchungskanal konnte allerdings nicht beobachtet werden. Zur Verfolgung der Lokalisationsdynamik am Furchungskanal ist eine Analyse in der Aufsicht notwendig. Die Mikroskopie von GFP-Slam in Seitenansicht erwies sich darüber hinaus als problematisch, da zum einen in einer Tiefe von ca 50 μ m im Embryo gearbeitet werden muss und der frühe Embryo zum anderen eine starke Autofluoreszenz im grünen Spektralbereich aufweist.

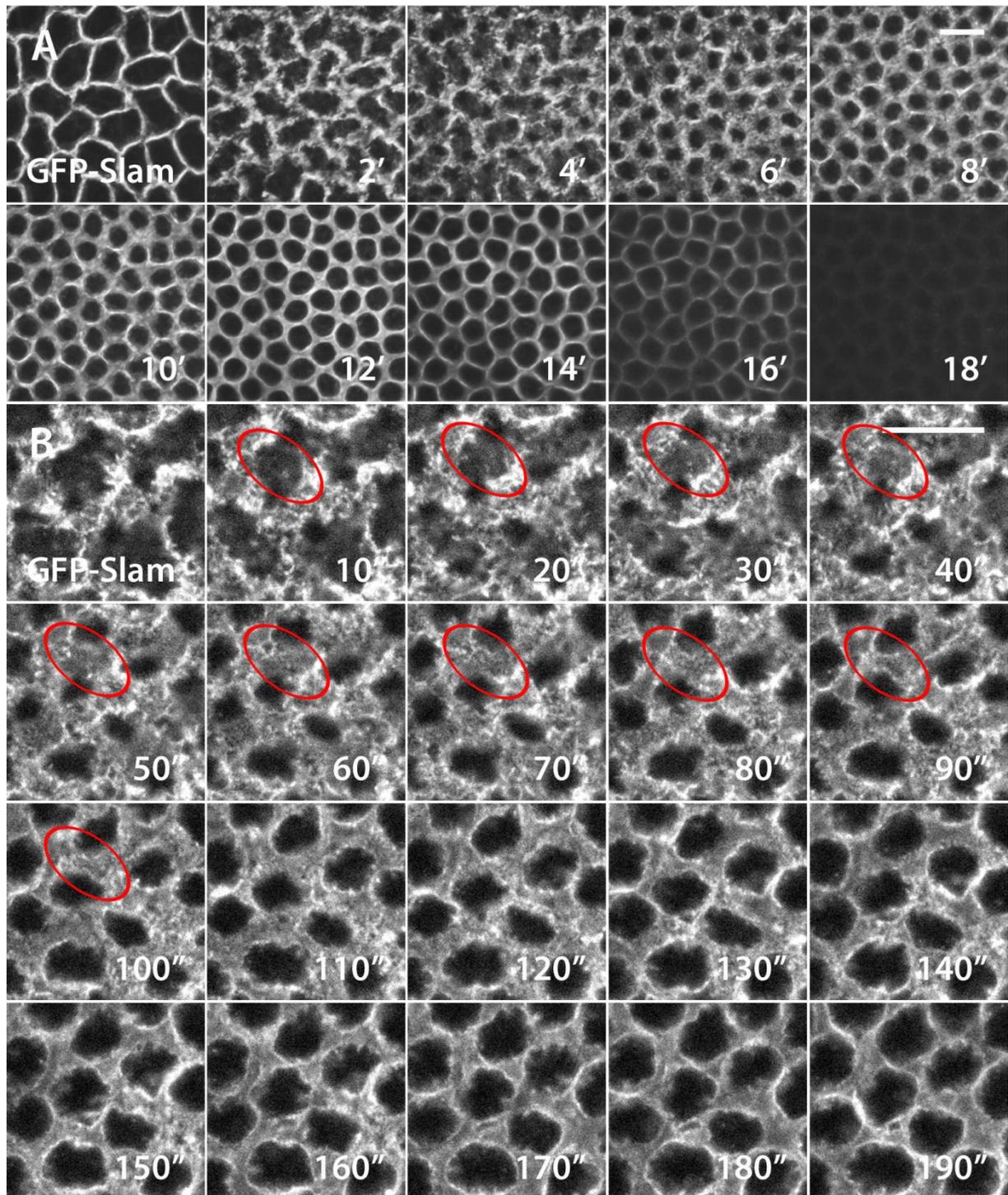


Abb. 4.15:

Lokalisation von GFP-Slam am Furchungskanal zu Beginn der Zellularisierung

A-B: Bilderserien aus Timelapse-Aufnahmen von mat67/GFP-Slam-Embryonen am Anfang der Zellularisierung. Das rote Oval in B zeigt die Bildung einer neuen Invaginationsfurche. Die weißen Balken entsprechen einer Länge von 10 μm .

In Abb. 4.15A ist die Lokalisationsdynamik von GFP-Slam zu Beginn von Zyklus 14 in der Aufsicht dargestellt. Die bereits maternal vor der Zellularisierung einsetzende starke Expression mittels mat67 Gal4 und dem UASp-Promotor hat zur Folge, dass

GFP-Slam auch an der Front der Pseudocleavage-Furchen der vorausgehenden Mitosen lokalisiert. Dies konnte in Färbungen des endogenen Slam nicht beobachtet werden. Mit Rückzug der Pseudocleavage-Furchen Ende Mitose 13 geht auch die GFP-Slam-Lokalisation kurzfristig verloren. Sobald die Membraninvagination wieder einsetzt ist es zunächst diffus an den alten Zellgrenzen erkennbar und erscheint erst kurz darauf an den neuen Invaginationsbereichen. Die Menge an lokalisiertem GFP-Slam steigt hierbei rasch an. Mit fortschreitender Invagination kommt es dann zu einer Konstriktion des zunächst breiten und wenig definiert wirkenden Furchungskanals mit weiterhin ansteigender GFP-Slam-Lokalisation. Nach abgeschlossener Ausbildung des definierten schmalen Furchungskanals und dem damit einhergehenden Maximum der GFP-Slam-Lokalisation wandert das Protein dann im weiteren Verlauf der Zellularisierung mit der Membranfront ein.

Die Lokalisation während der Zellularisierung entspricht somit exakt der in Färbungen mit α -Slam-Antikörpern beobachteten des endogenen Proteins. Eine Lokalisation an lateralen Membranbereichen, wie sie in Färbungen mit α -HA-Antikörpern in *slam*-HA exprimierenden Embryonen beobachtet wurde, findet nicht statt (vgl. Lecuit *et al.*, 2002). Dies ist zusammen mit der erfolgreichen Rettung des Zellularisierungsphänotyps ein guter Hinweis auf die Verwendbarkeit von GFP-Slam als Marker für das endogene Protein.

Eine genauere Analyse der Lokalisationsdynamik zum Zeitpunkt der Bildung der neuen Invaginationsbereiche ist in Abb.4.15B gezeigt. Die Morphologie der mit GFP-Slam markierten Membran an alten Grenzen ist zu diesem Zeitpunkt hochdynamisch. Es kommt zu einer schnellen Bildung und Auflösung von Slam-Aggregationen, die teilweise eine hohe Mobilität aufweisen. Laterale hochdynamische Membranausstülpungen des frühen Furchungskanals bilden sich und ziehen sich wieder zurück. Eine Membranabschnürung an diesen Protrusionen konnte nicht beobachtet werden. An den sich bildenden neuen Furchungskanälen kann ein laterales Einwandern von Slam-Partikeln beobachtet werden.

Trotz dieser Partikel hoher Slam-Konzentration kommt es jedoch zu einer kontinuierlichen flächigen Slam-Lokalisation an den neu entstehenden Furchungskanälen. Nach abgeschlossener Bildung der neuen Grenzen wird die Slam-Lokalisation zunehmend homogener und die laterale Membrandynamik verringert sich. Es bildet sich ein definierter schmaler Furchungskanal, wobei nun neue und alte Grenzen nicht mehr zu unterscheiden sind.

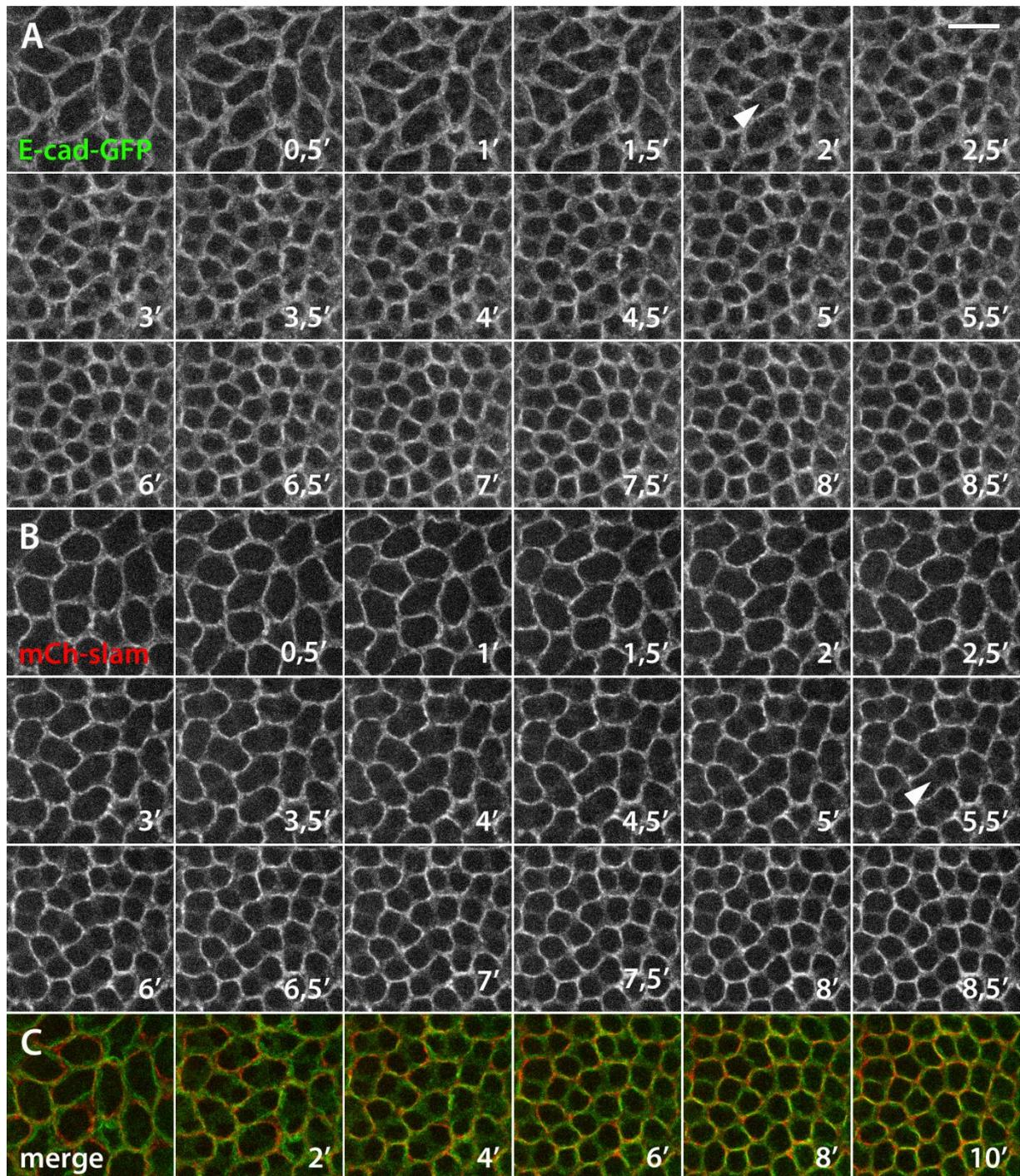


Abb. 4.16:

Lokalisationsdynamik von E-Cadherin-GFP und mCherry-Slam am Furchungskanal

A-C: Bilderserien aus Timelapse-Aufnahmen eines E-Cadherin-GFP (A, C) und mCherry-Slam (B, C) exprimierenden Embryos. Die weißen Pfeilspitzen zeigen das Auftreten von E-Cadherin-GFP und mCherry-Slam an neugebildeten Zellgrenzen. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 10 μ m.

4.2.3 Lokalisation von Slam am Furchungskanal in Relation zu E-Cadherin

E-Cadherin lokalisiert flächig an der Membran des frühen Embryos. Es ist der früheste bekannte Marker des sich bildenden Furchungskanals. Um die Lokalisation von Slam am Furchungskanal in Relation zu diesem frühen Marker zu analysieren wurden Embryonen mit matGAL4-getriebener Expression von E-Cadherin-GFP und mCherry-Slam betrachtet (Abb.4.16). Es zeigt sich, dass mCherry-Slam deutlich nach E-Cadherin-GFP an den neuen Grenzen lokalisiert. Dies bestätigt die Analyse der *slam*-Keimbahnklone, die zeigte, dass Slam nicht an der initialen Definition und Ausbildung des Furchungskanals beteiligt ist.

4.2.4 Abhängigkeit der E-Cadherin Lokalisation von Slam und Nullo

Anschließend wurde die Abhängigkeit der E-Cadherin-Lokalisation am Furchungskanal von Slam und Nullo untersucht. Hierzu wurden mat67/GFP-E-Cadherin-Embryonen mit *slam* und/oder *nullo* dsRNA injiziert und anschließend die E-Cadherin-Lokalisation während der Zellularisierung in lebenden Embryonen verfolgt (Abb.4.17). *slam* RNAi hat auf die E-Cadherin-Lokalisation nur einen indirekten Effekt, da die Morphologie des Furchungskanals im Vergleich zum Wildtyp verändert ist. E-Cadherin lokalisiert aber weiterhin an der invaginierenden Membran. (Abb.4.17.B) Die Zellularisierung ist durch *slam* RNAi zwar gestört und es kann dosisabhängig zu einem letalen Phänotyp kommen. Grundsätzlich jedoch findet eine Invagination statt, wie an der Ausbildung einzelner definierter Furchungskanäle erkennbar ist.

nullo RNAi alleine hat keinen Effekt auf die Ausbildung des Furchungskanals zu Beginn der Zellularisierung. E-Cadherin lokalisiert wildtypisch am Furchungskanal. Im weiteren Verlauf der Zellularisierung brechen jedoch wie für Nullo-Mutanten beschrieben einzelne Zellgrenzen auf und die E-Cadherin-Lokalisation geht verloren (Abb.4.17C).

Im Gegensatz zu den moderaten indirekten Effekten von *slam* oder *nullo* RNAi hat die gleichzeitige Injektion von *slam* und *nullo* dsRNA drastische Folgen für die E-Cadherin-Lokalisation. Die Lokalisation geht bereits kurz nach Beginn der Zellularisation an alten und neuen Membranfronten vollständig verloren (Abb.4.17D). Dieser synergistische Effekt ist neben der Unabhängigkeit der Nullo-Lokalisation von

Slam ein weiter starker Hinweis auf die Beteiligung von Nullo und Slam an unterschiedlichen parallel ablaufenden Regulationsprozessen der Zellularisierung.

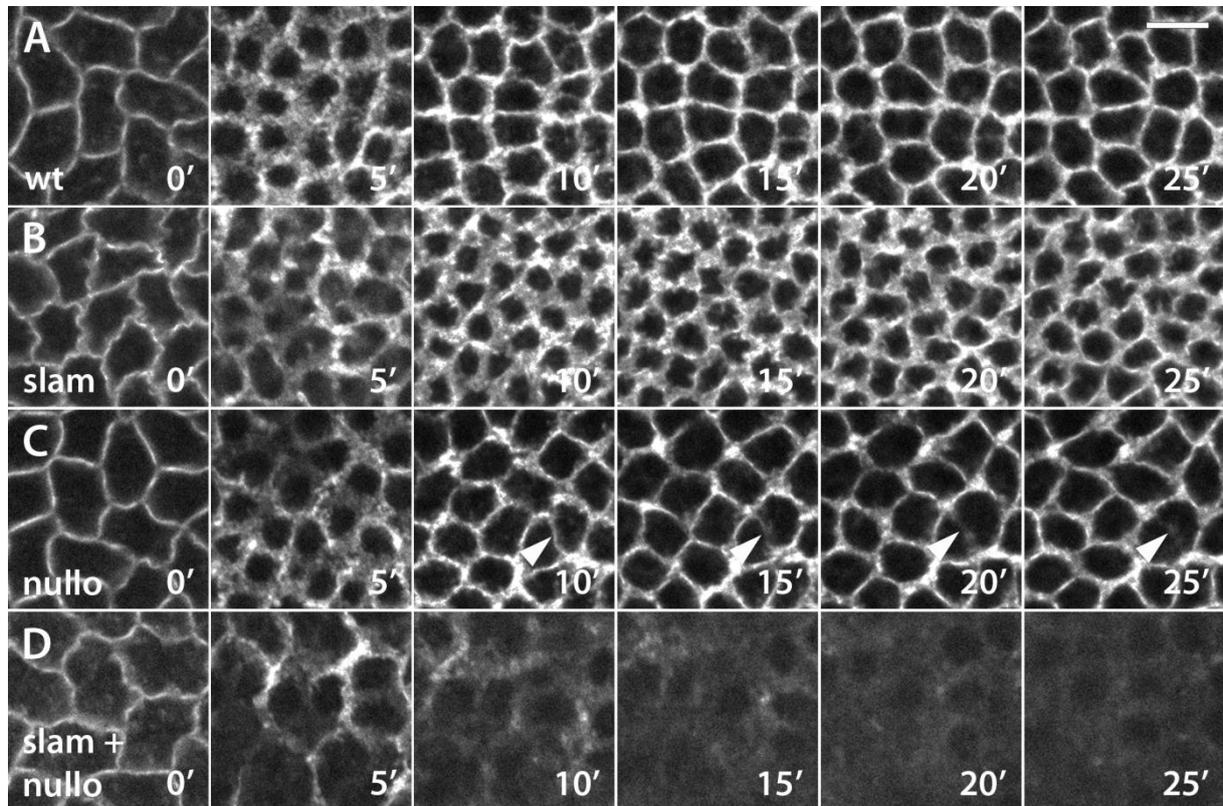


Abb. 4.17:

Lokalisationsdynamik von E-Cadherin-GFP in Abhängigkeit von Slam und Nullo

A-D. Bilderserien aus Timelapse-Aufnahmen von *ma67*/E-Cadherin-GFP Embryonen zu Beginn der Zellularisierung. A: definierte wildtypische Lokalisation von E-Cadherin-GFP am Furchungskanal B: Lokalisation von E-Cadherin-GFP am Furchungskanal nach Injektion von *slam* dsRNA. C: Lokalisation von E-Cadherin-GFP am Furchungskanal nach Injektion von *nullo* dsRNA. Einzelne Zellgrenzen brechen nach initial gelungener Bildung wieder auf D: keine Lokalisation von E-Cadherin-GFP am der Membranfront nach Injektion von *slam* dsRNA und *nullo* dsRNA. Die weißen Pfeilspitzen zeigen eine sich zunächst bildende und dann aufbrechende Zellgrenze. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 10 μm .

4.2.5 Abhängigkeit der RhoGEF2-Lokalisation von Slam

RhoGEF2 lokalisiert in der Zellularisierung am Furchungskanal und ist für die Rho-abhängige Aktivierung von Dia notwendig. (Großhans *et al.*, 2005). Die Lokalisation von RhoGEF2 wird durch eine PDZ-Domäne vermittelt (Diss. C.Wenzl, 2008). Embryonen, die mittels *matGal4/UASp* eine RhoGEF2-Fluoreszenzfusion exprimieren, zeigen oft starke Zellularisierungsphänotypen. Die Lokalisation kann jedoch auch durch Expression von *4xPDZ_{RG2}-RFP* analysiert werden.

Um die Abhängigkeit der RhoGEF2-Lokalisation von Slam zu analysieren wurden *mat67/4xPDZ_{RG2}-RFP*-Embryonen vor der Zellularisation mit *slam* dsRNA injiziert und anschließend die Lokalisation verfolgt (Abb.4.18).

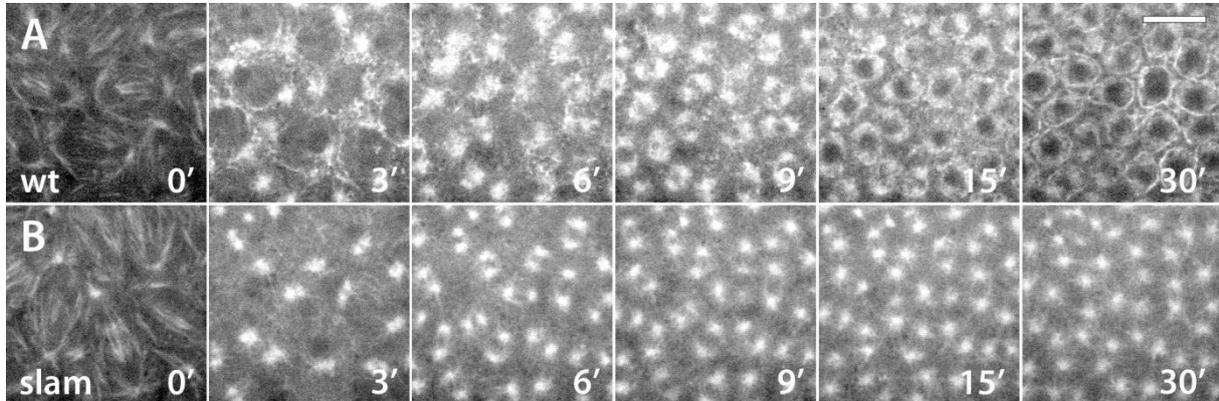


Abb. 4.18:

Lokalisation von 4xPDZ_{RG2}-RFP während der Zellularisierung in Abhängigkeit von Slam

A-B: Bilderserien aus Timelapse-Aufnahmen 4xPDZ_{RG2}-RFP exprimierender Embryonen ohne (A) und mit (B) Injektion von *slam* dsRNA zu Beginn der Zellularisierung. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 10 μm.

4xPDZ_{RG2}-RFP lokalisiert vor der Zellularisierung perizentrosomal sowie in Mitose 13 auch an mitotischen Spindeln. Mit Beginn der Membraninvagination in der Zellularisierung kommt es zu einer Translokation von den Zentrosomen hin zum Furchungskanal. Die Lokalisationsdynamik legt einen mikrotubuliabhängigen Transport zum Furchungskanal nahe.

In Abwesenheit von Slam unterbleibt diese Translokation und das RhoGEF2 repräsentierende 4xPDZ_{RG2}-RFP lokalisiert während der gesamten Zellularisierung an Zentrosomen. Die Lokalisation von RhoGEF2 am Furchungskanal ist somit abhängig von Slam. Die weitere Analyse der hier gezeigten Slam-abhängigen RhoGEF2-Lokalisation zeigte, dass Slam RhoGEF2 über direkte Interaktion mit dessen PDZ-Domäne an den Furchungskanal rekrutiert (Wenzl *et al.*, 2010).

4.2.6 Zellularisierung in Embryonen mit zusätzlichen Zentrosomen

Zentrosomen sind das Mikrotubuli-organisierende Zentrum in den Zellen höherer Eukaryoten (*microtubule-organizing center*, MTOC) und ein vielversprechender Kandidat für die Definition der Invaginationsstellen in der Zellularisierung im Bereich überlappender astraler Mikrotubuli. Die Lokalisation von 4xPDZ_{RG2}-RFP an Mikrotubuli der Mitosespindel und die Translokation von den Zentrosomen hin zum

sich bildenden Furchungskanal deuten auf eine Rolle der astralen Mikrotubuli beim Transport für die Zellularisierung relevanter Proteine hin. Zerstörung der Mikrotubuli mittels Colcemidinjektion wirkt sich auf die 4xPDZ_{RG2}-RFP-Lokalisation am Furchungskanal aus (Diss. C.Wenzl, 2008)

Um die Rolle der Zentrosomen und von ihnen ausgehenden astralen Mikrotubuli bei der Definition der neuen Zellgrenzen in der Zellularisierung zu analysieren, wurde die Membraninvagination in Embryonen mit zusätzlichen kernlosen Zentrosomen untersucht. Überexpression des zentrosomalen Proteins Sas6 führt zu fehlerhafter Zentrosomenduplikation, bei der zusätzliche Centrosomen ohne korrespondierende Kerne entstehen. Durch matGal4-getriebene Expression von GFP-Sas6 wurde die Bildung zusätzlicher Zentrosomen induziert. Die Slam-Lokalisation in mat67/GFP-Sas6-Embryonen zu Beginn und später in der Zellularisierung ist in Abb.4.19 gezeigt.

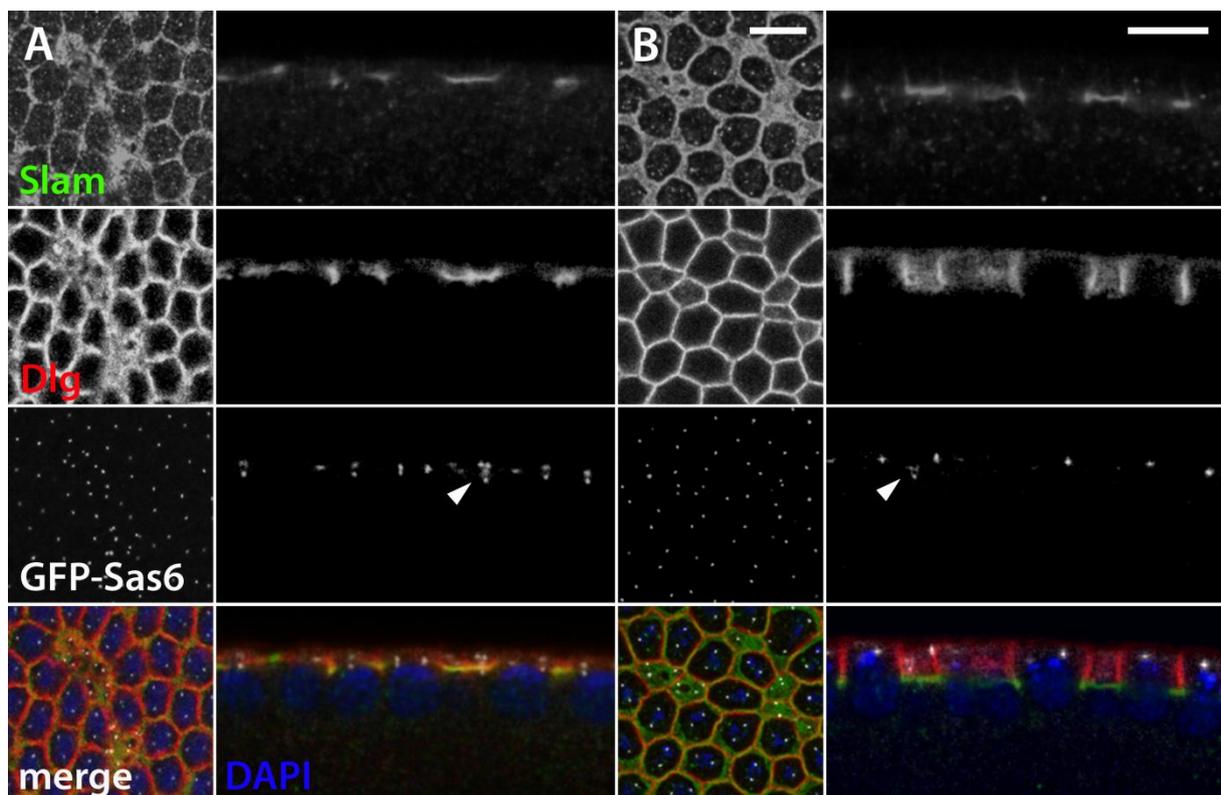


Abb. 4.19:

Lokalisation von Slam in Embryonen mit zusätzlichen Centrosomen

A-B: Färbung von GFP-Sas6-Embryonen mit α -Slam-, α -Dlg- und α -GFP-Antikörpern sowie DAPI zu Beginn der Zellularisierung (A) und später in der Zellularisierung (B) in Aufsicht und Seitenansicht. Die weißen Pfeilspitzen zeigen durch GFP-Sas6-Expression induzierte zusätzliche Centrosomen ohne Kerne. Die weißen Balken entsprechen einer Länge von 10 μ m.

Zusätzliche Zentrosomen induzieren die Bildung ektopischer Invaginationsbereiche sowohl hin zu benachbarten Kernen als auch zwischen freien Zentrosomen. Im Bereich zusätzlicher Zentrosomen kommt es bereits zu Beginn der Zellularisierung zu einer verfrühten *basal closure* direkt unterhalb der kernlosen Zentrosomen. Es entsteht eine durchgehende Membranfront, die weiterhin parallel zu den benachbarten Furchungskanälen invaginiert. In der Membranfront sind in Aufsicht bereits zu Beginn der Invagination sowie auch später kleine zentrale Öffnungen erkennbar, welche wahrscheinlich durch Verdrängung der Membran durch die von den Zentrosomen ausgehenden und normalerweise den Zellkern umspannenden Mikrotubuli entstehen.

Slam lokalisiert an diesen flächigen Invaginationsfronten ohne Furchungskanalmorphologie. Zu Beginn der Invagination lokalisiert auch Dlg flächig an der basalen Membran. Nach Ausbildung lateraler Membrangrenzen zeigt es seine normale Lokalisation im lateralen Bereich oberhalb der Invaginationsfront. Die *basal closure* ist normalerweise ein regulierter Prozess, der z.B. durch Mutationen des Gens *bottleneck (bnk)* verfrüht eintritt. In Wildtyp-Embryonen erfolgt die basale Membranfusion nicht direkt unterhalb der Kerne. Somit ist anzunehmen dass nicht alleine das Fehlen von Kernen die verfrühte Membranfusion auslöst.

4.2.7 Lokalisation von Slam in Abhängigkeit von Glued und Dynamitin

Die Abhängigkeit der Slam-Lokalisation und der Slam-abhängigen Invagination des Furchungskanals von Motorprotein-basierten Minusend-Transportvorgängen an Mikrotubuli, wurde in mutanten Hintergründen untersucht, die . Sowohl das Gl^1 -Allel des an Dynein bindenden Proteins Glued als auch die Überexpression von Dynamitin (Dmn), einem Protein des Dynactin-Komplexes zeigen Auswirkungen auf Mikrotubuli-abhängigen Minusend-Transport. Gl^1 -Embryonen und DmnOE-Embryonen wurden bezüglich Slam-Lokalisation, Invagination und Furchungskanalmorphologie hin analysiert (Abb.4.20).

Es konnten keine Effekte eines fehlerhaften Mikrotubuli-basierten Transports auf die Lokalisation von Slam festgestellt werden. Sowohl die Slam-Lokalisation zu Beginn der Zellularisierung am Furchungskanal und in basalen Partikeln als auch am Ende von Zyklus 14 zum Zeitpunkt der *basal closure* ist wildtypisch. Auch die laterale Dlg-Lokalisation sowie die Furchungskanalmorphologie und die Länge der gebildeten Zellen sind unverändert.

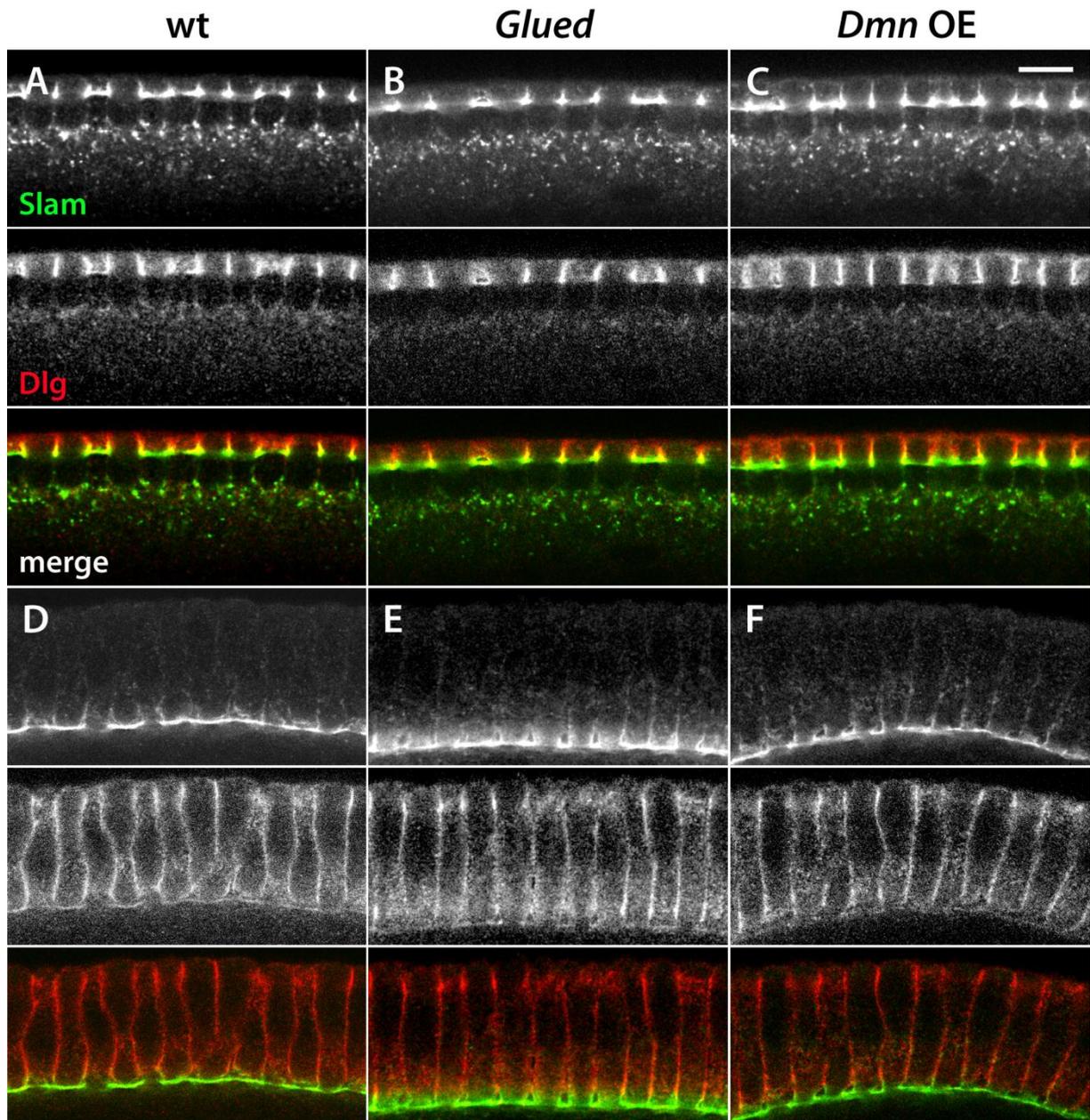


Abb 4.20:

Lokalisationsdynamik von Slam in Abhängigkeit von *Glued* und Dynamitin

A-C: Färbung mit α -Slam- und α -Dlg-Antikörpern zu Beginn der Zellularisierung (A, B, C) und später in der Zellularisierung (D, E, F) in wt-Embryonen (A, D), in *Glued*-Mutanten (B, E) und in Embryonen mit Dynamitin-Überexpression (C, F). Der weiße Balken entspricht einer Länge von 10 μ m.

4.2.8 Abhängigkeit der Slam-Lokalisation von Rab11

Vesikulärer Transport apikaler Membran zu den lateralen Bereichen durch das Rab11 enthaltende *recycling endosome* spielt eine wichtige Rolle in der Zellularisierung (Pellisier et al., 2003). Desweiteren wirken sich Mutationen des Rab11-Effektors Nuclear fallout (Nuf) auf die Lokalisation von RhoGEF2 aus (Cao et al., 2008), was eine Analyse des Effekts von Rab11-Mutanten auf die Slam-Lokalisation am Furchungskanal nahelegt.

In transheterozygoten Rab11-Mutanten wurde der Effekt auf die Membraninvagination und die Slam-Lokalisation am Furchungskanal zu Beginn der Zellularisierung untersucht (Abb. 4.21). Das Ausmaß des beschriebenen Zellularisierungsdefekts in den Rab11-Mutanten ist variabel. Verglichen mit Wildtypembryonen gleicher Kernlänge ist die Invagination reduziert. Darüber hinaus zeigt sich eine deutliche Reduktion der Slam-Lokalisation sowohl am Furchungskanal als auch in den basalen Partikeln. Diese Beobachtungen und im besonderen Maße der Effekt auf die basalen Partikel weisen auf einen möglichen vesikulären Transport von Slam hin.

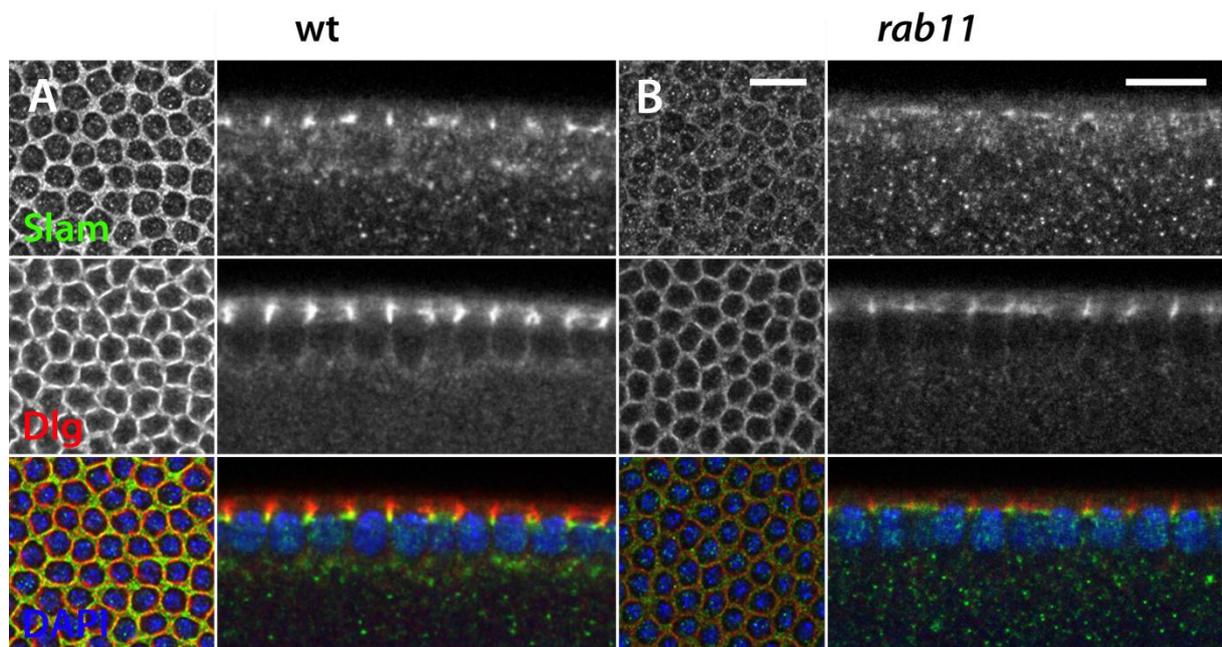


Abb. 4.X:

Abhängigkeit der Slam-Lokalisation von Rab11 in der Zellularisierung

A-B: Färbung von wt-Embryonen (A) und transheterozygoten Rab11-Mutanten (B) mit α -Slam- und α -Dlg-Antikörpern sowie DAPI zu Beginn der Zellularisierung in Aufsicht und Seitenansicht. Die weißen Balken entsprechen einer Länge von 10 μ m.

4.2.9 Lokalisation von Slam und endosomalen Markern in der Zellularisierung

Da die Lokalisation von Slam am Furchungskanal und in basalen Partikeln in Rab11-Mutanten betroffen ist, wurde eine mögliche Kolokalisation mit endosomalen Markern analysiert. Rab5 ist als Marker des *early endosomes* beschrieben und Rab5-Mutanten zeigen Zellularisierungsdefekte (Pellisier et al., 2003) Nuf ist wie Rab11 ein Marker des *recycling endosomes*.

Abb.4.22 zeigt Wildtypembryonen während der Zellularisierung, in denen Slam und Rab5 bzw. Slam und Nuf detektiert wurden. Eine Kolokalisation von Slam mit Rab5 oder Nuf konnte nicht festgestellt werden. Der Effekt von Rab11-Mutanten auf die Slam-Lokalisation scheint somit nicht direkt auf vesikulären Transport von Slam zurückzuführen zu sein.

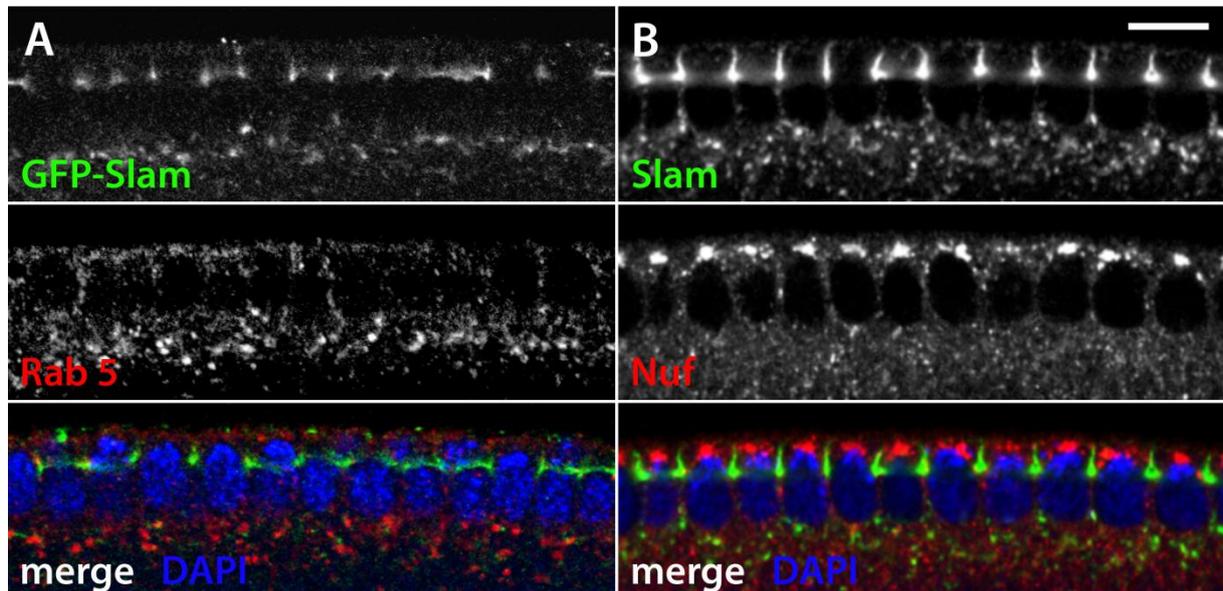


Abb 4.22:

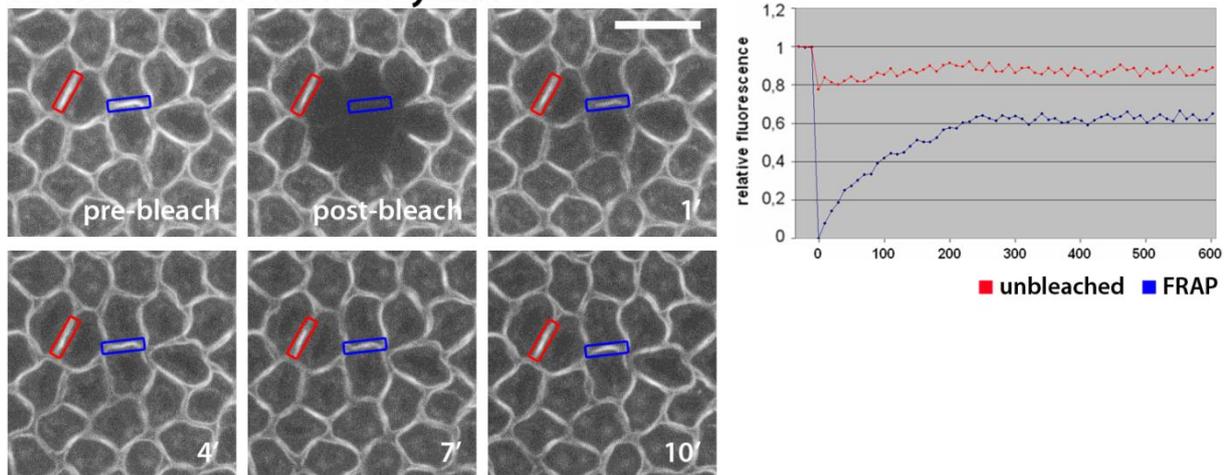
Lokalisation von Slam und endosomalen Markern während der Zellularisierung

A: Färbung von wt-Embryonen mit α -Slam- und α -Rab5-Antikörpern sowie DAPI während der Zellularisierung. B: Färbung von wt-Embryonen mit α -Slam- und α -Nuf-Antikörpern sowie DAPI während der Zellularisierung. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 10 μ m.

4.2.10 FRAP-Analyse der Lokalisationsdynamik von Slam

Wie bereits in Abb. 4.15 gezeigt, weist Slam zu Beginn der Zellularisierung eine hohe Mobilität am Furchungskanal auf und die Membran zeigt eine große Dynamik. Mittels FRAP-Experimenten wurde die Lokalisationsdynamik von Slam und anderen Membranmarkern während der Zellularisierung eingehender analysiert. Zunächst wurde das Lokalisationsverhalten von Amphiphysin und RhoGEF2 in mat67/Amph-YFP-Embryonen bzw. mat67/4xPDZ_{RG2}-RFP-Embryonen betrachtet (Abb.4.23).

A FRAP 4xPDZ-RFP in Zyklus 14



B FRAP Amph-YFP in Zyklus 14

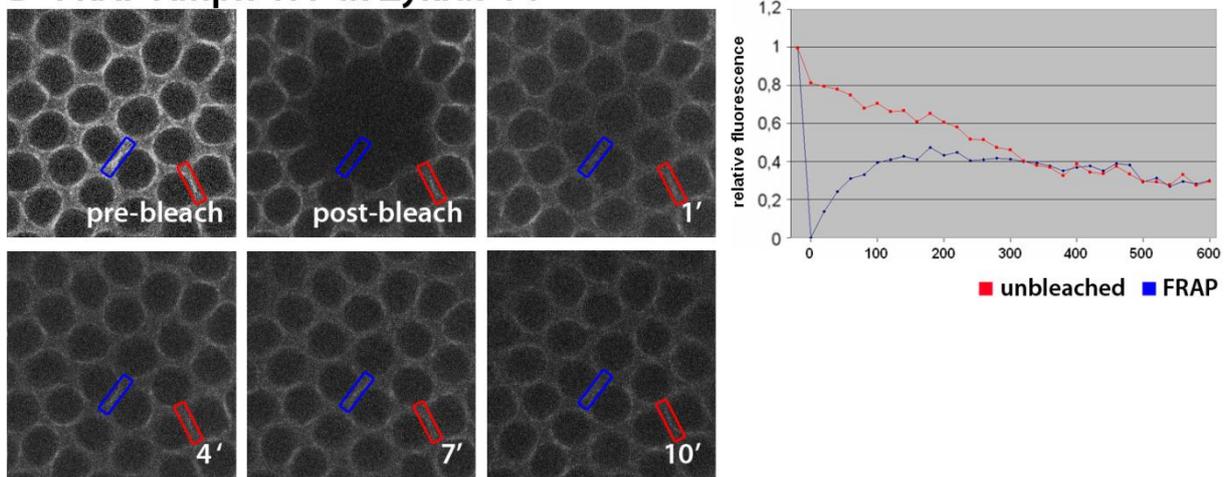


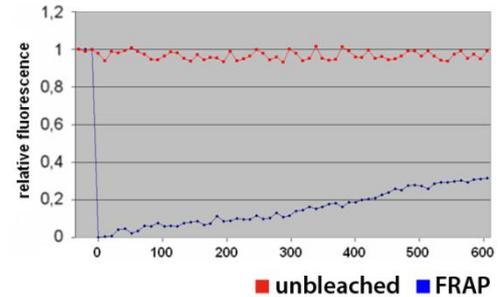
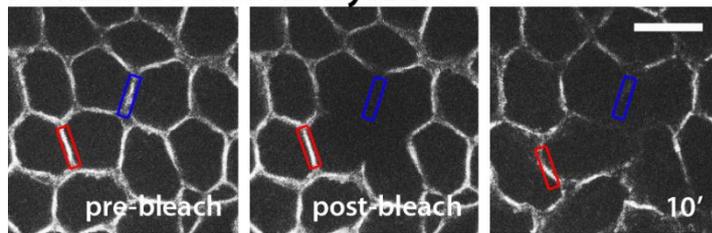
Abb. 4.23:

FRAP-Analyse der Lokalisationsdynamik von 4xPDZ_{RG2}-RFP und Amph-YFP am Furchungskanal während der Zellularisierung

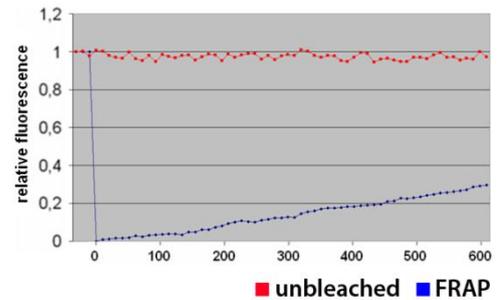
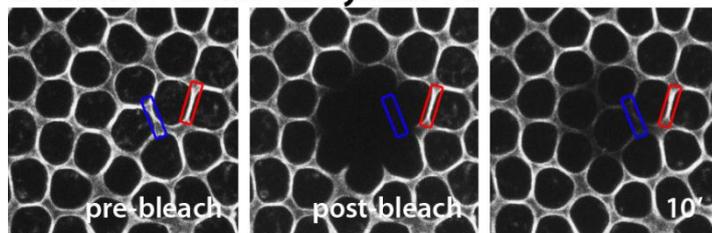
A-B: Bilderserien aus Timelapse-Aufnahmen von FRAP-Experimenten in 4xPDZ_{RG2}-RFP-Embryonen (A) und Amph-YFP-Embryonen (B). Die markierten Messbereiche zeigen die FRAP-Bereiche (blaue Rechtecke) sowie die Kontrollbereiche zur Normierung der FRAP-Intensitäten (rote Rechtecke). Die Zeitachse der graphischen Darstellung der FRAP-Messung ist in Sekunden eingeteilt. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 10 μm .

Sowohl Amph-YFP als auch 4xPDZ_{RG2}-RFP zeigen während der Zellularisierung ein dynamisches Austauschverhalten am Furchungskanal und die Fluoreszenzintensitäten der gebleichten Bereiche erreichen innerhalb von 5 Minuten wieder Werte wie sie an den ungebleichten Kontrollbereiche gemessenen wurden. Anschließend wurde die Dynamik von Slam in mat67/GFP-Slam-Embryonen an Pseudocleavagefurchen in Zyklus 13 und am Furchungskanal in Zyklus 14 sowie zu Beginn der Zellularisierung analysiert (Abb.4.24).

A Slam Protein in Zyklus 13



B Slam Protein in Zyklus 14



C Slam Protein Beginn Zyklus 14

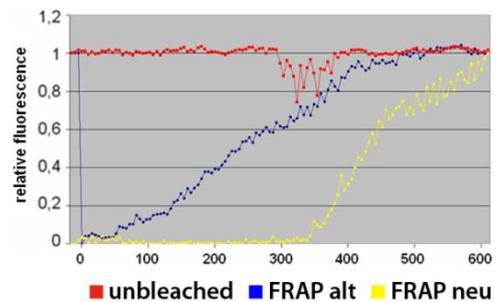
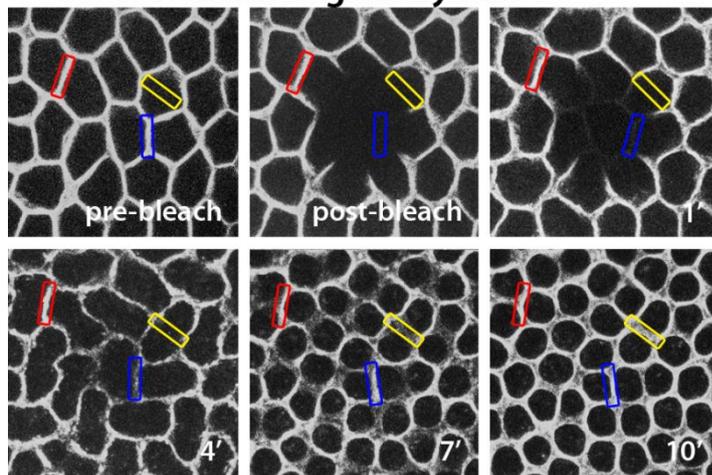


Abb. 4.24:

FRAP-Analyse der Lokalisationsdynamik am Furchungskanal von GFP-Slam in Zyklus 13 und während der Zellularisierung

A-C: Bilderserien aus Timelapse-Aufnahmen von FRAP-Experimenten in *mat67*/GFP-Slam-Embryonen in Zyklus 13 (A), in Zyklus 14 (B) und zu Beginn der Zellularisierung (C). Die markierten Messbereiche zeigen die ungebleichten Referenzbereiche zur Normierung der FRAP-Intensitäten (rote Rechtecke) sowie die FRAP-Messungen an alten Zellgrenzen (blaue Rechtecke) und während der Zellularisierung neu gebildeten Invaginationsbereichen (gelbe Rechtecke). Die Zeitachse der graphischen Darstellung der FRAP-Messung ist in Sekunden eingeteilt. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 10 μm .

Im Gegensatz zu Amphiphysin und RhoGEF2 zeigt Slam in Zyklus 13 und 14 eine feste Membranbindung mit geringen Austauschraten und nur langsamer unvollständiger Erholung der Fluoreszenzintensität. Zu Beginn der Zellularisierung hingegen ist die Lokalisation von Slam sehr dynamisch und es kommt zu einem

schnellen vollständigen Austausch des gebleichten Proteins an alten Grenzen sowie zu einer schnellen Lokalisation an neuen Grenzen. Auch im ungebleichten Kontrollbereich, der ansonsten eine gleichbleibend hohe Fluoreszenzintensität zeigt, ist zu diesem Zeitpunkt eine erhöhte Dynamik erkennbar. Die Lokalisation von Slam an den neuen Invaginationsbereichen erfolgt etwas später und mit höherer Dynamik als an den alten Grenzen.

Die Lokalisation von Slam am Furchungskanal erfolgt somit vollständig in einem kurzen Zeitfenster von wenigen Minuten zu Beginn der Zellularisierung. Anschließend findet nur ein geringer Austausch statt. Dieses Verhalten ist spezifisch für Slam. Die anderen untersuchten Marker sind während der Zellularisierung weit weniger fest an die Membran gebunden.

4.3 Lokalisation der *slam* mRNA

4.3.1 Kolokalisation von *slam* mRNA und Protein

Detektion der *slam* mRNA per Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH, s. 3.1.9) zeigt, dass mRNA und Protein sowohl in den basalen Partikeln als auch am Furchungskanal kolokalisieren (Abb.4.25, Wenzl *et al.*, 2010).

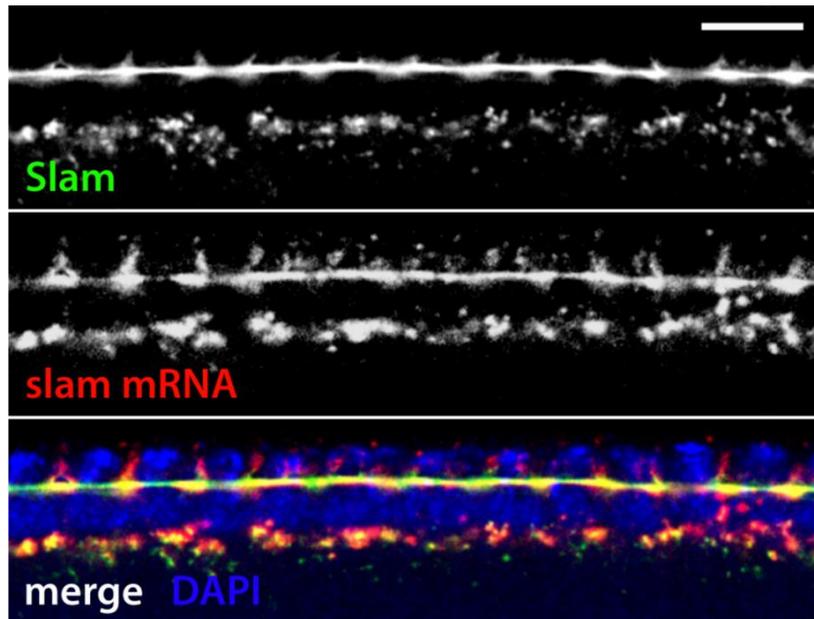


Abb. 4.25:

Kolokalisation von *slam* mRNA und Slam am Furchungskanal und in basalen Partikeln

Färbung eines wt-Embryos in der Zellularisierung mit α -Slam-Antikörper und DAPI sowie Detektion der *slam* mRNA mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung. mRNA und Protein kolokalisieren am Furchungskanal und in dynamischen Partikeln basal der Kerne. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 10 μ m.

Eine Analyse der mRNA-Dynamik in den basalen Partikeln per *live imaging* lebender Embryonen in der Seitenansicht war aufgrund optischer Probleme nicht möglich. In der Aufsicht konnte jedoch das dynamische Verhalten der *slam* mRNA untersucht werden. Abb.4.26 zeigt *mat67/GFP-slam* Embryonen, die vor Beginn der Zellularisierung mit fluoreszenz-markierter *slam* mRNA injiziert wurden (s. 3.3.2). Protein und mRNA zeigen eine Kolokalisation in dynamischen Partikeln unterschiedlicher Größe basal des Furchungskanals.

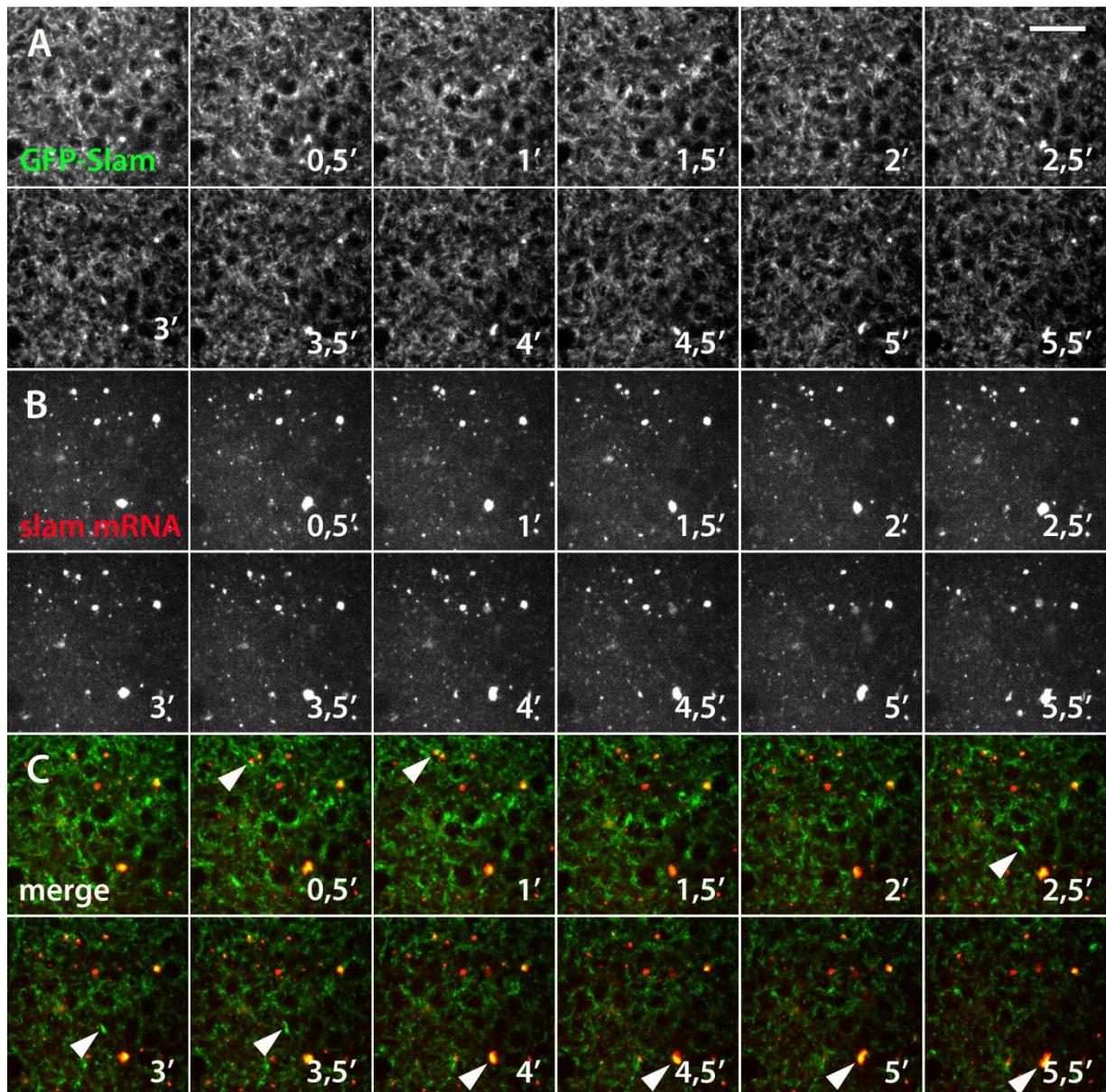


Abb. 4.26:

Kokalisation von GFP-Slam und injizierter *slam* mRNA in der Zellularisierung

A-C: Bilderserie aus Timelapse-Aufnahmen eines GFP-Slam Embryos zu Beginn der Zellularisierung. GFP-Slam (A) und injizierte fluoreszenzmarkierte *slam* mRNA (B) zeigen eine partielle Kokalisation (C) in dynamischen Partikeln unterschiedlicher Größe basal des Furchungskanals. Weiße Pfeilspitzen zeigen dynamische Partikel von GFP-Slam und/oder *slam* mRNA. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 10 μm .

4.3.2 live imaging endogener *slam* mRNA mittels MS2-Konstrukt

Mittels des genomischen *slam*-Konstrukts, das sechs MCP-Bindestellen im 3'UTR trägt (*slam* MS2-BSx6), konnte die Lokalisationsdynamik endogener *slam* mRNA am Furchungskanal untersucht werden. In Abb.4.27 ist ein *slam* MS2-BSx6 Embryo zu Beginn der Zellularisierung gezeigt, der außerdem *matGal4*-induziert MCP-GFP exprimiert.

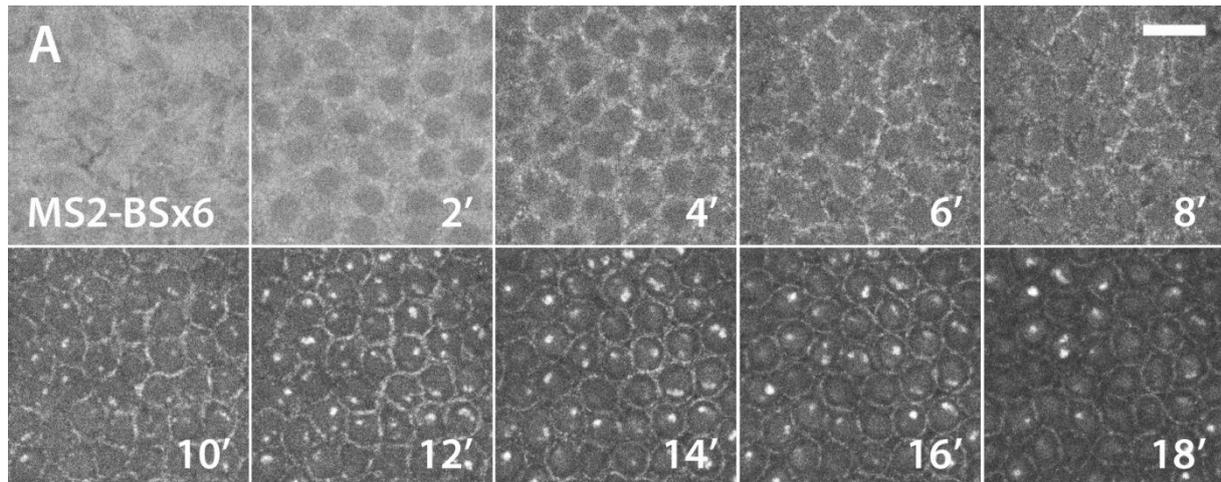


Abb. 4.27:

Lokalisation endogener *slam* mRNA am Furchungskanal zu Beginn der Zellularisierung

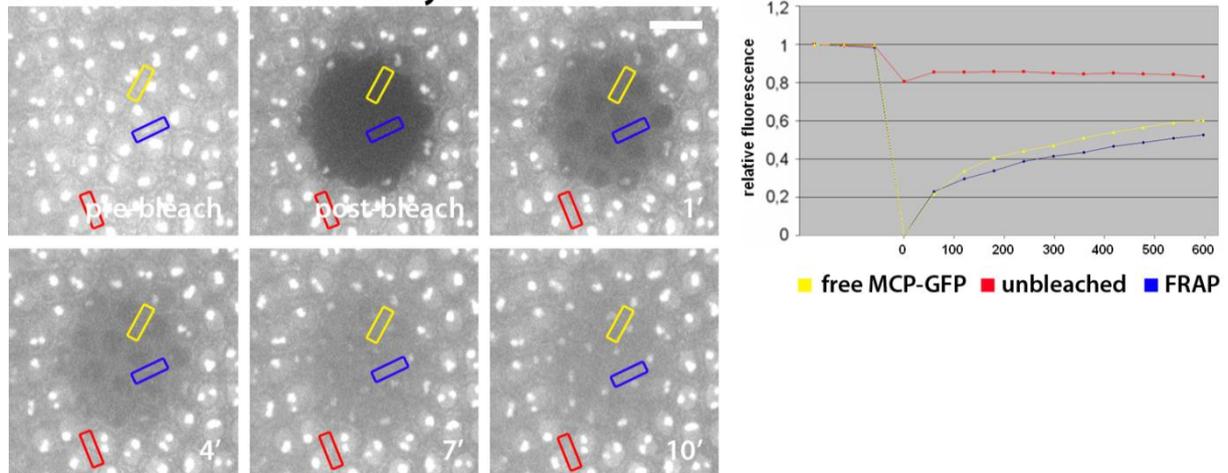
A: Bilderserie aus Timelapse-Aufnahmen eines *slam*-MS2-BSx6 und MCP-GFP exprimierenden Embryos zu Beginn der Zellularisierung. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 10 μ m.

Das freie MCP-GFP lokalisiert in Mitose 13 zunächst an mitotischen Spindeln. Mit Beginn der zygotischen *slam* mRNA Expression in Zyklus 14 wird eine zunehmende mRNA-Lokalisation am sich bildenden Furchungskanal erkennbar. Die mRNA-Lokalisation ist zunächst inhomogen und diffus. Mit fortschreitender Invagination wird die Lokalisation homogener und erstreckt sich über den gesamten Furchungskanal. Dies korreliert mit dem Verhalten des Proteins (s. Abb.4.15). Neben der Lokalisation an der Invaginationsfront sind auch zwei starke Kernsignale erkennbar. Hierbei handelt es sich wohl um das Primärtranskript, welches durch Interaktion mit dem mit einer Kernlokalisationssequenz (*nuclear localization sequence*, NLS) versehenen MCP-GFP sichtbar wird.

4.3.3 FRAP-Analyse der Lokalisationsdynamik von *slam* mRNA

Analog zur FRAP-Analyse des Proteins wurde auch die Lokalisation und Mobilität der endogenen *slam* mRNA untersucht (Abb.4.28).

A FRAP *slam* mRNA in Zyklus 14



B *slam* mRNA Beginn Zyklus 14

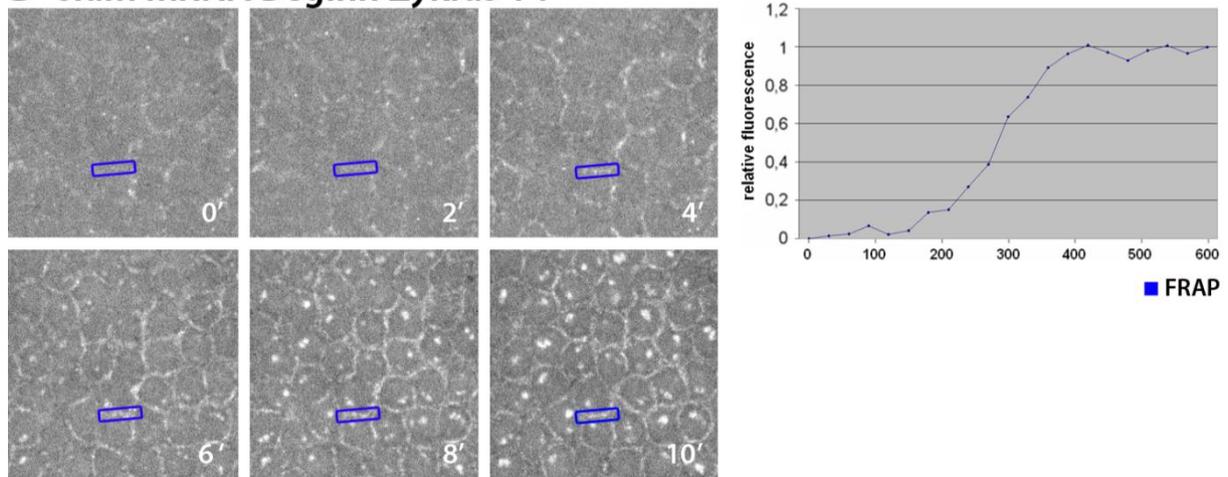


Abb. 4.28:

FRAP-Analyse der Lokalisationsdynamik der *slam* mRNA während der Zellularisierung

A: Bilderserie aus Timelapse-Aufnahmen eines FRAP-Experiments in einem *slam*-MS2-BSx6 und MCP-GFP exprimierenden Embryo während der Zellularisierung, und zu Beginn der Zellularisierung. Die markierten Messbereiche zeigen ungebleichte Furchungskanäle (rote Rechtecke) sowie die FRAP-Messungen eines gebleichten Furchungskanals (blaue Rechtecke) und ungebundenen MCP-GFPs (gelbe Rechtecke). Die Zeitachse der graphischen Darstellung der FRAP-Messung ist in Sekunden eingeteilt. B: Bilderserie aus Timelapse-Aufnahmen eines *slam*-MS2-BSx6 und MCP-GFP exprimierenden Embryos zu Beginn der Zellularisierung. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 10 μm .

Wie das Protein zeigt die *slam*-mRNA während der Zellularisierung eine feste Membranbindung mit geringen Austauschraten und langsamer unvollständiger Erholung der Fluoreszenzintensität. Die Austauschrate liegt unterhalb der ungebundenen MCP-GFPs (Abb. 4.28A). Die Lokalisation der endogenen *slam* mRNA am Anfang der Zellularisierung ist im Gegensatz dazu sehr dynamisch und es kommt zu einer schnellen Lokalisation am sich bildenden Furchungskanal. Somit

steht fest, dass sowohl die *slam* mRNA als auch das Protein innerhalb eines wenige Minuten dauernden Zeitfensters zu Beginn der Zellularisierung fest am Furchungskanal binden.

4.4 molekulare Interaktionen von Slam

4.4.1 HYBRIGENICS ULTimate Yeast-Two-Hybrid-Screen

Durch die Firma Hybrigenics wurde ein Yeast-Two-Hybrid-Screen (YTH) mit Vollängen-Slam durchgeführt um potentielle Interaktoren zu identifizieren. Tab. 4.1 zeigt die gefundenen Interaktionen. Es konnte eine Interaktion mit Spire und Actinin gefunden werden, die beide an der Organisation des Aktinzytoskeletts beteiligt sind. Ein weiterer Interaktionspartner war das unkonventionelle nichtmuskuläre Myosin10A, das ebenfalls einen Zytoskelettbestandteil darstellt. Ein FH2- und FH3-Domänen tragendes Formin (FMN, CG32138) bindet ebenfalls an Slam. Außerdem wurde eine Interaktion mit Slam selbst sowie den PDZ-Domänen tragenden Proteinen Patj und RhoGAP19D festgestellt.

Tab. 4.1:

Im HYBRIGENICS ULTimate Yeast-Two-Hybrid-Screen gefundene Interaktionspartner von Slam

Interaktionsklassen: A: sehr hohe Wahrscheinlichkeit der Interaktion B: hohe Wahrscheinlichkeit der Interaktion C: recht hohe Wahrscheinlichkeit der Interaktion D: moderate Wahrscheinlichkeit der Interaktion (kann falsch positive Interaktionen enthalten, aber auch aufgrund des geringen Vorkommens in der mRNA-Bibliothek schwer detektierbare Interaktionen). In Spalte 3 ist jeweils die Anzahl gefundener Einzelklone angegeben. IK = Interaktionsklasse.

Nr	IK	Gen	Klone	Annotation
1	A	Spire	14	Aktinnukleator, Zytoskelettorganisation
2	B	Actinin	3	Aktinbindung, Zytoskelettorganisation
3	C	Myosin10A	2	unkonventionelles Myosin, Proteintransport
4	D	FMN	2	Aktinbindung, Zytoskelettorganisation
5	D	Slam	1	Zellularisierung, Keimzellmigration
6	D	Patj	1	adherens junction-Organisation, PDZ-Domäne
7	D	RhoGAP19D	1	RhoGTPase-Regulation, PDZ-Domäne
8	D	Pit	1	RNA-Helicase
9	D	Vha 100-1	1	V0/Ao-ATPase, Protonentransport
10	D	qkr 58E-3	1	RNA-Bindung, alternatives mRNA-Splicing
11	D	CG8465	1	Zellmorphogenese
12	D	CG9940	1	NAD ⁺ -Synthase
13	D	CG14423	1	Funktion unbekannt

4.4.2 Interaktion mit Spire

Die Interaktion zwischen Slam und zwei der 14 im Screen identifizierten Spire-Klone wurde anschließend genauer analysiert. Die Negativkontrollen des Interaktionstests mit Slam als bait-Protein zeigte Autoaktivierung, sodass anschließend die Interaktionsanalyse mit Spire als bait-Protein und Slam als prey-Protein fortgeführt wurde. Die WH2-Domäne von Spire interagiert sowohl mit Volllängen-Slam als auch einem N-terminalen Slam-Fragment (Abb. 4.29).

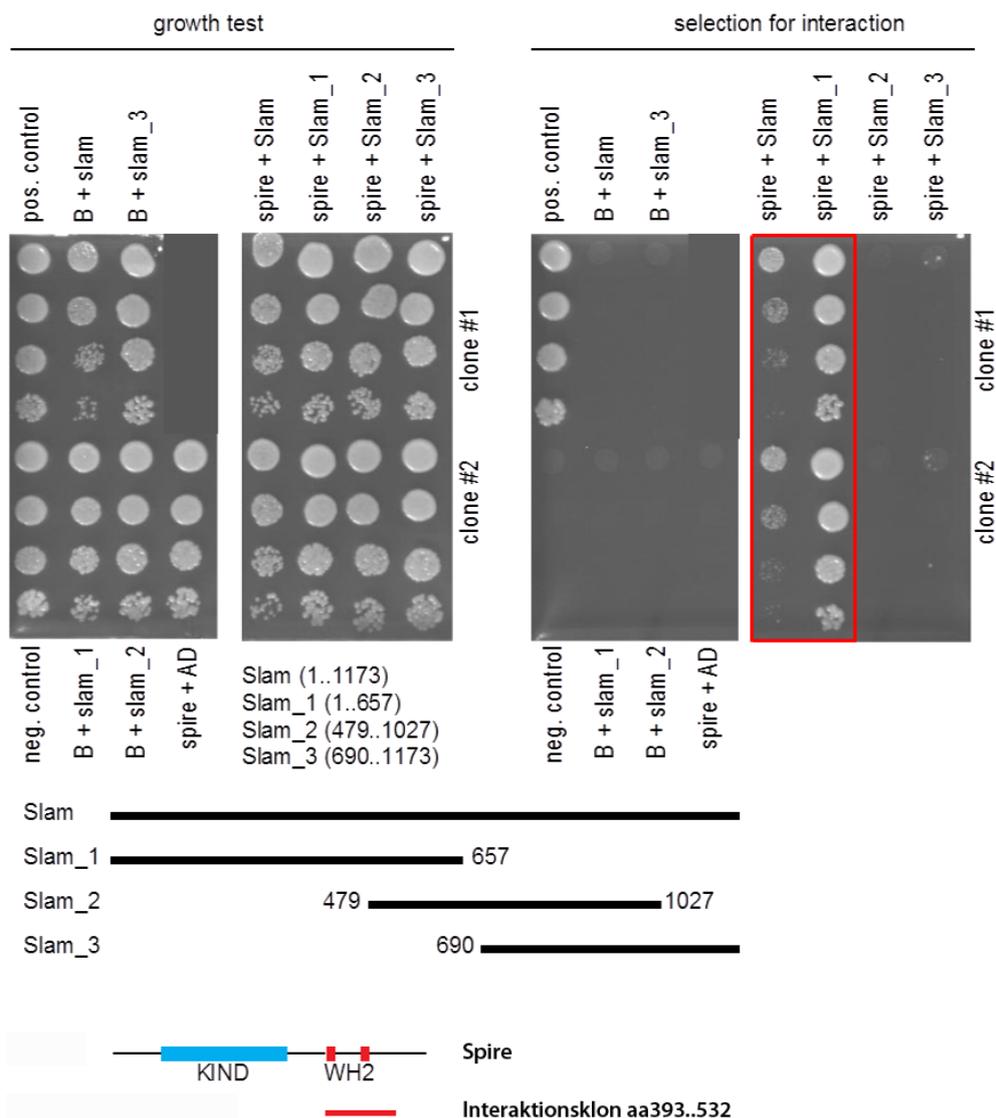


Abb. 4.29

YTH-Interaktion der WH2-Domäne von Spire mit dem N-Terminus von Slam

Die rot umrandeten Klone zeigen die Interaktion der WH2-Domäne von Spire mit Volllängen-Slam und dem N-terminalen Slam-Fragment Slam_1.

4.4.3 Interaktion mit FMN/CG32138

Ebenso wurde die Interaktion von Slam und dem Formin CG32138 genauer untersucht. Die FH2-Domäne des Formins interagiert schwach mit einem C-terminalen Slam-Fragment. Eine Interaktion mit Vollängen-Slam konnte jedoch nicht bestätigt werden (Abb.4.30)

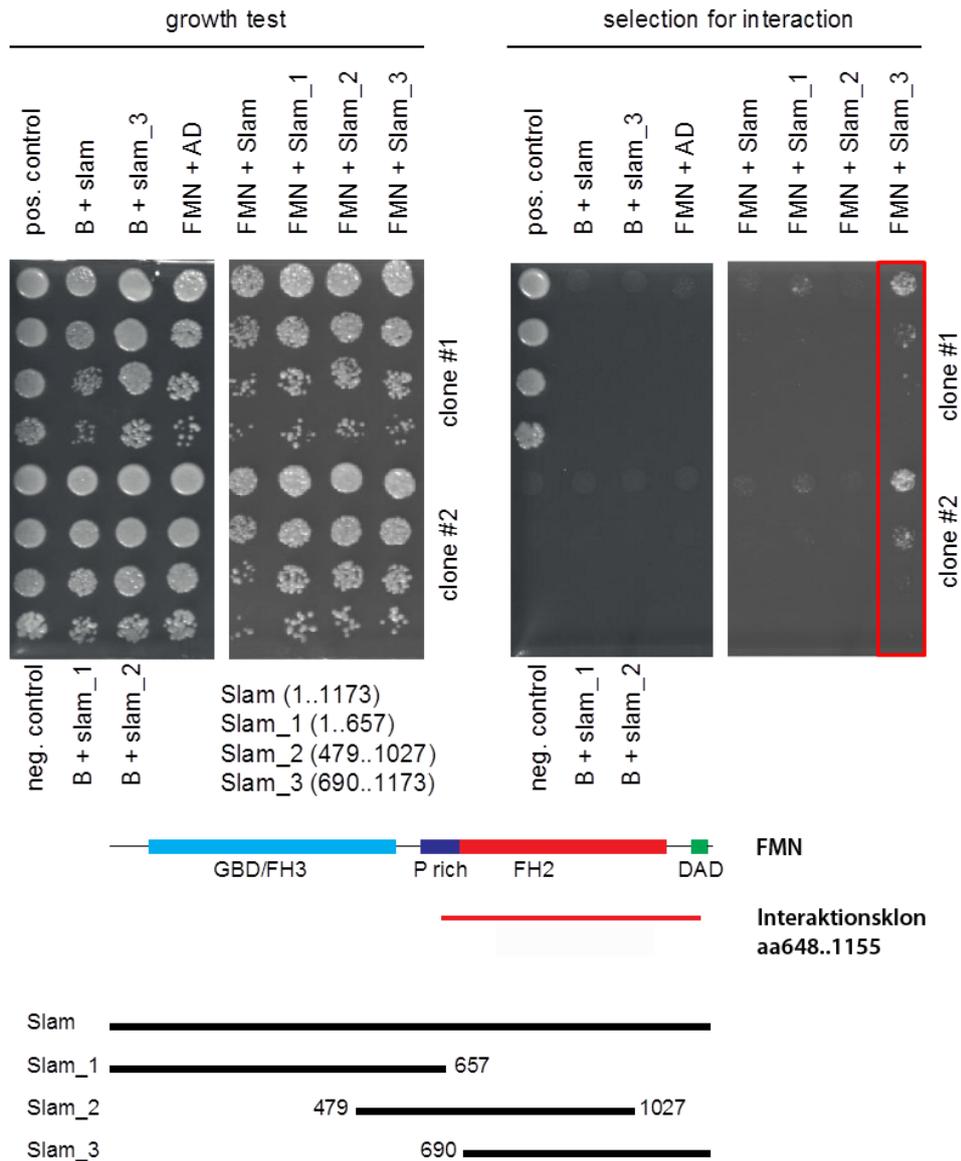


Abb.4.30

YTH-Interaktion der FH2-Domäne von FMN mit dem C-Terminus von Slam

Die rot umrandeten Klone zeigen die Interaktion der FH2-Domäne des Formins und dem C-terminalen Slam-Fragment Slam_3.

4.4.4 Kolokalisation mit Myosin10A

Die im Yeast-Two-Hybrid-Screen gefundene Interaktion von Slam mit Myosin10A wurde *in vivo* genauer untersucht. Abb. 4.31 zeigt matGal4/Myo10A-RFP-Embryonen zu Beginn und später in der Zellularisierung.

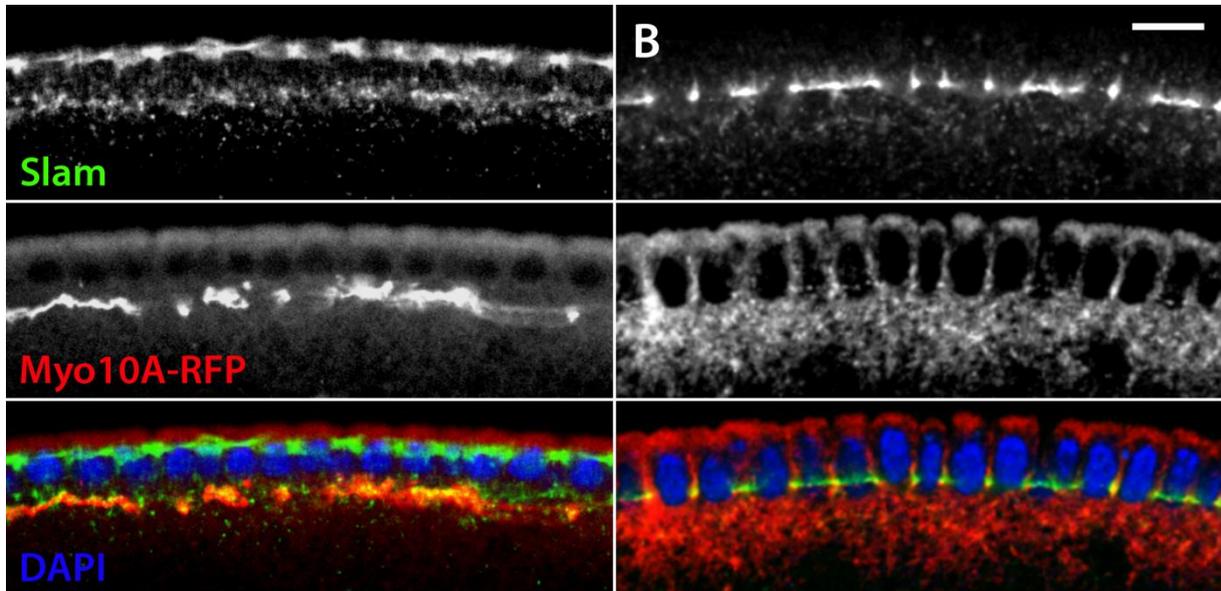


Abb. 4.31:

Kolokalisation von Slam und Myosin10A

A-B: Färbung von Myo10A-RFP Embryonen mit α -Slam-Antikörper und DAPI zu Beginn (A) und später in der Zellularisierung (B). Myo10A-RFP wurde in den fixierten Embryonen direkt ohne Färbung detektiert. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 10 μ m.

Myosin10A und Slam kolokalisieren zu Beginn der Zellularisierung im apikalen Bereich basal des Furchungskanals verlaufender Myosin-10A-Stränge. Diese verschwinden im weiteren Verlauf der Zellularisierung und es kommt zu einer Kolokalisation am Furchungskanal. Slam kolokalisiert somit sowohl mit MyosinII als auch mit Myosin10A am Furchungskanal.

Die von MyosinII abweichende Myosin10A-Lokalisationsdynamik wurde in lebenden Embryonen genauer analysiert (Abb.4.32). Zu Beginn der Zellularisierung (Abb.4.32A) lokalisiert das Protein vornehmlich in einem Netzwerk dicker basaler Stränge (Z8-10) sowie in apikalen Kappen (Z1-3) Im Bereich des Furchungskanals (Z4) ist Myosin10A zu diesem Zeitpunkt nur schwach und diffus sichtbar. Mit fortschreitender Zellularisierung (Abb.4.32B) verschwindet das basale Netzwerk (Z9-10) und die apikalen Kappen verbreitern sich und erstrecken sich weiter basal (Z1-4). Nun ist eine starke Lokalisation im Bereich des Furchungskanals erkennbar (Z5-6).

Unterhalb der Invaginationsfront kann eine Lokalisation in diskreten Punkten beobachtet werden (Z7-8). Im Bereich der apikalen Kappen kolokalisiert Myosin mit Actin, was bei MyosinII nicht der Fall ist.

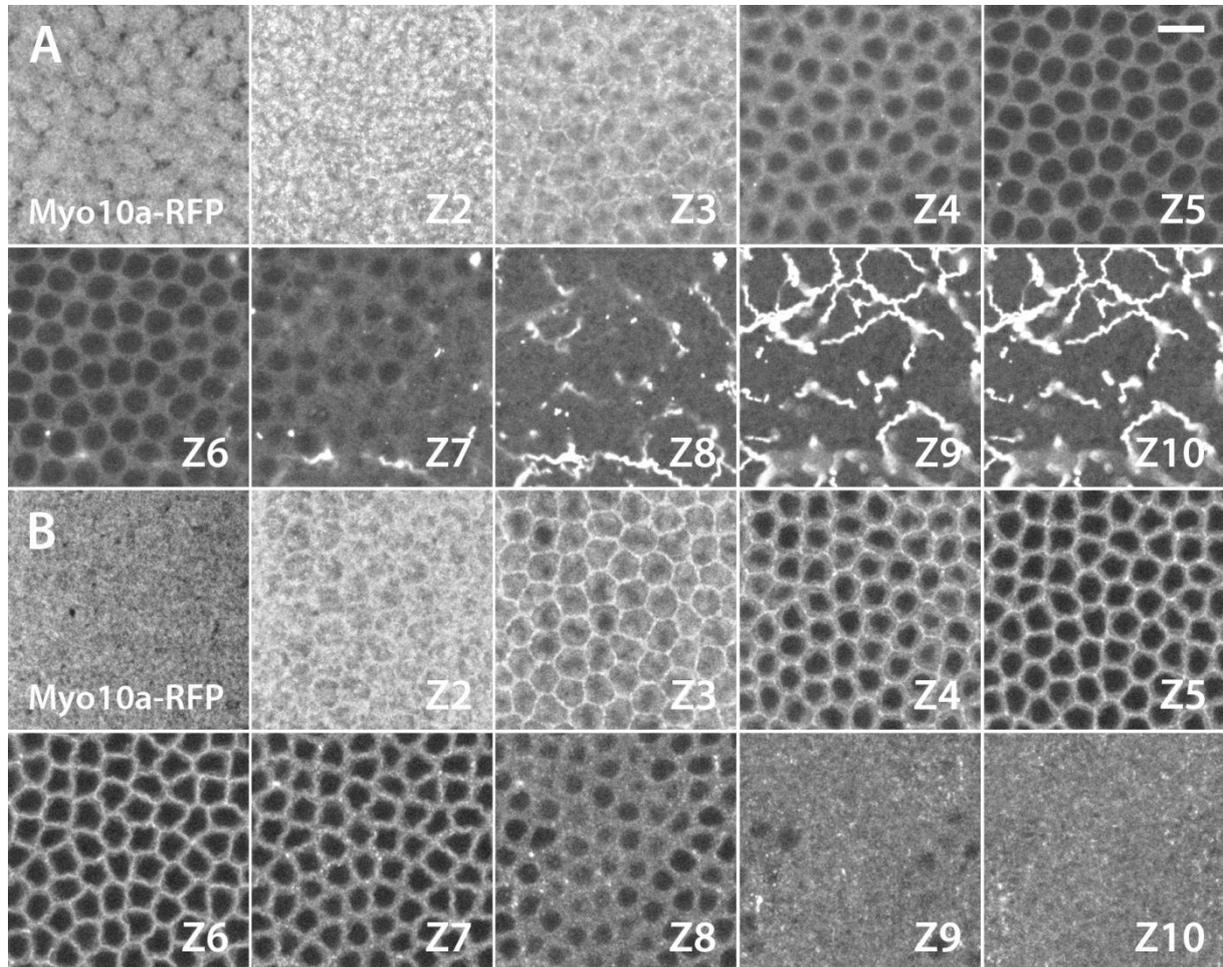


Abb.4.32:

Lokalisationsdynamik von Myosin10A während der Zellularisierung

A-B: Bilderserie aus Timelapse-Aufnahmen eines Myo10A-RFP exprimierenden Embryos zu Beginn (A) und später in der Zellularisierung. Der Abstand der Z-Ebenen beträgt 1 μm und der weiße Balken entspricht 10 μm .

5. Diskussion

5.1 Definition der Invaginationenstellen und Furchungskanalbildung

Die Signale, die die Invaginationenstellen während der Zellularisierung definieren, sind bislang nicht identifiziert. Ebenso ist der genaue Mechanismus der initialen Furchungskanalbildung unklar. Es konnte gezeigt werden, dass freie Zentrosomen ausreichend sind um während der Zellularisierung zusätzliche Membraninvaginationenstellen sowohl hin zu benachbarten Kernen als auch zwischen freien Zentrosomen zu induzieren. Dies könnte durch Mikrotubuli-abhängigen Transport eines Signalgebers in den Bereich überlappender astraler Mikrotubuli erfolgen, der lokal das kortikale F-Aktin-Cytoskelett reguliert und so eine Membraneinstülpung ermöglicht.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist Slam nicht an der Definition der Invaginationenstellen beteiligt. Die initiale Membraneinstülpung im Bereich des späteren Furchungskanals findet in Abwesenheit von Slam statt, wie anhand der Lokalisation der Marker F-Aktin, Nullo und Diaphanous gezeigt werden konnte. Auch ist die Lokalisation von Slam nicht von Mutationen in Komponenten des Mikrotubuli-abhängigen Transports betroffen. Eine Lokalisationsanalyse im Vergleich mit dem Membranmarker E-Cadherin zeigte, dass Slam erst nach Bildung des Furchungskanals an in bindet.

Eine postulierte Rolle bei der Etablierung der planaren Polarität der Membran vor Beginn der Zellularisierung (Lecuit *et al.*, 2002) und der aufgrund dieser Polarität nur apikal stattfindenden Membraninsertion sekretorischer Vesikel kann ausgeschlossen werden, da die initiale Polarität in Abwesenheit von Slam gegeben ist. Slam ist weiterhin wohl nicht Ursache einer fehlerhaften Membraninsertion während der Zellularisierung und dadurch bedingter Invaginationendefekte. Die Lokalisation von Nuf ist in Abwesenheit von Slam nicht betroffen.

An durch freie Zentrosomen induzierten Invaginationenfronten ohne Furchungskanalmorphologie lokalisiert Slam ebenfalls. Eine strukturgebende Funktion von Slam, die zur typischen haarnadelartigen Morphologie des Furchungskanals beiträgt, scheint somit ebenfalls nicht gegeben.

5.2 Slam ist essentiell für die Membraninvagination

Der Ablauf der Zellularisierung in Zyklus 14 lässt sich in mehrere in Phasen einteilen, die sich primär in der Invaginationsgeschwindigkeit unterscheiden. Desweiteren ändert sich auch die Herkunft der für die Invagination und damit verbundenen vielfachen Oberflächenvergrößerung benötigten Membran. Membranwachstum geschieht durch regulierte Mobilisierung von Membranreservoirs des sekretorischen Apparats (Lecuit *et al.*, 2002)

Zu Beginn der anfänglichen *slow phase* kommt es hauptsächlich zu apikaler Membraninsertion. An den initialen Membraneinstülpungen, die den späteren Furchungskanal bilden, findet keine Membraninsertion statt. Die Membran ist also bereits zu diesem Zeitpunkt planar polarisiert. Auch im weiteren Verlauf der *slow phase* bleibt die apikale Insertion erhalten. Es kommt zu keiner Membraninsertion in den wachsenden basolateralen Bereichen der invaginierenden Membran (Lecuit und Wieschaus, 2000). Es entsteht somit eine laterale Membrandomäne mit anderen Insertionseigenschaften als die ursprüngliche apikale Membran.

Die Membraninsertion im apikalen Bereich setzt sich auch in der schnellen Invaginationsphase fort. Es wurde die Bildung einer neuen apikolateralen Insertionsdomäne postuliert (Lecuit und Wieschaus, 2000). Die größte Membranmenge in der *fast phase* stammt jedoch aus den apikalen Mikrovilli-artigen Ausstülpungen der Membran, welche sich in der *fast phase* zurückziehen. Die Verschiebung der anfänglich apikalen Membraninsertion zu einer apikolateralen könnte somit auch durch Verdrängung durch die Membran der Mikrovilli-artigen Ausstülpungen erklärt werden. Die erhöhte Invaginationsgeschwindigkeit käme somit durch parallel verlaufende Membranbereitstellungsprozesse zustande: einer während der gesamten Zellularisierung stattfindenden unveränderten apikalen Insertion aus sekretorischen Vesikeln und der erst in der schnellen Phase einsetzenden Nutzung des apikalen Membranreservoirs der Mikrovilli-artigen Ausstülpungen.

In *slam* RNAi-Experimenten mit MyosinII-GFP als Marker der Invaginationsfront wurde beobachtet, dass die Invagination während der langsamen Phase unterbleibt und erst in der schnellen Phase mit gegenüber dem Wildtyp verringerter Geschwindigkeit stattfindet. Es wurde postuliert, dass Slam spezifisch auf die anfängliche langsame Phase der Membraninvagination einwirkt, indem es das polarisierte Membranwachstum durch Inhibition lateraler Insertion reguliert. Gestützt

wurden die Erkenntnisse durch eine beobachtete Lokalisation von Slam-HA am Furchungskanal und der lateralen Membranmembrandomäne. (Lecuit *et al.*, 2002). Spezifische Antikörper gegen Slam zeigen jedoch eine exklusive Lokalisation am Furchungskanal und nicht an lateralen Bereichen wie der basalen Junktion (Stein *et al.*, 2002, Wenzl *et al.*, 2010). Desweiteren wurde beobachtet, dass eine maternale Expression vorliegt, da es nur in Keimbahnklonen des hypomorphen Allels *slam*^{waldo1} zu einem Zellularisierungsdefekt kommt. Zygotische Expression alleine führt im Fall von *slam*^{waldo1} zu einem späteren Defekt in der Wanderung der Keimzellen. Die Zellularisierung läuft hingegen normal ab (Stein *et al.*, 2002). Desweiteren konnte eine schwache Lokalisation von Slam am Furchungskanal in zygotisch defizienten Embryonen gezeigt werden (Wenzl *et al.*, 2010). Aufgrund der maternalen Lokalisation ist anzunehmen, dass *slam* RNAi zum Zeitpunkt der Zellularisierung nicht geeignet ist, um das Protein vollständig zu entfernen.

In dieser Arbeit konnte eine spezifische Wirkung von *slam* auf die *slow phase* der Membraninvagination widerlegt werden. Die Invaginationsanalyse in Abhängigkeit der maternalen und zygotischen Expression zeigte ein Ausbleiben der Membraninvagination während der gesamten Zellularisierung in Abwesenheit von Slam. In nur zygotisch oder maternal *slam*-defizienten Embryonen kommt es zu einer gegenüber dem Wildtyp verringerten jedoch vorhandenen Membraninvagination sowohl in der *slow phase* als auch in der *fast phase*. Es wurde weiterhin gezeigt, dass in Abwesenheit von Slam MyosinII nicht am Furchungskanal lokalisiert. Eine Analyse der Invagination in Abwesenheit von *slam* mit MyosinII als Membranmarker ist somit nicht möglich.

Slam ist nicht an der Definition der Invaginationsstellen beteiligt. Die Bildung der initialen Membraneinstülpung findet in Abwesenheit von Slam statt. Kortikales F-Aktin, Dia und Nullo lokalisieren am sich bildenden Furchungskanal. Slam ist weiterhin nicht Ursache einer fehlerhaften Membraninsertion während der Zellularisierung und dadurch bedingter Invaginationsdefekte. Nuf lokalisiert in Abwesenheit von Slam

5.3 Interaktion von Slam mit dem Zytoskelett

Die Membraninvagination in der Zellularisierung ist stark vom Cytoskelett abhängig. Zerstörung der Mikrotubuli durch Colcemid während der langsamen Phase der Invagination unterbindet die weitere Einwanderung, da der Mikrotubuli-abhängige Membrantransport gestoppt wird. Die schnelle Phase ist F-Aktin-abhängig. Injektion von Cytochalasin B führt zu einem Stopp der Invagination und teilweiser Retraktion der Membran (Foe *et al.*, 1993). Die bis auf die initiale Bildung des Furchungskanals vollständig unterbleibende Invagination in Abwesenheit von Slam weist auf eine regulative oder strukturelle Rolle des Proteins in Bezug auf das Cytoskelett hin.

Die Stabilität und Form der Plasmamembran ist von kortikalem F-Aktin abhängig. F-Aktin ist essentiell für die Stabilisierung des Furchungskanals. Es ist während der gesamten Zellularisierung an der Membran lokalisiert, wobei es zu einer signifikanten Konzentration am Furchungskanal kommt. Es sind eine Reihe von Proteinen bekannt, die auf die stabilisierende Wirkung von F-Aktin am Furchungskanal Einfluß haben. In Mutanten von *nullo*, *sry- α* , *bnk*, *rho-GEF2* und *dia* kommt es zur Bildung multinukleärer Zellen während der Zellularisierung. Es scheint redundante Mechanismen der Furchungskanalstabilisierung zu geben, Den Phänotypen all dieser Gene ist gemein, dass die Invagination nur an manchen Stellen betroffen ist (Schweisguth *et al.*, 1990, Schejter und Wieschaus, 1993, Postner und Wieschaus, 1994, Großhans *et al.*, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit von RhoGEF2 oder Dia die Aktinkonzentration am Furchungskanal reduziert ist (Großhans *et al.*, 2005).

In dieser Arbeit konnte weiter gezeigt werden, dass Slam RhoGEF2 an den Furchungskanal rekrutiert. Slam interagiert direkt mit RhoGEF2 über dessen PDZ-Domäne (Wenzl *et al.*, 2010). Diese Interaktion erfolgt unabhängig von einem C-terminalen PDZ-Bindemotiv (unveröffentlicht). Slam ist somit als übergeordneter Faktor an der Regulation von F-Aktin beteiligt.

Darüber hinaus konnte im Yeast-Two-Hybrid-Screen eine direkte Interaktion zwischen Slam und der FH2-Domäne von CG32138 gefunden werden. Es scheint somit nicht nur indirekt das Formin Dia zu regulieren, sondern auch direkt mit einem weiteren Formin zu interagieren. Desweiteren wurden Interaktionen mit Spire und Aktinin gefunden, die ebenfalls an der Regulation des Aktinzytoskeletts beteiligt sind.

Slam scheint somit eine zentrale Rolle bei der Regulation des Aktinzytoskeletts während der Zellularisierung einzunehmen.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Lokalisation von MyosinII am Furchungskanal von Slam abhängt. In *slam*-Keimbahnklonen fehlt Myosin vollständig am Furchungskanal. Eine Funktion von MyosinII bei der Invagination ist nicht bekannt. Es ist jedoch zusammen mit Aktin für die Bildung eines kontraktiven Rings bei der *basal closure* der Membran am Ende der Zellularisierung verantwortlich. Eine Rolle der Slam-Abhängigkeit dieses Prozesses kann aufgrund der ohne Slam ausbleibenden Invagination nicht untersucht werden, ist jedoch sehr wahrscheinlich. In der späteren Entwicklung nach der Zellularisierung ist eine RhoGEF2-regulierte Rolle von MyosinII und Dia für die Endozytose von E-Cadherin beschrieben (Levayer *et al.*, 2011). Möglicherweise besteht ein ähnlicher von Slam kontrollierter Mechanismus auch in der Zellularisierung.

Im Yeast-Two-Hybrid-Screen wurde weiterhin eine Interaktion von Slam mit Myosin10A gefunden, die *in vivo* verifiziert werden konnte. Myosin10A zeigt eine bislang unbekannte Lokalisation, die sich von der MyosinII-Lokalisation deutlich unterscheidet. Es lokalisiert apikal in sich während der Zellularisierung verbreiternden und basal ausdehnenden Kappen. Weiterhin sind zu Beginn der Zellularisierung sehr dicke Myosin10A Fasern basal des Furchungskanals erkennbar. Im apikalen Bereich dieser Fasern kolokalisiert es mit den Slam-Partikeln unbekannter Natur und Funktion. Später in der *fast phase*, in der die Invagination von Mikrofilamenten abhängt, kolokalisiert es mit Slam und Aktin am Furchungskanal sowie basal des Furchungskanals. Eine genauere Analyse der Notwendigkeit von Myosin10A für die Zellularisierung könnte neue Einblicke in den Mechanismus der Membraninvagination liefern.

5.4 Lokalisationsdynamik von Slam

Vesikulärer Transport apikaler Membran zu den lateralen Bereichen durch das Rab11 enthaltende *recycling endosome* spielt eine wichtige Rolle in der Zellularisierung (Pellisier *et al.*, 2003). Desweiteren wirken sich Mutationen des Rab11-Effektors Nuclear fallout (Nuf) auf die Lokalisation von RhoGEF2 aus (Cao *et al.*, 2008).

Neben den bekannten Effekten eines fehlerhaften Transports auf die Zellularisierung konnte auch ein Effekt von Rab11-Mutanten auf die Lokalisation von Slam am Furchungskanal gezeigt werden. Außerdem war interessanter Weise auch die Lokalisation von Slam in basalen Partikeln gestört. Dies könnte ein Hinweis auf eine mögliche vesikuläre Natur der basalen Partikel sein, welche bislang völlig unklar ist. Slam kann allerdings nicht im apikalen perizentrosomalen Bereich des *recycling endosome* detektiert werden und kolokalisiert nicht mit dem Rab11-Effektor Nuf. Der Effekt von Rab11 auf Slam könnte somit auch indirekt durch fehlerhafte Initiation der Furchungskanalbildung aufgrund fehlender apikale Membraninsertion sein. Ein Kolokalisation mit Rab5, welches das *early endosome* markiert, wurde ebenfalls nicht beobachtet. Umgekehrt konnte ein Effekt von Slam auf das *early endosome* ebenfalls nicht beobachtet werden. Nuf-Lokalisation ist in der Abwesenheit von Slam normal lokalisiert.

Ein Minusend-gerichteter Transport von basalen Slam-Partikeln an Mikrotubuli konnte ebenfalls nicht festgestellt werden. Zwei den Dynein-abhängigen Transport betreffende Mutationen zeigten keinerlei Auswirkungen auf die Slam-Lokalisation während der Zellularisierung. Die Membraninvagination war hierbei ebenfalls nicht betroffen, sodass eine Notwendigkeit eines Transports von basalen Komponenten nach apikal ausgeschlossen werden kann. Es gibt somit bis auf den auch indirekt erklärbaren Effekt von Rab11 auf die Slam-Lokalisation keinerlei Hinweise für die Notwendigkeit eines Mikrotubuli-abhängigen Transports von Slam.

Wie die FRAP-Analysen zeigten, lokalisiert Slam innerhalb eines kurzen Zeitfensters am Furchungskanal und ist dort anschließend fest verankert. Die Membran ist zu diesem Zeitpunkt hochdynamisch. Obwohl eine schnelle laterale Diffusion von Membrandomänen mit hoher Slam-Konzentration beobachtet wurde, steigt die Slam-Konzentration an den neuen Grenzen kontinuierlich und flächig an, was mit einer cytoplasmatischen Diffusion und Bindung des Proteins an der Membran des Furchungskanals über einen bislang unbekanntem Rezeptor hinlänglich zu erklären ist. Eine Notwendigkeit eines speziellen Transportmechanismus ist nicht erkennbar.

An durch freie Zentrosomen induzierten Invasionsfronten ohne Furchungskanalmorphologie lokalisiert Slam ebenfalls. Eine strukturgebende Funktion von Slam, die zur typischen haarnadelartigen Morphologie des Furchungskanals beiträgt scheint somit ebenfalls nicht gegeben.

5.5 Rolle der *slam* mRNA-Lokalisation

Subzelluläre mRNA-Lokalisation spielt eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl zellulärer Prozesse in Tierzellen (Zusammengefasst in Holt und Bullock, 2009; Besse und Ephrussi, 2008; St. Johnston, 2005). Bekannte Mechanismen der mRNA-Lokalisation sind aktiver Transport am Zytoskelett, Diffusion und Rekrutierung mittels spezifischer Rezeptoren sowie spezifischer subzellulärer Schutz vor Degradation. Der häufigste Lokalisationsmechanismus in *Drosophila* ist der gerichtete Dynein-abhängige Minusend-Transport an Mikrotubuli. Diskutiert wird außerdem die Möglichkeit eines gerichteten Kernexports, welcher aber bislang nicht nachgewiesen ist. Eine Analyse der subzellulären Lokalisation von 3370 mRNAs in der Embryonalentwicklung von *Drosophila* ergab, dass 71% der analysierten Transkripte lokalisiert sind (Lecuyer et al. 2007). Prominente Vertreter sind die in der Oozyte lokalisierten Transkripte von *nanos*, *bicoid* und *oskar* (Gavis und Lehmann, 1994; Weil et al., 2006; Zimyanin et al., 2008) sowie die apikale Lokalisation von *wingless* im Blastoderm (Dos Santos et al., 2007)

Die Kolokalisation von *slam* mRNA und Protein in dynamischen basalen Partikeln sowie am Furchungskanal legt eine Funktion der mRNA-Lokalisation nahe. Injektionsassays mit fluoreszenzmarkierter *slam* mRNA in Keimbahnklonen zeigten allerdings, dass die *slam* mRNA nicht für die Lokalisation am Furchungskanal und die Funktion des Proteins notwendig ist (Yan, unveröffentlicht). Außerdem zeigte die FRAP-Analyse der mRNA-Lokalisation am Furchungskanal, dass sie wie auch das Protein innerhalb weniger Minuten zu Beginn der Zellularisierung am Furchungskanal bindet und danach stabil dort verbleibt. Die Funktion der mRNA-Lokalisation sowie der auch nach der Bindung an der Invaginationsfront sehr mobilen basalen Partikel ist somit völlig unklar. Ein Mikrotubuli-abhängiger apikaler Transport kann aufgrund der Analyse entsprechender Mutanten wie bereits ausgeführt ausgeschlossen werden.

5.6 Modell der genetischen Kontrolle der Zellularisierung

Die Zellularisierung fällt zeitlich genau mit dem Übergang von maternaler zu zygotischer Genexpression zusammen (*mid blastula transition*, MBT; Newport und Kirschner, 1982a, 1982b; Edgar und Schubinger, 1986). Hier wirken maternal

angelegte mRNAs und Proteine mit den frühesten zygotischen Genprodukten zusammen. Genetische Screens zeigten, dass eine überraschend geringe Anzahl zygotischer Gene für den Prozess notwendig sind. Weniger als 10 nichtredundante Gene scheinen den Prozess zu kontrollieren (Merrill *et al.*, 1988; Wieschaus und Sweeton, 1988). Dies legt nahe, dass es sich bei den beteiligten zygotischen Genen um übergeordnete Regulatoren handelt, die eine größtenteils maternal angelegte Zellularisierungsmechanik aktivieren.

Aus der Analyse von Doppelmutanten lässt sich ableiten, ob Gene den Prozess im gleichen oder getrennten Signalwegen beeinflussen. *slam* und *nullo* scheinen zentrale Rollen in der Zellularisierung einzunehmen und in getrennten Signalwegen zu liegen, da die Doppelmutante wie in dieser Arbeit gezeigt einen wesentlich stärkeren Phänotyp zeigt. Slam ist essentiell für die Membraninvagination und wirkt über RhoGEF2, Rho1 und Dia auf Aktin und MyosinII. Nullo beeinflusst über Sry- α ebenfalls die Stabilität von F-Aktin am Furchungskanal. Die Doppelmutante zeigt einen starken Phänotyp mit vollständigem Verlust der E-Cadherin-Lokalisation an der Membran und starker Veränderung der Membranzugehörigkeit.

Es wurde außerdem in Doppelmutanten von *RhoGEF2* und *nullo* sowie *abl* und *nullo* gezeigt, dass sie nicht im gleichen Signalweg agieren (Diss. C.Wenzl, 2008). Ebenso verhält es sich für *RhoGEF2* und *bnk* (Padash Barmchi *et al.*, 2005). Slam und Nullo sind jedoch nicht an der Initialisierung der Zellularisierung beteiligt, wie die Lokalisation von Aktin am Furchungskanal in der Doppelmutante zeigt.

Es wird postuliert, dass in einer ersten Phase der Furchungskanalbildung die Zentrosomen im Bereich überlappender astraler Mikrotubuli einen oder mehrere unbekanntes Signalgeber in der Mitte zwischen benachbarten Kernen lokalisieren. Dies führt zu einer Polarisierung der Membran. Es kommt zu gerichteter Membraninsertion, an der *early* und *recycling endosome* beteiligt sind. Durch Aktivierung kortikalen F-Aktins kommt es zu einer initialen Membraneinstülpung die ebenfalls durch E-Cadherin-Akkumulation gekennzeichnet ist. In einer zweiten Phase werden dann zygotische Faktoren wie *nullo*, *slam* sowie die von ihnen abhängigen RhoGEF2, Rho1, Sry- α und Dia rekrutiert., die eine weitere Aktivierung des F-Aktin bewirken. Dah reguliert ebenfalls auf unbekanntes Weise F-Aktin und somit die Stabilität des Furchungskanals. Nach der Bildung des Furchungskanals kommt es zur Slam-abhängigen Invagination. Bnk reguliert schließlich die basal closure.

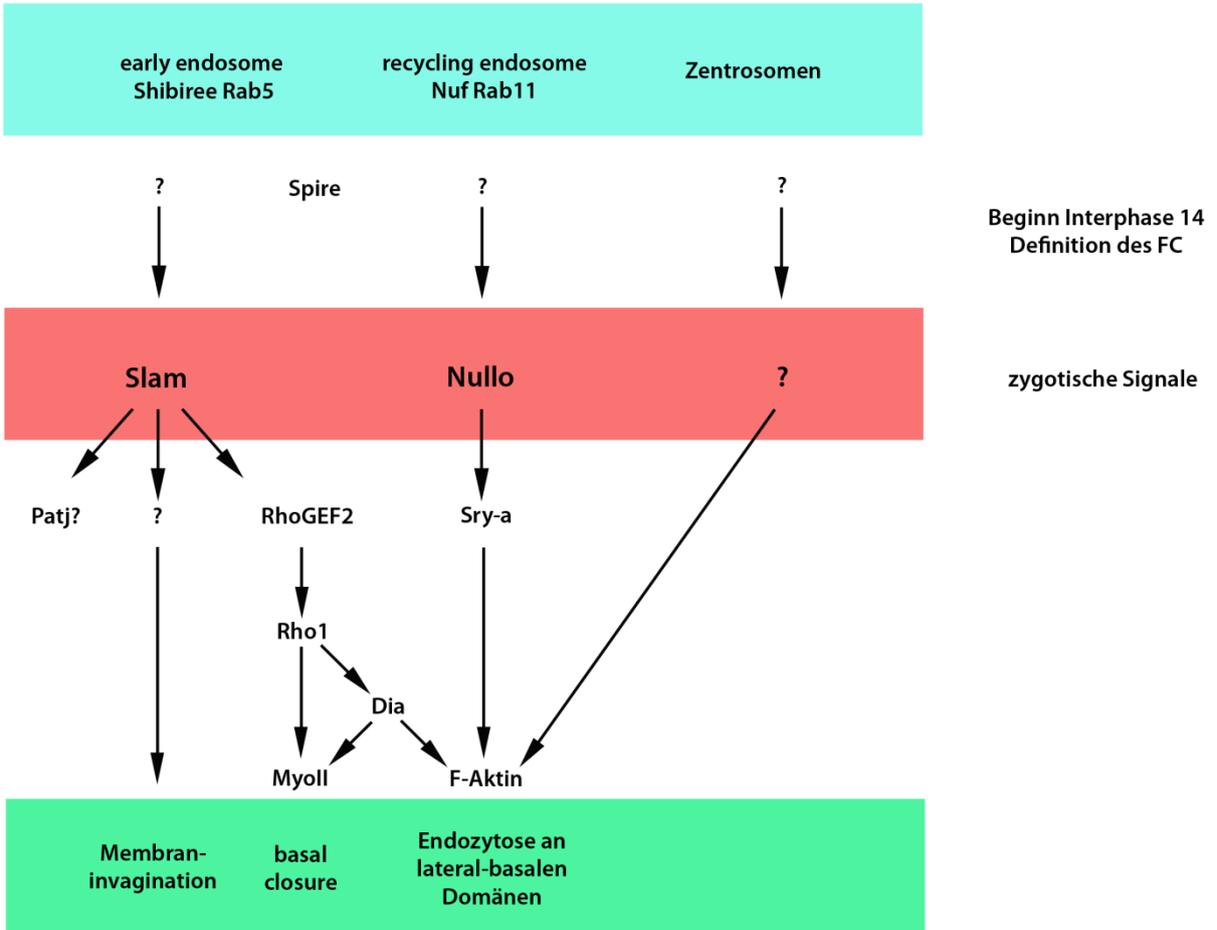


Abb. 5.1

Modell zur genetischen Regulation der Zellularisierung

Erläuterungen im Text. Unbekannte maternale Faktoren aktivieren die zentralen Faktoren Slam und Nullo, die übergeordnet Regulationskaskaden steuern. Es wird mindestens ein weiteres zygotisches Signal postuliert. Aufgeführt sind nur die direkten bekannten Regulationszusammenhänge.