

Philipps



Universität  
Marburg

**Fachbereich Biologie**  
**- Entwicklungsbiologie -**

**Die Rolle von *Drosophila* Dynamin, Graf und der nicht-Rezeptor Tyrosinkinase Fes/Fer bei der Internalisierung von N-Cadherin in adhärierenden Founderzellen und fusionskompetenten Myoblasten**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Carina Braukmann**

aus Hameln

Marburg/Lahn, März 2016

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg

als Dissertation angenommen am: 29.04.2016

Erstgutachter: Prof. Dr. Susanne-Filiz Önel

Zweitgutachter: Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

Tag der mündlichen Prüfung am: 09.05.2016

**Für meine Eltern**

## Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung .....	9
2. Einleitung.....	10
2.1 Zell-Zell Fusionen sind essentiell für entwicklungsrelevante Vorgänge in Säugetieren und Invertebraten.....	10
2.2 Die larvale Körperwandmuskulatur von <i>D. melanogaster</i> zeichnet sich durch ihr repetitives Muster aus.....	10
2.3 Die Determination der Founderzellen erfolgt mittels Notch-vermittelter lateraler Inhibition	11
2.4 Zellerkennung und -adhäsion werden durch Proteine der Immunoglobulin-Superfamilie vermittelt.....	12
2.5 Die IgSF-Proteine Sns und Duf lokalisieren ringförmig um die Kontaktstelle zwischen FC/wachsender Myotube und FCM.....	13
2.6 Die Aktivierung des Arp2/3 Komplexes erfolgt mittels Scar/WAVE und WASp.....	14
2.7 Rho-GTPasen werden mittels GEFs und GAPs reguliert.....	17
2.8 Durch eine intrazelluläre Signalkaskade wird das Signal von den IgSF-Proteinen an das Aktincytoskelett weitergeleitet.....	17
2.9 Die Myoblastenfusion lässt sich in zwei Phasen unterteilen und ist durch verschiedene ultrastrukturelle Veränderungen gekennzeichnet .....	19
2.10 Cadherine vermitteln Zell-Zelladhäsionen.....	22
2.11 Die nicht-Rezeptor Tyrosinkinase Fer ist in Vertebraten an der Regulation der Adherens Junctions beteiligt.....	23
2.12 N-Cadherin ist ein Interaktionspartner von Schizo und muss während der Myoblastenfusion endocytiert oder von der Membran abgebaut werden .....	24
2.12.1 Schizo interagiert mit N-Cadherin.....	24
2.12.2 Schizo vermittelt die Internalisierung von N-Cadherin.....	25
2.13 Bei der Internalisierung von Proteinen können unterschiedliche Endocytosewege eine Rolle spielen.....	26
2.14 Graf1 wird in <i>Mus musculus</i> während der Muskelentwicklung benötigt.....	27
2.15 Zielsetzung.....	29

3. Material .....	30
3.1 Verwendete Chemikalien .....	30
3.2 Verwendete Geräte .....	30
3.2.1 Mikroskope .....	30
3.2.2 Sonstige Geräte.....	30
3.3 Verwendete Enzyme.....	31
3.4 Verwendete Kits und Sonstiges .....	32
3.5 Antibiotika und Stocklösungen.....	32
3.6 Verwendete Puffer und Lösungen .....	33
3.7 Verwendete Medien und Platten.....	35
3.7.1 Nähr- und Zuchtmedien für <i>Drosophila melanogaster</i> .....	35
3.7.2 Nähr- und Zuchtmedien für <i>Escherichia coli</i> .....	35
3.7.3 Nähr- und Selektionsmedien für <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	36
3.8 Verwendete Zellkulturlinie ( <i>Drosophila melanogaster</i> ) .....	36
3.9 Verwendete Bakterienstämme ( <i>Escherichia coli</i> ) .....	36
3.10 Verwendeter Hefestamm.....	37
3.11 Verwendete Antikörper.....	37
3.12 Verwendete cDNAs.....	38
3.13 Verwendete Oligonukleotide.....	39
3.14 Vektoren und Konstrukte .....	39
3.15 Verwendete Fliegenstämme.....	55
4 Methoden.....	60
4.1 Arbeiten mit <i>Drosophila melanogaster</i> .....	60
4.1.1 Stammhaltung und Zucht von <i>Drosophila melanogaster</i> .....	60
4.1.2 Ansetzen von Kreuzungen.....	60
4.1.2.1 Umbalancierung einer Fliegenlinie .....	60
4.1.2.2 Mehrfachmarkierung einer Fliegenlinie .....	61

4.1.2.3 Generierung einer doppelmutanten Fliegenlinie .....	62
4.1.2.4 Generierung einer rekombinanten Fliegenlinie.....	62
4.1.3 Mikroinjektion in <i>D. melanogaster</i> und Keimbahntransformation mittels $\Phi$ C31-Integrase .....	63
4.1.4 Das UAS-Gal4 System zur ektopischen Expression von UAS-Konstrukten.....	64
4.1.5 Sammeln von Embryonen.....	65
4.1.6 Fixieren von Embryonen.....	65
4.2 Immunhistochemische Methoden .....	65
4.2.1 Antikörpernachweis an <i>whole mount</i> Embryonen .....	65
4.3 Molekularbiologische Methoden.....	66
4.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) .....	66
4.3.2 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	67
4.3.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	67
4.3.4 Aufreinigung von DNA mittels NucleoSpin® Kit.....	67
4.3.5 Konzentrationsbestimmung.....	68
4.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten in TOPO® Vektoren .....	68
4.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4 Ligase.....	68
4.3.8 Klonierung in Gateway®-Vektoren .....	69
4.3.9 Herstellung chemisch kompetenter DH5 $\alpha$ Zellen.....	69
4.3.10 Transformation von kompetenten DH5 $\alpha$ Zellen .....	69
4.3.11 Plasmid Präparation mittels alkalischer Lyse (Mini-Präparation).....	70
4.3.12 Plasmid Präparation im großen Maßstab (Midi-Präparation).....	70
4.3.13 Analytischer und präparativer Restriktionsverdau.....	71
4.3.14 Sequenzierung .....	71
4.4 Das Hefe 2-Hybrid System .....	71
4.4.1 Anzucht und Transformation der Hefe .....	72
4.4.2 Überstreichen der Hefekolonien auf Induktionsplatten.....	73

4.5 Arbeiten mit <i>Drosophila</i> S2 Zellen .....	73
4.5.1 Haltung und Aussäen von <i>Drosophila</i> S2 Zellen .....	73
4.5.2 Transfektion von <i>Drosophila</i> S2 Zellen.....	74
4.5.3 Fixierung von <i>Drosophila</i> S2 Zellen .....	74
4.5.4 Antikörpernachweis an <i>Drosophila</i> S2 Zellen.....	74
4.5.5 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (Bimolecular Fluorescence Complementation, BiFC) .....	75
5. Ergebnisse .....	76
5.1 <i>schizo</i> -Mutanten zeigen Defekte bei der Bildung der Fusionspore.....	76
5.2 Welcher Endocytosemechanismus ist an der Internalisierung von N-Cadherin beteiligt? .....	79
5.2.1 Das Dynamin Drp1 co-lokalisierte in S2 Zellen möglicherweise mit N-Cadherin, jedoch nicht mit Schizo .....	79
5.2.2 Analysen zur möglichen Funktion von Graf während der Myoblastenfusion von <i>D. melanogaster</i> .....	81
5.2.2.1 Graf co-lokalisierte transient mit Arf1 und aktiviertem Arf1 in <i>Drosophila</i> S2 Zellen.	81
5.2.2.2 Graf co-lokalisierte in <i>Drosophila</i> S2 Zellen transient mit Schizo.....	83
5.2.2.3 In Live-Imaging Studien lokalisierte Graf transient mit N-Cadherin an der Membran	84
5.2.2.4 N-Cadherin interagierte im Hefe 2-Hybrid System mit Graf über dessen SH3-Domäne .....	86
5.2.2.5 Die BiFC-Analysen zur Interaktion zwischen Graf und N-Cadherin lieferten kein verlässliches Ergebnis .....	88
5.3 Erfolgt während der Myoblastenfusion eine Signalweiterleitung von N-Cadherin zum Aktincytoskelett?.....	90
5.3.1 Schizo interagierte im Hefe 2-Hybridsystem weder mit Graf noch mit Cdc42.....	90
5.3.2 In frühen Stadien der Embryonalentwicklung schien Cdc42-mCherry an den Membranen zu lokalisieren, in Stadium 16 hingegen im Cytoplasma .....	91
5.3.3 Die Expression von <i>graf<sup>full length</sup></i> und aktiviertem <i>cdc42</i> im <i>schizo</i> -mutanten Hintergrund zeigten keine eindeutigen Rettungen .....	93
5.3.4 Abi interagierte im Hefe 2-Hybridsystem mit Schizo und Graf.....	94

5.3.5 Dock interagiert möglicherweise direkt mit N-Cadherin .....	97
5.3.5.1 Herstellung einer <i>N-cadherin,dock</i> Doppelmutante zum Nachweis einer möglichen genetischen Interaktion.....	98
5.3.5.2 In der <i>N-cadherin<sup>M19</sup>,dock<sup>04723</sup></i> Doppelmutante fehlten dorsale Muskeln .....	98
5.3.5.3 In den <i>N-cadherin<sup>M19</sup>,dock<sup>04723</sup></i> -Doppelmutanten waren leichte Anheftungsdefekte der lateralen Muskeln zu erkennen .....	100
5.3.5.4 Sowohl die <i>dock<sup>04723</sup></i> -Einzelmutante als auch die <i>N-cadherin<sup>M19</sup>,dock<sup>04723</sup></i> -Doppelmutanten zeigten leichte Defekte bei der Anheftung der ventralen Muskeln.....	101
5.4 Analysen zur möglichen Regulation der durch N-Cadherin vermittelten Adhäsionsstärke ....	103
5.4.1 Untersuchungen zur genetischen Interaktion zwischen <i>N-cadherin</i> und <i>fps85Dp92</i> .....	103
5.4.2 Analysen zur Lokalisation von Fps85Dp100 im Mesoderm.....	106
5.4.2.1 Das myrFps85Dp100-mCherry Fusionsprotein lokalisierte an den Membranen der Myotuben sowie an deren Anheftungsstellen .....	106
5.4.2.2 Fps85Dp100-Myc lokalisierte an den Membranen der Muskeln sowie an deren Anheftungsstellen.....	108
5.4.2.3 Fps85Dp100 mit deletierter SH2- und Tyrosinkinase-Domäne lokalisierte an den Anheftungsstellen der Myotuben sowie deren Membranen .....	110
5.4.2.4 Fps85Dp100 sowie eine verkürzte Variante des Proteins co-lokalisierten mit N-Cadherin im somatischen Mesoderm.....	112
5.4.2.5 myrFps85Dp100-mCherry co-lokalisierte im visceralen Mesoderm mit FasciclinIII an den Membranen .....	113
5.4.2.6 Auch Fps85Dp100-eGFP co-lokalisierte im visceralen Mesoderm mit FasciclinIII an den Membranen.....	114
5.4.3 Zellkulturstudien zur Lokalisation von Fps85Dp100 .....	115
5.4.3.1 Fps85Dp100 co-lokalisierte partiell mit Schizo und N-Cadherin in S2 Zellen.....	115
5.4.3.2 Fps85Dp100 co-lokalisierte partiell mit Arf1 und aktiviertem Arf1, jedoch nicht mit Graf.....	117
5.4.4 Bislang konnten noch keine direkten Interaktionspartner von Fps85Dp100 identifiziert werden.....	118
6. Diskussion .....	121



6.1 In <i>schizo</i> -Mutanten stoppt die Fusion überwiegend vor Ausbildung der Fusionssporen.....	121
6.2 Analysen zur Beteiligung von Fps85D an der Myoblastenfusion.....	124
6.2.1 Fps85D scheint eine Rolle während der Myoblastenfusion zu spielen und interagiert möglicherweise mit N-Cadherin auf genetischer Ebene.....	124
6.2.2 Co-Lokalisationen in S2 Zellen deuten auf eine Beteiligung von Fps85D an der Regulation von N-Cadherin hin.....	126
6.2.3 Co-Lokalisationsstudien im Embryo sowie Studien zur genetischen Interaktion deuten auf eine Beteiligung von Fps85D an der Regulation von N-Cadherin hin.....	127
6.2.4 Bislang konnten keine direkten Interaktionspartner von Fps85D in <i>D. melanogaster</i> identifiziert werden.....	129
6.3 Welcher Endocytoseprozess ist an der Internalisierung von N-Cadherin beteiligt?.....	130
6.3.1 Analysen zur Beteiligung von Graf und Cdc42 an der Regulation von N-Cadherin.....	131
6.3.1.1 Graf könnte während der Myoblastenfusion mit N-Cadherin interagieren und bei dessen Internalisierung mitwirken.....	131
6.3.1.2 Die Interaktion zwischen Graf und N-Cadherin auf Proteinebene sollte auf genetischer Ebene bestätigt werden.....	133
6.3.1.3 Die PH-Domäne von Graf scheint für die Lokalisation des Proteins benötigt zu werden, die SH3-Domäne interagiert mit N-Cadherin.....	134
6.3.1.4 Eine direkte Interaktion zwischen Cdc42 und Graf konnte mittels Hefe 2-Hybridsystem nicht gezeigt werden.....	138
6.3.1.5 Aussagen über eine Co-Lokalisation zwischen Cdc42 und Graf, Schizo und N-Cadherin in S2 Zellen können nicht getroffen werden.....	139
6.3.1.6 Die Rettungsexperimente der <i>schizo</i> -Mutanten lieferten kein zuverlässiges Ergebnis .....	140
6.4 Analysen zur möglichen Verbindung von N-Cadherin mit dem Aktincytoskelett.....	141
6.4.1 Eine Interaktion zwischen N-Cadherin und den Aktinregulatoren Kette, Abi und Dia konnte nicht nachgewiesen werden.....	141
6.4.2 Dock könnte eine Funktion als Adapterprotein zwischen N-Cadherin und den Aktinregulatoren übernehmen.....	142

6.4.3 Wird durch Schizo oder Graf eine indirekte Verbindung zwischen N-Cadherin und dem Aktincytoskelett hergestellt?.....	143
6.4.3.1 Graf und Schizo interagieren mit Abi .....	144
6.5. Ist ein Dynamin-abhängiger Endocytoseweg involviert? .....	146
6.5.1 Es gibt bisher keine Hinweise darauf, dass Shibire an der Endocytose von N-Cadherin beteiligt ist.....	147
6.5.2 Drp1 könnte in <i>D. melanogaster</i> an der Abschnürung der Vesikel beteiligt sein .....	147
6.5.3 Eine Rolle des Dynamin-ähnlichen Proteins 1 (Drp1) bei der Endocytose von N-Cadherin während der Myoblastenfusion ist möglich.....	148
6.6 Einordnung der Ergebnisse.....	149
7. Literaturverzeichnis.....	150
8.1 Abkürzungsverzeichnis.....	163
8.2 Abbildungsverzeichnis .....	165
8.3 Tabellenverzeichnis.....	168
8.4 Danksagungen.....	169
8.5 Erklärung .....	172

## Summary

During embryogenesis of *Drosophila melanogaster*, two types of myoblasts founder cells and fusion-competent myoblasts fuse to form the later body wall musculature (Önel and Renkawitz-Pohl, 2009). Besides some proteins of the Immunoglobulin-Superfamily, also the calcium-dependent transmembrane protein N-Cadherin contributes to adhesion between the myoblasts. The later site of contact needs to be nearly free of proteins, so during the establishment of this zone N-Cadherin, which keeps membranes at a definite distance, is proposed to become internalized. Genetic interaction studies indicate that endocytosis is regulated by the Arf1-guanine-nucleotide-exchange factor (GEF) Schizo (Dottermusch-Heidel et al., 2012). The aim of the present study was to analyze the mechanism by which N-Cadherin is endocytosed.

By reviewing the literature, we identified proteins, which might be involved in the endocytosis of N-Cadherin. These proteins comprise the Dynamins, as well as Graf and the non-receptor tyrosinekinase Fps85D. Together with Arf1, Graf1 is involved in several endocytic processes in vertebrates (Doherty and Lundmark, 2009). Cell culture studies show that mCherry-Graf co-localizes with Schizo-eGFP and Arf1-eGFP in vesicular structures in *Drosophila* S2 cells. Furthermore, via live-imaging studies a co-localization between mCherry-Graf and N-Cadherin<sup>TM</sup>intra-eGFP at the membranes of S2 cells were observed. A yeast two-hybrid assay revealed the interaction between N-Cadherin<sup>intra</sup> and Graf, for which the SH3-domain of Graf is essential. These results support the hypothesis that Graf is involved in the Schizo-mediated endocytosis of N-Cadherin. Besides, Schizo as well as Graf interact with the Scar/WAVE complex protein Abi in the yeast two-hybrid system. Abi might link N-Cadherin to the actin cytoskeleton.

The non-receptor tyrosinekinase Fes/Fer/Fps is involved in the regulation of the adhesion strength of N-Cadherin-mediated adherence junctions in vertebrates (El Sayegh et al., 2005). Fps85D-mCherry, the fusion protein of the *Drosophila* orthologue, co-localizes both with N-Cadherin<sup>TM</sup>intra-eGFP and with Schizo-eGFP and Arf1-eGFP in vesicular structures in cell culture. Moreover, a co-localization of Fps85D-mCherry and N-Cadherin were detected in the embryo at the membranes of myoblasts during fusion-relevant stages. Therefore, a function of Fps85D during the process of myoblast fusion seems to be possible. Furthermore, first interaction studies in the embryo indicate that there might be a genetic interaction between *N-cadherin* and *fps85D* and hypothesize that there might be a similar regulation as described in vertebrates.

## 1. Zusammenfassung

Während der Embryonalentwicklung in *Drosophila melanogaster* fusionieren zwei Typen von Myoblasten, Founderzellen und fusionskompetente Myoblasten, und bilden dadurch die spätere Körperwandmuskulatur (Önel und Renkawitz-Pohl, 2009). Dabei trägt neben den Proteinen der Immunoglobulin-Superfamilie auch das Calcium-abhängige Transmembranprotein N-Cadherin zur Adhäsion zwischen den Myoblasten bei. Für eine Annäherung der Zellmembranen müssen die Kontaktstellen jedoch nahezu frei von Proteinen sein, weshalb N-Cadherin, welches die Membranen auf Abstand zueinander hält, wahrscheinlich vor der Fusion internalisiert wird. Genetische Interaktionsstudien weisen darauf hin, dass der Arf1-Guanin-Nukleotidaustauschfaktor (GEF) Schizo diesen Prozess reguliert (Dottermusch-Heidel et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit sollte analysiert werden, über welchen Mechanismus N-Cadherin endocytotiert wird.

Durch Literaturanalysen wurden Proteine identifiziert, welche an der Endocytose von N-Cadherin beteiligt sein könnten. Dazu gehörten neben den Dynaminen auch Graf sowie die nicht-Rezeptor Tyrosinkinase Fps85D. In Vertebraten konnte gezeigt werden, dass Graf1 zusammen mit Arf1 an verschiedenen Endocytoseprozessen beteiligt ist (Doherty und Lundmark, 2009). Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Zellkulturstudien zeigen, dass mCherry-Graf in *Drosophila* S2 Zellen mit Schizo-eGFP und Arf1-eGFP in vesikulären Strukturen co-lokalisiert. Mittels Live-Imaging Studien wurde zudem eine Co-Lokalisation zwischen mCherry-Graf und N-Cadherin<sup>TM</sup>intra-eGFP an der Zellmembran der S2 Zellen beobachtet. Eine Interaktion auf Proteinebene zwischen N-Cadherin<sup>intra</sup> und Graf, für welche die SH3-Domäne von Graf essentiell ist, wurde mithilfe des Hefe 2-Hybridsystems gezeigt. Die Ergebnisse unterstützen die Vermutung einer Beteiligung von Graf an der Schizo-vermittelten Endocytose von N-Cadherin. Weiterhin interagieren sowohl Schizo als auch Graf im Hefe 2-Hybridsystem mit dem Scar/WAVE-Komplex-Protein Abi, wodurch eine Verbindung zwischen N-Cadherin und dem Aktincytoskelett hergestellt werden könnte.

Die nicht-Rezeptor Tyrosinkinase Fes/Fer/Fps ist in Vertebraten in die Regulation der Adhäsionsstärke der N-Cadherin-vermittelten Adherens Junctions involviert (El-Sayegh et al., 2005). In Zellkulturstudien co-lokalisiert das Fusionsprotein des *Drosophila* Orthologs, Fps85D-mCherry, sowohl mit N-Cadherin<sup>TM</sup>intra-eGFP als auch mit Schizo-eGFP und Arf1-eGFP in vesikulären Strukturen. Im Embryo konnte zudem eine Co-Lokalisation zwischen Fps85D-mCherry und N-Cadherin während der fusionsrelevanten Stadien an den Membranen der Myoblasten detektiert werden, was eine Funktion von Fps85D bei der Myoblastenfusion denkbar macht. Weiterhin deuten erste Interaktionsstudien im Embryo auf eine genetische Interaktion zwischen *N-cadherin* und *fps85D* hin und lassen die Vermutung auf eine ähnliche Regulation wie in Vertebraten zu.

## 2. Einleitung

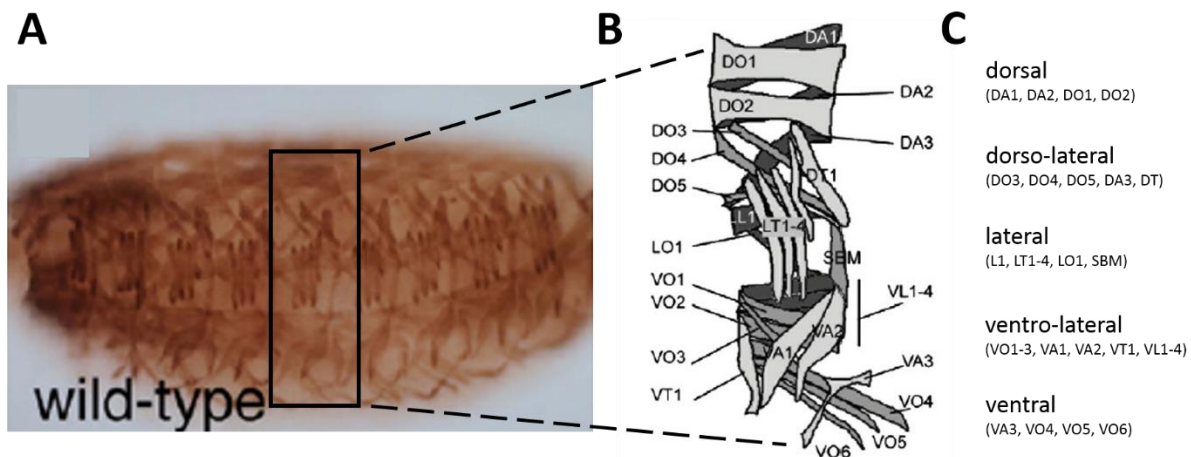
### 2.1 Zell-Zell Fusionen sind essentiell für entwicklungsrelevante Vorgänge in Säugetieren und Invertebraten

Ein bedeutender Prozess in der Biologie ist die Fusion zweier Zellen, welche sowohl während der Entwicklung des Embryos als auch im adulten Organismus essentiell ist (Önel und Renkawitz-Pohl, 2009; Rochlin et al., 2010; Aguilar et al., 2013). Zell-Zell Fusionen spielen zum Beispiel eine Rolle bei der Bildung von Osteoklasten und Riesenzellen aus Makrophagen (Helming und Gordon, 2009; Miyamoto, 2013) sowie beim Eintritt von umhüllten Viren in eine Wirtszelle (Podbilewicz, 2014; Harrison, 2015). Auch die Embryogenese beginnt mit einer heterologen Fusion zwischen Spermium und Eizelle, danach folgt die Fusion der Trophoblastenzellen zum Synzytiotrophoblasten beim Aufbau der Plazenta (Knöfler und Pollheimer, 2013; Gerbaud und Pidoux, 2015). In Säugetieren ermöglichen sogenannte Satellitenzellen mittels Fusion mit einem Muskelstrang sowohl post-natales Wachstum als auch Regeneration der Muskeln nach Verletzungen (Dumont et al., 2015; Moresi et al., 2015). Bei der Muskelentwicklung, der sogenannten Myogenese, fusionieren bei *Drosophila melanogaster* zwei verschiedene Zelltypen miteinander und bilden die spätere Körperwand- oder auch somatische Muskulatur (Önel und Renkawitz-Pohl, 2009; Rochlin et al., 2010; Aguilar et al., 2013). Aufgrund der zahlreichen Möglichkeiten zur genetischen Veränderung sowie der kurzen Generationszeit ist *D. melanogaster* ein guter Modellorganismus zur Erforschung der Muskelbildung (Maqbool und Jagla, 2007; Tixier et al., 2010; Abmayr und Pavlath, 2012; Weitkunat und Schnorrer, 2014).

### 2.2 Die larvale Körperwandmuskulatur von *D. melanogaster* zeichnet sich durch ihr repetitives Muster aus

In *D. melanogaster* wird die larvale Körperwandmuskulatur mittels Fusion zweier unterschiedlicher Typen von Myoblasten, den Gründer- oder Founderzellen (Founder Cells, FCs) sowie den fusionskompetenten Myoblasten (fusion-competent myoblasts, FCMs), gebildet (Paululat et al., 1999; Önel und Renkawitz-Pohl et al., 2009; Rochlin et al., 2010). Es entsteht ein regelmäßiges, repetitives Muskelmuster, welches sich aus 30 Myotuben je Hemisegment zusammensetzt und segmental wiederholt wird (Abb. 2.1 A; Bate, 1990; Ruiz-Gomez et al., 2000; Rochlin et al., 2010). Anhand verschiedener Faktoren wie der Größe, Form, der Anheftung an die Epidermis und der Innervierung lassen sich die einzelnen Muskeln unterscheiden (Abb. 2.1 B; Tixier et al., 2010). Die jeweilige Identität wird hierbei durch die FCs bestimmt. Nach der Fusion übernehmen die FCs das

Zellschicksal der FCs (Paululat et al., 1999; Chen und Olson, 2004; Abmayr und Pavlath, 2012). Die FCs lassen sich in verschiedene Gruppen einteilen - es werden dorsale, dorso-laterale, laterale, ventro-laterale und ventrale Zellen unterschieden, je nach Lage der späteren Muskeln im Embryo (Abb. 2.1 C; Tixier et al., 2010).



**Abb. 2.1: Aufbau der Körperwandmuskulatur von *D. melanogaster* sowie schematischer Überblick der einzelnen Muskeln pro Hemisegment.** Die larvale Muskulatur besteht aus einem regelmäßigen Muskelmuster (A), welches durch einen Antikörpernachweis des muskelspezifischen  $\beta$ 3-Tubulins sichtbar gemacht werden kann. Der gezeigte Embryo befindet sich in Stadium 16. Jedem Muskel kann eine spezifische Position innerhalb eines Hemisegments zugeordnet werden (B). Des Weiteren erfolgt eine Einteilung in dorsale, dorso-laterale, ventro-laterale und ventrale Muskeln (C). (Abbildungen entnommen aus Schäfer et al., 2007 sowie Tixier et al., 2010 und weiter modifiziert)

### 2.3 Die Determination der Founderzellen erfolgt mittels Notch-vermittelter lateraler Inhibition

Die larvale Körperwandmuskulatur von *D. melanogaster* entwickelt sich aus dem somatischen Mesoderm (Paululat et al., 1999). Die mesodermalen Zellen zeichnen sich schon während der frühen Embryonalentwicklung durch die Expression der Transkriptionsfaktoren Twist und Snail aus. Aus dem Mesoderm entstehen neben der somatischen auch die viscerale Muskulatur sowie das Herz. Zellen mit einer hohen Twist-Konzentration entwickeln sich zum somatischen Mesoderm (Paululat et al., 1999). Innerhalb dieser Regionen entstehen Cluster, in denen zusätzlich Lethal of Scute (L'Sc) exprimiert wird. Aus dieser Zellpopulation gehen mittels Notch-vermittelter lateraler Inhibition sogenannte Progenitorzellen hervor, aus denen sich im weiteren Verlauf die Founderzellen bilden (Carmena et al., 1995; Paululat et al., 1999; Chen und Olson, 2004). Die Progenitorzelle exprimiert bei diesem Prozess eine größere Menge des Liganden Delta und verhindert durch dessen Bindung an den

Notch-Rezeptor der umliegenden Myoblasten deren Delta Expression (Tixier et al., 2010; Perrimon et al., 2012; Torii, 2012). Sowohl Notch als auch Delta sind Transmembranproteine (Portin, 2002). Voraussetzung für die Signalweiterleitung ist deshalb ein Kontakt zweier Zellen. Die Interaktion zwischen Notch und dessen Liganden Delta führt zu einer Spaltung des Rezeptors in ein extra- und ein intrazelluläres Fragment. Die intrazelluläre Domäne von Notch kann dadurch im Nukleus als Transkriptionsfaktor und Co-Aktivator weiterer Transkriptionsfaktoren wirken (Fiùza und Arias, 2007; Portin, 2002). In FCMs wird durch Notch der zur Gli-Superfamilie gehörende Transkriptionsfaktor Lameduck (Lmd) exprimiert, welcher für die Spezifikation der FCMs verantwortlich ist (Duan et al., 2001; Rochlin et al., 2010; Tixier et al., 2010). Weiterhin charakterisiert werden FCs und FCMs durch die Zelltyp-spezifische Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche (Kim et al., 2015-b).

Neben der lateralen Inhibition mittels Notch-Delta Signalweg spielen auch Wingless- (Wg), Decapentaplegic- (Dpp), sowie Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) und Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-vermittelte Signalwege eine Rolle bei der Regulation der Spezifikation der FCs und FCMs. So führt zum Beispiel eine konstitutive Aktivierung des EGFR- oder FGFR-Signalweges zu einer erhöhten Anzahl von FCs (Estrada et al., 2006).

## **2.4 Zellerkennung und -adhäsion werden durch Proteine der Immunoglobulin-Superfamilie vermittelt**

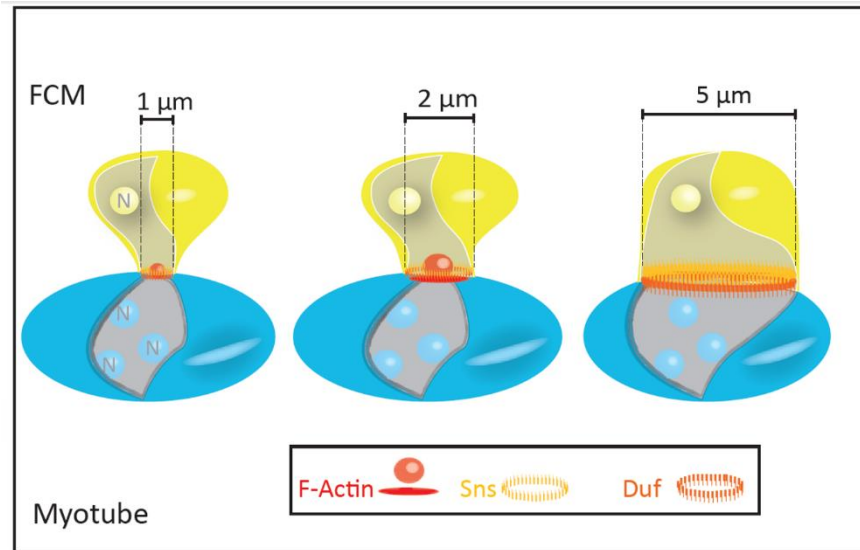
Grundvoraussetzung für die spätere Fusion der beiden Myoblastentypen ist die erfolgreiche Zellerkennung. Auf diese folgt die Migration der Zellen aufeinander zu und die abschließende Zelladhäsion. Diese Prozesse werden durch Proteine der Immunoglobulin-Superfamilie (IgSF) vermittelt, welche auf der Oberfläche der Myoblasten exprimiert sind (Önel und Renkawitz-Pohl, 2009; Abmayr und Pavlath, 2012). Gekennzeichnet sind diese Proteine durch mehrere extrazelluläre Immunoglobulin-Domänen. Ein Protein, welches ausschließlich in FCMs exprimiert wird, ist Sticks and Stones (Sns). Ein Verlust von Sns führt zu einem starken Fusionsdefekt, bei dem keine Myoblastenfusion mehr beobachtet werden kann (Bour et al., 2000). In *D. melanogaster* wird neben Sns auch dessen Paralog Hibris (Hbs) spezifisch in FCMs gebildet (Artero et al., 2001; Dworak et al., 2001). Beide Proteine sind Orthologe zu dem humanen Nephrin, welches in der Niere vorkommt (Tryggvason, 1999). *hbs*-Mutanten zeigen einen partiellen Block der Fusion mit einer erhöhten Anzahl unfusionierter Myoblasten im Mesoderm (Artero et al., 2001). Somit scheint Hbs funktionell redundant zu Sns zu wirken (Shelton et al., 2009). Spezifisch in FCs exprimiert ist das IgSF-Protein Dumbfounded/Kin of irre (Duf/Kirre) (Ruiz-Gomez et al., 2000). Duf löst die Ausrichtung und

Migration der FCMs in Richtung der FCs aus und vermittelt dadurch die Aggregation der FCMs um die FC (Ruiz-Gomez et al., 2000). Das Transmembranprotein Roughest/Irregular chiasm-C (Rst/IrreC) hingegen wird in FCs und FCMs exprimiert (Strünkelnberg et al., 2001). Wie auch Duf wirkt Rst chemoattraktiv auf FCMs. Sowohl Duf als auch Rst allein sind nicht essentiell für die Fusion, beide wirken während der Muskelentwicklung teilweise redundant. Ein Verlust beider Proteine führt jedoch zu einem Fusionsdefekt (Strünkelnberg et al., 2001). Studien an transfizierten *Drosophila* S2 Zellen zeigten, dass Duf-transfizierte Zellen sowohl homotypische Aggregate bilden als auch mit Sns- oder Hbs-transfizierten Zellen aggregieren können (Dworak et al., 2001). Die Bildung heterotypischer Aggregate zwischen Duf- und Sns-transfizierten Zellen verläuft jedoch schneller als die homotypischer. Eine direkte Interaktion zwischen den beiden Zelladhäsionsproteinen in *Drosophila* S2 Zellen konnte zudem mittels Co-Immunopräzipitation nachgewiesen werden (Galletta et al., 2004).

## **2.5 Die IgSF-Proteine Sns und Duf lokalisieren ringförmig um die Kontaktstelle zwischen FC/wachsender Myotube und FCM**

Auf Proteinebene wurde während der Fusion die Ausbildung eines Multiproteinkomplexes beschrieben. Bei der sogenannten FuRMAS (Fusion-Restricted Myogenic-Adhesive Structure) handelt es sich um unterschiedliche an der Fusion beteiligte Proteine, welche an der Kontaktstelle zwischen den Zellen lokalisieren (Önel und Renkawitz-Pohl, 2009). Die IgSF-Proteine Sns und Duf, welche die Bildung des Proteinkomplexes initiieren, bilden dabei eine ringförmige Struktur, die sich während der Fusion von anfangs 1  $\mu\text{m}$  bis auf 5  $\mu\text{m}$  weitet (Abb. 2.2). Außerdem ist eine Anreicherung von filamentösem Aktin (F-Aktin) an der Kontaktstelle beschrieben. In den FCMs ist diese als Aktin-Fokus innerhalb der ringförmigen Struktur nachweisbar (Kesper et al., 2007; Richardson et al., 2007; Önel und Renkawitz-Pohl, 2009), in den FCs/wachsenden Myotuben hingegen als dünne Aktin-Schicht (Sens et al., 2010; Haralalka et al., 2011). Zudem wurden fingerartige Strukturen beschrieben, welche von den FCMs ausgehen und in die FCs ragen (Sens et al., 2010). Zusätzlich zu der Aktinanreicherung werden weitere für die Fusion benötigte cytoplasmatische Proteine zur Kontaktstelle rekrutiert (Önel und Renkawitz-Pohl, 2009).





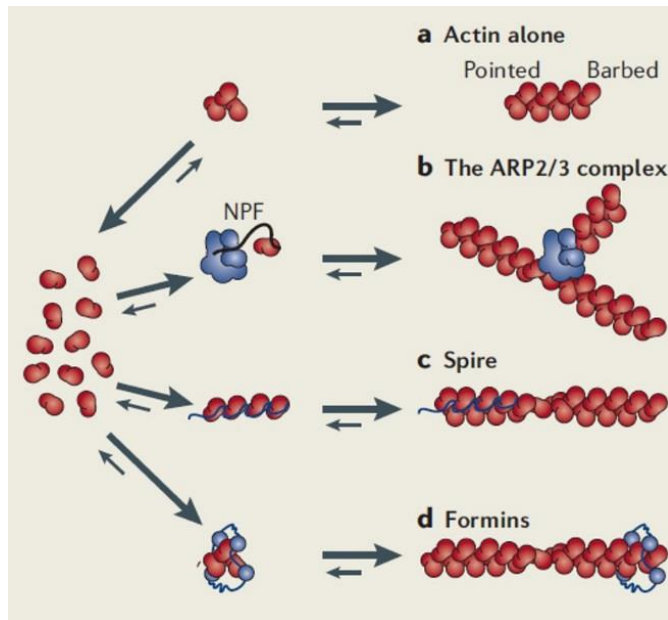
**Abb. 2.2: Sns und Duf bilden eine ringförmige Struktur an der Kontaktstelle zwischen FCM und FC/wachsender Myotube.** In den FCMs wurde die Ausbildung eines Aktin-Fokus gezeigt, in den FCs und wachsenden Myotuben bildet sich eine dünne Aktin-Schicht. Im Verlauf der Fusion weitet sich die ringförmige Struktur, welche durch Sns und Duf gebildet wird, von 1 µm Durchmesser auf etwa 5 µm. (Önel et al., 2014)

## 2.6 Die Aktivierung des Arp2/3 Komplexes erfolgt mittels Scar/WAVE und WASp

In *D. melanogaster* wurde innerhalb der FuRMAS eine Aktin-reiche Struktur beobachtet (Richardson et al., 2007). Während der Myoblastenfusion könnte Aktin verschiedene Funktionen übernehmen. So scheint es zum Beispiel an der Weitung der durch die IgSF-Proteine gebildeten ringförmigen Struktur beteiligt sein. Mutanten, in denen die F-Aktin Bildung gestört ist, zeigen keine Vergrößerung der FuRMAS vor der Fusion (Kesper et al., 2007). Zudem deuten Studien darauf hin, dass auch die Ausbildung der fingerartigen Strukturen abhängig von der Aktinpolymerisation ist (Sens et al., 2010; Jin et al., 2011).

In Vertebraten ist Aktin an der Ausbildung von Lamellipodien, Pseudopodien und Filopodien während der Zellmigration beteiligt. Zudem spielt es wahrscheinlich eine Rolle bei Transportprozessen am Golgi sowie bei Exo- und Endocytoseprozessen (Goley und Welch, 2006). Aktin kann in globuläres (G-) und filamentöses (F-) Aktin unterteilt werden. Dabei setzt sich F-Aktin aus mehreren Aktinmonomeren zusammen. Die Bildung dieser Filamente wird als Nukleation bezeichnet (Goley und Welch, 2006; Pollard, 2007). Da der Aufbau von F-Aktin ohne zusätzliche Faktoren (Abb. 2.3 a) kinetisch nicht effektiv ist, wird die Aktinpolymerisation meist durch weitere Faktoren initiiert. Sowohl der Arp2/3 Komplex (actin-related protein 2/3 complex) als auch Formine

und Spire können diese Funktion übernehmen. Durch den Arp2/3 Komplex wird dabei verzweigtes F-Aktin gebildet (Abb. 2.3 b), Formine und Spire können die Bildung von unverzweigtem F-Aktin bewirken (Abb. 2.3 c und d) (Goley und Welch, 2006; Pollard, 2007).



**Abb. 2.3: Überblick der verschiedenen Möglichkeiten zur Aktinpolymerisation.**

Eine spontane Bildung von unverzweigtem F-Aktin, ohne Nukleatoren, ist kinetisch nicht effektiv und deshalb eher selten (a). Vermittelt durch den Arp2/3 Komplex wird verzweigtes F-Aktin generiert (b), Spire und Formine hingegen bewirken den Aufbau von linearem F-Aktin (c und d). (Goley und Welch, 2006).

Die grundlegenden Mechanismen bei der Bildung von verzweigtem F-Aktin mittels Arp2/3 Komplex wurden in Vertebraten untersucht und beschrieben. Der Arp2/3 Komplex besteht aus den Untereinheiten Arp2 und Arp3 sowie fünf weiteren Untereinheiten (Goley und Welch, 2006; Pollard, 2007), welche den Komplex stabilisieren und in einem inaktiven Zustand halten. Die Aktivierung erfolgt durch die Bindung an Aktinfilamente, ein Aktin-Monomer und einen kernbildungsfördernden Faktor (nucleation-promoting factor, NPF) (Pollard et al., 2007; Suetsugu, 2013). Dazu gehören das Wiskott-Aldrich Syndrome protein (WASp) sowie der Scar/WAVE Komplex (suppressor of cyclic AMP repressor/WASp-family verprolin-homologous protein) (Kurisu und Takenawa, 2009; Campellone und Welch, 2010). Beide Proteine besitzen eine C-terminale Domäne, welche jeweils aus einem V- (verprolin homology), C- (connecting) und A- (acidic) Motiv besteht. Da durch das VC-Motiv ein Aktinmonomer gebunden werden kann und das CA-Motiv die Bindung zum Arp2/3 Komplex vermittelt, wird damit beides in räumliche Nähe gebracht und die Bildung von verzweigtem F-Aktin wird initiiert. Mittels intramolekularer Bindung zwischen VCA-Domäne und GTPase-Bindedomäne (GBD) wird WASp im auto-inhibierten Zustand gehalten. Erst durch die kompetitive Bindung von aktivem Cdc42-GTP (Cell division cycle 42) oder Rac (Ras-related C3 botulinum toxin substrate) zusammen mit Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) an der GTPase-Bindedomäne von WASp kann die Inhibierung aufgehoben werden. WASp kann daraufhin den Arp2/3 Komplex aktivieren (Pollard et al., 2007; Kurisu und Takenawa, 2009; Campellone und Welch, 2010). Im

Gegensatz zu WASp ist Scar/WAVE konstitutiv aktiv. Bei Scar/WAVE handelt es sich um einen Proteinkomplex, bei dem Sra1 (specifically Rac-associated-1), Nap1 (Nck-associated protein 1), Abi (Abl-interacting protein) und HSPC300 zusammenwirken. Ein Verlust von einem Protein aus dem Komplex führt zur Destabilisierung und Degradierung des gesamten Komplexes. Aktiviert wird der Komplex durch die kleine GTPase Rac, welche in GTP-gebundener Form direkt an Sra1 binden kann (Pollard et al., 2007; Kurisu und Takenawa, 2009; Campellone und Welch, 2010). In *D. melanogaster* ist Scar/WAVE in FCs und FCMs exprimiert und ist sowohl in die Migration der Myoblasten, als auch deren Anheftung involviert (Gildor et al., 2009). Während der Migration der Zellen lokalisiert der Scar/WAVE Komplex in den Lamellipodien, nach der Adhäsion ist das Protein vermehrt an der Kontaktstelle zu detektieren. Dort ist Scar/WAVE möglicherweise an der Bildung und Weitung der Fusionspore beteiligt (Gildor et al., 2009). Zudem konnte gezeigt werden, dass die kleine GTPase Rac für die Lokalisation des Scar/WAVE Komplexes benötigt wird (Gildor et al., 2009). Weiterhin wurde eine Funktion bei der Bildung des F-Aktin-Fokus in FCMs beschrieben sowie möglicherweise eine redundante Rolle zu WASp während dieses Prozesses (Sens et al., 2010). In FCs ist Scar/WAVE für die Bildung der Aktinschicht verantwortlich. WASp hingegen wird für die Invasion der fingerartigen Strukturen von der FCM in die FC benötigt (Sens et al., 2010) und spielt wahrscheinlich erst während der Expansion der Fusionspore eine Rolle (Gildor et al., 2009). Während die fingerartigen Strukturen von der FCM ausgehen, wird auf Seiten der FC/wachsenden Myotube Myosin II (MyoII) durch Rho-GTPasen oder die Rho Kinase (Rok) aktiviert (Kim et al., 2015-a). Mittels Rekrutierung von MyoII zur Kontaktstelle wird der durch die fingerartigen Strukturen entstehenden Spannung entgegengewirkt, was möglicherweise zu einer weiteren Annäherung der Membranen führt (Kim et al., 2015-a).

Neueste Analysen zeigen, dass auch das Formin Diaphanous (Dia) an der Aktinpolymerisation während der Myoblastenfusion in *D. melanogaster* beteiligt ist (Deng et al., 2015). Dia akkumuliert an der Kontaktstelle zwischen FC/wachsender Myotube und FCM und co-lokalisiert sowohl mit der dünnen Aktinschicht als auch mit dem Aktinfokus. Ein Verlust von Dia führt zu einem Fusionsdefekt. Zudem kommt es nicht zur Bildung eines Aktinfokus in FCMs (Deng et al., 2015). Auch die Lokalisation der Arp2/3 Regulatoren SCAR/Wave und Wasp scheint abhängig von der Aktivität von Dia zu sein. Die Dia-vermittelte Aktinpolymerisation wird möglicherweise für die Bildung der fingerartigen Strukturen benötigt. Das durch Dia gebildete F-Aktin dient dabei wahrscheinlich als Substrat für den Arp2/3 Komplex (Deng et al., 2015). Dia gehört zur Familie der Formine, welche sich durch die Formin Homologie Domäne 2 (formin homology domain 2, FH2) auszeichnen (Pollard, 2007). Auch Dia liegt im auto-inhibierten Zustand vor. Mittels intramolekularer Interaktion wird die Aktivität

eingeschränkt. Durch die Bindung der Rho-GTPasen an das N-terminale Ende wird diese Wirkung aufgehoben (Jaffe und Hall, 2005; Pollard, 2007).

## 2.7 Rho-GTPasen werden mittels GEFs und GAPs reguliert

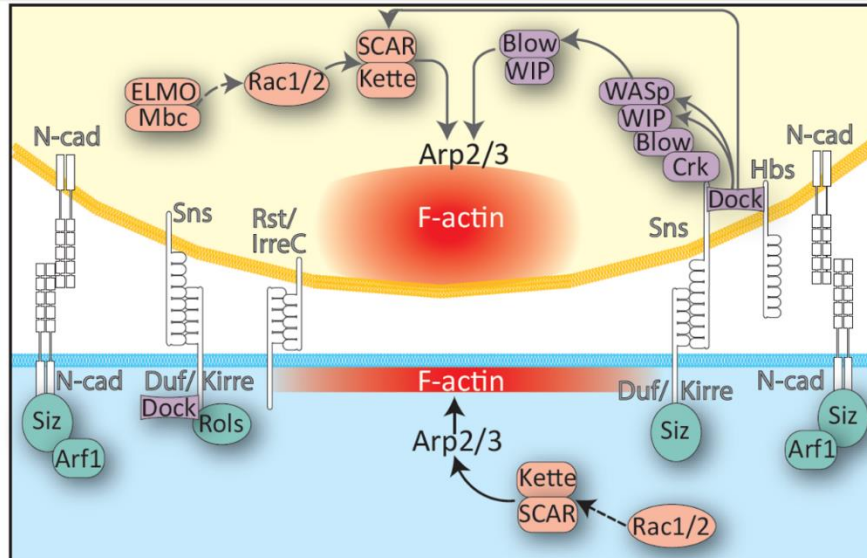
Sowohl die Aktivität von Dia als auch die der NPFs kann durch Rho-GTPasen reguliert werden (Chi et al., 2013). Rho-GTPasen, wie zum Beispiel Cdc42, Rac und RhoA, wechseln zwischen aktiver, GTP-gebundener, und inaktiver, GDP-gebundener Form. Sogenannte Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (guanine nucleotide exchange factors, GEFs) aktivieren die GTPasen, indem sie den Austausch von GDP zu GTP vermitteln. In diesem aktivierten Zustand können die GTPasen mit den Effektorproteinen interagieren. GTPase-aktivierende Proteine (GTPase-activating proteins, GAPs) hingegen wirken inaktivierend. Zudem gibt es noch eine dritte Klasse von regulatorischen Proteinen, die Guanin-Nukleotid Dissoziationsinhibitoren (guanine nucleotide dissociation inhibitor, GDIs). Diese Proteine können an den C-terminalen Teil der GTPasen binden und diese dadurch in einer inaktiven Form halten (Jaffe und Hall, 2005; Chi et al., 2013). Durch die Aktivierung der Aktinnukleatoren Scar/WAVE und Wasp übernehmen die Rho-GTPasen eine wichtige Funktion bei vielen zellulären Prozessen, bei denen eine Umgestaltung des Aktincytoskeletts essentiell ist. Die GTPase Cdc42 ist beispielsweise involviert in verschiedene Endocytosewege, dem Vesikeltransport innerhalb der Zellen sowie in Exocytoseprozesse. Zudem ist Cdc42 an der Aufrechterhaltung der Zellpolarität beteiligt (Harris und Tepass, 2010-a; Chi et al., 2013).

## 2.8 Durch eine intrazelluläre Signalkaskade wird das Signal von den IgSF-Proteinen an das Aktincytoskelett weitergeleitet

Die Aktivierung der Arp2/3 Komplex-regulierenden Faktoren durch die Rho-GTPasen ist lediglich der letzte Schritt einer intrazellulären Signalkaskade, welche für die Umgestaltung des Aktincytoskeletts essentiell ist. In *D. melanogaster* erfolgt die Weiterleitung des Signals von den IgSF-Molekülen zu den NPFs und damit auch zum Aktincytoskelett mithilfe von verschiedenen Proteinen (Abb. 2.4; Önel et al., 2014). In FCMs ist eines davon Rolling Pebbles 7/Antisocial (Rols 7/Ants), welches sowohl mit der intrazellulären Domäne von Duf interagiert, als auch mit dem cytoplasmatischen Protein Myoblast city (Mbc) (Chen und Olson, 2001). Als GEF aktiviert Mbc wahrscheinlich die kleine GTPase Rac, welche über den Scar/WAVE Komplex die Aktinpolymerisation in FCMs initiiert (Önel und Renkawitz-Pohl, 2009; Abmayr und Pavlath, 2012). Das SH2-SH3-Adapterprotein Crk (CT10 regulator of kinase) kann in FCMs an die intrazelluläre Domäne von Sns binden (Kim et al., 2007) und

mit dem FCM-spezifischen Protein Blown Fuse (Blow) (Jin et al., 2011) sowie Wip/Vrp1/Sltr (WASp-interacting partner/Verprolin1/Solitary) interagieren (Kim et al., 2007). Vermittelt durch Sns erfolgt die Rekrutierung von Blow an die Kontaktstelle, wo es mit Wip, WASp sowie dem F-Aktin Fokus co-lokalisiert (Jin et al., 2011). Wip bildet einen Komplex mit WASp und sorgt damit für eine Stabilisierung des Komplexes (Jin et al., 2011) sowie für die Rekrutierung von WASp an die Kontaktstelle zwischen FCM und FC/wachsender Myotube (Massarwa et al., 2007). Zusätzlich zu dem Wip-WASp-Komplex reguliert jedoch auch Blow die Aktinpolymerisation, indem es mit WASp um die Bindung an Wip konkurriert (Jin et al., 2011). Auch das Nap1 Homolog in *D. melanogaster*, Kette, interagiert mit Blow und wird wahrscheinlich für die Bildung der Plaques sowie die Vesikulierung der Membranen benötigt (Schröter, 2004).

In Vertebraten stellt das SH2-SH3-Domänen Protein Nck die Verbindung zwischen den Nephrienen und dem Aktincytoskelett dar (Jones et al., 2006; Verma et al., 2006). In *D. melanogaster* wird diese Funktion von dessen Homolog Dreadlocks (Dock) übernommen (Kaipa et al., 2013). Während der Embryogenese wird Dock ubiquitär exprimiert und co-lokalisiert mit Sns und Duf am Zell-Zellkontakt zwischen FC und FCM. Das Protein besteht aus drei SH3-Domänen, welche an Prolin-reiche Regionen binden, sowie einer C-terminalen SH2-Domäne, welche an Phosphotyrosinenden bindet. Mittels genetischer und biochemischer Analysen konnte gezeigt werden, dass Dock mit den Aktinregulatoren Scar/WAVE, Wip und WASp interagiert und zudem an die intrazellulären Domänen der IgSF-Proteine bindet (Kaipa et al., 2013). Ein Verlust von Dock verursacht keinen Muskelphänotyp. Allerdings sind sowohl in *wip,dock* als auch in *wasp,dock* und *dock,hbs* Doppelmutanten Fusionsdefekte zu beobachten, was auf eine genetische Interaktion hindeutet (Kaipa et al., 2013).

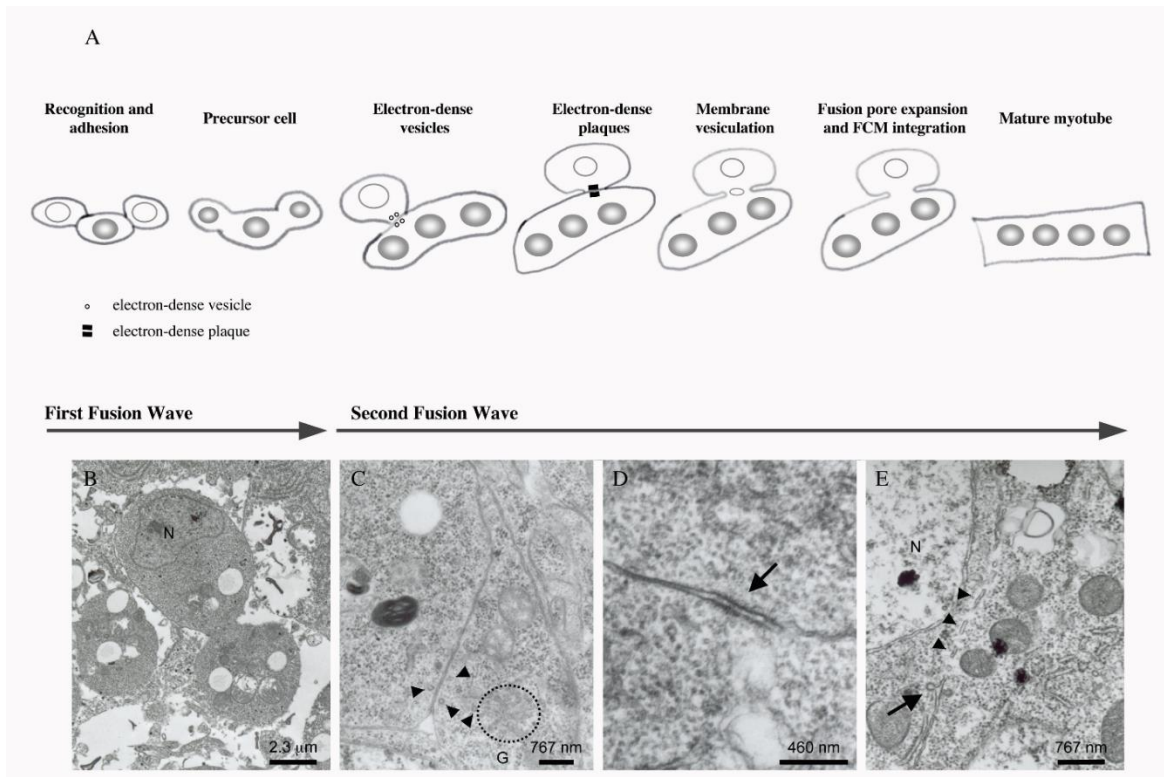


**Abb. 2.4: Signalweiterleitung in den Zellen.** Durch die Zell-Zell-Erkennung und Adhäsion, vermittelt durch Proteine der IgSF-Superfamilie, wird im Inneren der Myoblasten eine Signalkaskade ausgelöst, die zur Umstrukturierung von F-Aktin an den Kontaktstellen führt. (Modifiziert nach Önel et al., 2014).

## 2.9 Die Myoblastenfusion lässt sich in zwei Phasen unterteilen und ist durch verschiedene ultrastrukturelle Veränderungen gekennzeichnet

Initiiert wird die Myoblastenfusion durch die Erkennung und Migration der Zellen sowie die darauffolgende Adhäsion. Im Inneren der Myoblasten wird dadurch die zuvor beschriebene Signalkaskade ausgelöst (Önel et al., 2014). Die Fusionsereignisse lassen sich jeweils in zwei Phasen unterteilen. Während der ersten Phase kommt es zur Fusion von einer FC mit zwei bis drei FCMs und dadurch zur Bildung einer sogenannten Muskelvorläuferzelle. Diese fusioniert in der zweiten Phase mit weiteren FCMs (Abb. 2.5 A), bis die endgültige Größe des Muskels erreicht ist (Önel und Renkawitz-Pohl, 2009). Mithilfe transmissionselektronenmikroskopischer Aufnahmen nach konventioneller chemischer Fixierung der Embryonen konnten verschiedene Veränderungen auf ultrastruktureller Ebene gezeigt werden (Doberstein et al., 1997). In der ersten Phase konnte bislang lediglich die Vesikulierung der Membranen beobachtet werden (Abb. 2.5 B). Während der zweiten hingegen sind an der Kontaktstelle zwischen wachsender Myotube und sich anheftender FCM paarig angeordnete elektronendichte Vesikel zu erkennen, welche den sogenannten Präfusionskomplex bilden (Abb. 2.5 C). Außerdem wurde die Bildung elektronendichter Plaques beschrieben (Abb. 2.5

D). Vor der eigentlichen Fusion kommt es zur Vesikulierung der Membranen (Abb. 2.5 E). Es bilden sich Fusionsporen, die sich weiten und durch welche die FCM in die wachsende Myotube integriert wird (Doberstein et al., 1997; Önel und Renkawitz-Pohl, 2009).



**Abb. 2.5: Ultrastrukturelle Veränderungen während der beiden Phasen der Myoblastenfusion.** Die verschiedenen Schritte von Erkennung und Adhäsion der Zellen bis zur Entstehung der Myotube sind schematisch in A zusammengefasst. Die ultrastrukturellen Veränderungen konnten mittels transmissionselektronenmikroskopischer Aufnahmen nach einer chemischen Fixierung beobachtet werden. Während der ersten Phase fusioniert eine FC mit zwei bis drei FCMs (B). In der zweiten Phase konnten elektronendichte Vesikel beobachtet werden (C) sowie sogenannte elektronendichte Plaques (D) und die Vesikulierung der Membranen (E) vor der Integration der FCM in die Myotube. (Önel und Renkawitz-Pohl, 2009).

Aufgrund späterer transmissionselektronenmikroskopischer Studien wurde postuliert, dass während der Fusion von FCMs mit FCs/wachsenden Myotuben nur eine Fusionspore gebildet wird, durch welche die Integration erfolgt (Sens et al., 2010). Die Weitung dieser Pore soll dabei nicht mit einer Aktinpolymerisation oder der Vesikulierung der Membranen assoziiert sein. Zudem wurden mehrere fingerartige Strukturen gezeigt, welche von den FCMs ausgehen und in die FCs/wachsenden Myotuben ragen. Statt der konventionellen chemischen Fixierung wurde die Methode des „High

Pressure Freezing/Freeze Substitution“ (HPF/FS) für die Fixierung der Embryonen verwendet. Mithilfe dieser Fixierung soll die Zellstruktur besser erhalten bleiben sowie das Vorkommen von Artefakten reduziert werden (Sens et al., 2010). Bei der chemischen Fixierung werden die Embryonen bei Raumtemperatur zunächst mit Glutaraldehyd fixiert, um die Proteinstruktur zu erhalten. Erst durch einen späteren Inkubationsschritt mit Osmiumtetroxid werden auch die Lipide fixiert (McDonald und Auer, 2006; Zhang und Chen, 2008). Die Lipidstruktur könnte dadurch weniger gut konserviert sein, was zu einem Auftreten von Artefakten wie dem Verlust der Kontinuität führen könnte. Zudem findet die Diffusion der Fixierungslösung in das Gewebe nur sehr langsam statt. Sowohl die Vitellinmembran als auch die Epidermis verlangsamen den Prozess zusätzlich. Im Vergleich zu der chemischen Fixierung werden die Embryonen bei der HPF/FS bei hohem Druck und Temperaturen unter  $-140\text{ °C}$  eingefroren. Das gefrorene Wasser wird im nächsten Schritt durch die zur Fixierung verwendete Lösung ersetzt. Aufgrund der hohen Geschwindigkeit dieses Vorgangs, zwischen 20 und 50 ms, und der dabei herrschenden niedrigen Temperaturen können sowohl Protein- als auch Lipidstrukturen besser erhalten werden (McDonald und Auer, 2006; Zhang und Chen, 2008).

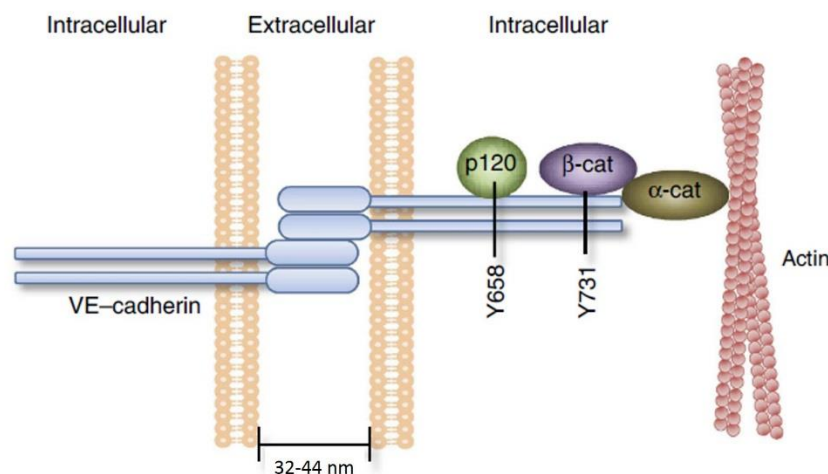
Mithilfe einer Methode, welche sowohl Elemente der konventionellen chemischen als auch der HPF/FS-Fixierung aufgreift, wurde in neuesten Analysen die indirekte Flugmuskulatur von *D. melanogaster* fixiert und betrachtet (Dhanyasi et al., 2015). Diese Studien zeigen, dass vor der Integration der FCMs mehrere Kontaktstellen zwischen FCs/wachsenden Myotuben und FCMs zu sehen sind. Es bilden sich mehrere kleine Fusionsporen. Die Weitung dieser Poren führt schließlich zur eigentlichen Fusion (Dhanyasi et al., 2015).

Ein Vergleich auf ultrastruktureller Ebene zwischen den Kontaktstellen der Myoblasten von *D. melanogaster* mit den Kontaktstellen zwischen Epithelzellen und in der excitatorischen Synapse im Gehirn der Ratte zeigte, dass an diesen Zellkontakten elektronendichte Bereiche zu erkennen sind, welche sich strukturell ähneln (Önel et al., 2014). In der Synapse sowie zwischen den Epithelzellen sind in diesen Zell-Zellkontakten Cadherine nachweisbar (Önel et al., 2014). In *D. melanogaster* lokalisiert N-Cadherin während der fusionsrelevanten Stadien an den Membranen der Myoblasten (Dottermusch-Heidel et al., 2012) Neueste Studien deuten überdies darauf hin, dass auch die elektronendichten Bereiche während der Myoblastenfusion N-Cadherin enthalten könnten (Hamp et al., revised version).



## 2.10 Cadherine vermitteln Zell-Zelladhäsionen

Zusätzlich zu den Proteinen der Immunoglobulin-Superfamilie übernehmen auch Cadherine eine Funktion bei der Zell-Zelladhäsion in unterschiedlichen Geweben. In sogenannten „Adherens Junctions“ werden Cadherine auf der Membran benachbarter Zellen exprimiert (Harris und Tepass, 2010-b; Yonemura, 2011; Maître und Heisenberg, 2013). Die Superfamilie der Cadherine lässt sich unterteilen in klassische Cadherine, wie zum Beispiel E- und N-Cadherin, und nicht-klassische oder atypische Cadherine, wie Flamingo, Dachsous, Fat und die Protocadherine (Harris und Tepass, 2010-b; Brasch et al., 2012). Charakteristisch für die Cadherine sind mindestens zwei Cadherinrepeats sowie eine konservierte cytoplasmatische Domäne (Harris und Tepass, 2010-b; Brasch et al., 2012; Dufour, 2013). Bei Calcium-abhängigen Cadherinen, wie zum Beispiel dem N-Cadherin, bilden die extrazellulären Cadherinrepeats Bindetaschen für Calciumionen (Aberle et al., 1996). Cadherine gehen homophile Interaktionen ein. Der Abstand zwischen zwei Bindungen liegt dabei zwischen 32 und 44 nm, abhängig davon wie viel Cadherin auf der Membran vorhanden ist (Sivasankar, 1999). In Vertebraten konnte gezeigt werden, dass sich durch die Bindung an p120 Catenin und  $\beta$ -Catenin, welche durch die cytoplasmatische Domäne vermittelt wird, ein Cadherin-Catenin Komplex bildet. Dieser Komplex kann  $\alpha$ -Catenin rekrutieren, welches die Verbindung zum Aktincytoskelett herstellt (Abb. 2.6; Yonemura, 2011). Mittels Endocytose können Cadherine internalisiert und damit die Adherens Junctions remodelliert werden (Harris und Tepass, 2010-b). Zudem wurde auch eine laterale Bewegung der Cadherin-Catenin Komplexe entlang der Membran diskutiert (Goldenberg und Harris, 2013).

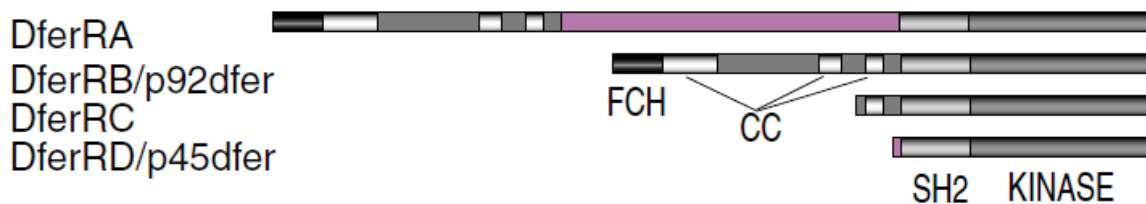


**Abb. 2.6: Aufbau von Adherens Junctions.** Cadherine können an p120 Catenin und  $\beta$ -Catenin binden und dadurch  $\alpha$ -Catenin rekrutieren, über welches die Verbindung zum Aktincytoskelett hergestellt wird. (Modifiziert nach Setyawati et al., 2013).

## 2.11 Die nicht-Rezeptor Tyrosinkinase Fer ist in Vertebraten an der Regulation der Adherens Junctions beteiligt

Cadherin-vermittelte Adherens Junctions sind dynamisch und können während der Entwicklung ab- und wieder neu aufgebaut werden (Harris und Tepass, 2010-b). In Vertebraten wurde die Beteiligung einer nicht-Rezeptor Tyrosinkinase an der indirekten Regulation der N-Cadherin-vermittelten Adhäsion beschrieben (Xu et al., 2004). Fps (Fujinami poultry sarcoma) und Fes (Feline sarcoma) wurden als erstes in Vögeln und Katzen beschrieben. Isoliert wurden die beiden Proteine dabei als Onkogene aus Tumor-auslösenden Retroviren (Katzen et al., 1991; Greer, 2002). In Vertebraten besitzt Fps/Fes eine N-terminale FCH (Fps/Fes/Fer/CIP4 Homologie)-Domäne, 3 vorhergesagte Coiled Coil-Domänen, eine zentrale SH2-Domäne sowie die C-terminale Kinasedomäne (Greer, 2002). Die FCH-Domäne wurde als homologe Region zwischen den Phosphotyrosinkinasen Fps, Fes und Fer sowie dem Cdc42-interagierenden Protein (CIP4) beschrieben und ist an der Regulation von Umgestaltungen des Cytoskeletts, Vesikeltransport und Endocytose beteiligt. Außerdem ist die N-terminale Domäne auch an der Bindung zur Coiled Coil Domäne von p120 Catenin beteiligt (Greer, 2002). Fer spielt möglicherweise unterschiedliche Rollen bei der Regulation der Adhäsionsstärke in Adherens Junctions (El Sayegh et al., 2005). Mittels Regulation von Aktinpolymerisation sowie Umgestaltungen des Aktincytoskeletts kann Fer eventuell während der frühen Phase der Kontaktbildung die Mobilität von N-Cadherin beeinflussen. Eine Phosphorylierung von Cortactin durch Fer scheint eine schnellere Vergrößerung der Adhäsionszone zwischen den Zellen zu ermöglichen, was zu einer Erhöhung der Adhäsionsstärke führt. Bei diesem Vorgang reguliert N-Cadherin scheinbar die Phosphorylierung von Fer und erhöht dadurch dessen Aktivität (El Sayegh et al., 2005). Auch die Dephosphorylierung von  $\beta$ -Catenin wird durch Fer induziert (El Sayegh et al., 2005). An diesem Prozess ist auch die nicht-Rezeptor Tyrosinphosphatase PTP1B beteiligt (Xu et al., 2004). Im phosphorylierten Zustand bindet PTP1B direkt an die cytoplasmatische Domäne von N-Cadherin und vermittelt zudem die Dephosphorylierung von  $\beta$ -Catenin, was zu einer Stärkung der Adhäsion führt. Phosphoryliert wird PTP1B von Fer, eine redundante Wirkung mit anderen Kinasen oder Wachstumsfaktoren kann jedoch nicht ausgeschlossen werden (Xu et al., 2004). Eine Aktivierung oder Überexpression von Fer führt hingegen zu einer Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin und dadurch zu einer Störung der Interaktion mit  $\alpha$ -Catenin (Murray et al., 2006).

In *D. melanogaster* konnte nur ein Mitglied der Fes/Fer Familie identifiziert werden, Dfer oder Fps85D (Murray et al., 2006). Insgesamt wurden vier Isoformen beschrieben, welche sich in ihrer Größe und den vorhandenen Domänen unterscheiden (Abb. 2.7). Die längste Isoform DferRA/p100dfer (Murray et al., 2006) unterscheidet sich von der Isoform DferRB/p92dfer (Katzen et al., 1991; Paulson et al., 1997) durch ein zusätzliches Exon. DferRC beinhaltet nur die dritte Coiled Coil Domäne sowie die SH2- und die Kinasedomäne und die vierte Isoform, DferRD/p45dfer, besitzt neben dem C-Terminus nur eine stark verkürzte N-terminale Domäne. Allerdings gibt es Zweifel über die Existenz dieser kürzesten Isoform (Murray et al., 2006).



**Abb. 2.7:** Übersicht der in *D. melanogaster* beschriebenen Isoformen von Fps85D/Dfer. (Murray et al., 2006).

Die Expression von *dfer* ist zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung in verschiedenen Geweben wie zum Beispiel dem Mesoderm, Testes und dem zentralen Nervensystem nachweisbar, frühestens jedoch ab dem späten zellulären Blastoderm (Katzen et al., 1991). Bislang wurde in *D. melanogaster* lediglich eine Funktion während des Dorsalschlusses für Dfer beschrieben (Murray et al., 2006).

## 2.12 N-Cadherin ist ein Interaktionspartner von Schizo und muss während der Myoblastenfusion endocytiert oder von der Membran abgebaut werden

### 2.12.1 Schizo interagiert mit N-Cadherin

Bisher ist nicht bekannt, wie der Auf- und Abbau der N-Cadherin-vermittelten Zell-Zellkontakte während der Myoblastenfusion in *D. melanogaster* reguliert wird. Die Notwendigkeit einer nahezu Protein-freien Kontaktstelle vor der Fusion deutet jedoch darauf hin, dass N-Cadherin endocytiert wird (Dottermusch-Heidel et al., 2012). Ein Protein, welches im Zusammenhang mit der Internalisierung von N-Cadherin steht, ist der GEF Schizo/Loner (Dottermusch-Heidel et al., 2012). Dieser wurde bereits als wichtiger Faktor während der Myogenese von *D. melanogaster* beschrieben (Chen et al., 2003). Von Schizo gibt es mindestens zwei Isoformen mit je drei konservierten Domänen. Neben dem N-terminalen Calmodulin-bindenden IQ-Motiv und der zentralen Sec7-Domäne besitzt

Schizo noch eine Pleckstrin Homology (PH) Domäne (Önel et al., 2004). Rettungsexperimente deuten darauf hin, dass Schizo sowohl in FCs als auch in FCMs benötigt wird. Mittels immunhistochemischem Nachweis des Zelladhäsionsproteins Duf konnte zudem gezeigt werden, dass die Zelladhäsion in *schizo*-Mutanten nicht gestört ist (Dottermusch-Heidel et al., 2012). In einem globalen Hefe-Zwei Hybrid Screen und einem genetischen Modifier Screen im Auge von *D. melanogaster* konnte N-Cadherin als Interaktionspartner von Schizo identifiziert werden. Mithilfe weiterer Interaktionstests wurde die interagierende Region von Schizo auf einen N-terminalen Bereich von 2,3 Kilobasen (kB) Größe eingeschränkt (Dottermusch-Heidel et al., 2012).

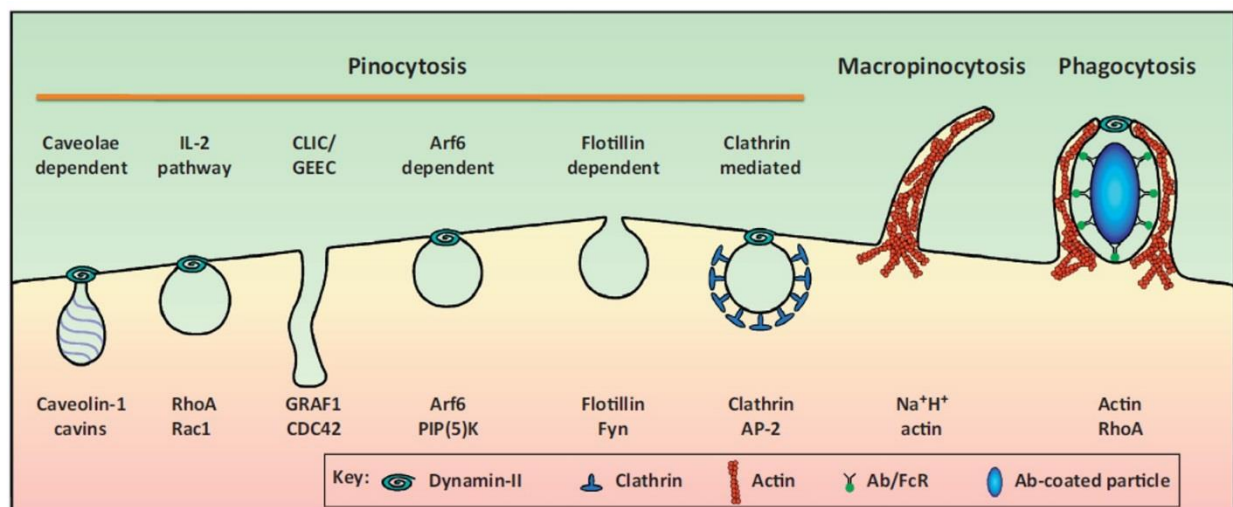
### 2.12.2 Schizo vermittelt die Internalisierung von N-Cadherin

Im Vergleich zu einem starken Fusionsdefekt der *schizo*-Mutante zeigt die *N-cadherin* Nullmutante keine Muskeldefekte. Auch eine mögliche Redundanz mit dem homologen Gen *N-cadherin2* sowie dem dritten klassischen Cadherin in *D. melanogaster*, *shotgun*, konnte durch die Analyse von Doppelmutanten ausgeschlossen werden (Dottermusch-Heidel et al., 2012). Erstaunlicherweise ist bei einer *N-cadherin;schizo* Doppelmutante eine Abschwächung des *schizo*-mutanten Phänotyps zu beobachten, da vereinzelt die Bildung mehrkerniger Muskeln erkennbar ist. Schizo scheint während der Myoblastenfusion als negativer Regulator von N-Cadherin zu wirken und ist wahrscheinlich an dessen Internalisierung beteiligt (Dottermusch-Heidel et al., 2012). Entgegen früherer Untersuchungen aktiviert Schizo dabei jedoch nicht ADP-ribosylation factor 6 (Arf6) (Chen et al., 2003), sondern ADP-ribosylation factor 1 (Arf1) (Dottermusch-Heidel et al., 2012). *N-cadherin;arf1dn* Doppelmutanten haben dünnere Muskeln, fehlende Muskeln oder Defekte bei der Anheftung. In transfizierten *Drosophila* S2 Zellen konnte zudem eine co-Lokalisation zwischen Schizo und Arf1 sowie Schizo und N-Cadherin beobachtet werden. Erste Versuche den an der Internalisierung von N-Cadherin beteiligten Endocytoseweg zu identifizieren weisen darauf hin, dass Makropinocytose bei diesem Prozess keine Rolle spielt. Zudem konnte keine co-Lokalisation mit Rab5, dem Marker für frühe Endosomen beobachtet werden. Eine mögliche Beteiligung weiterer Endocytosewege ist jedoch noch unklar (Dottermusch-Heidel et al., 2012).

In Vertebraten vermittelt das Schizo Ortholog Brag2 die Endocytose von  $\beta$ 1-Integrin während der Migration von Endothelzellen und der Angiogenese durch die Aktivierung der Arf-GTPasen Arf5 und Arf6 (Manavski et al., 2014). Außerdem ist Brag2 an weiteren Transportprozessen wie der Endocytose von synaptischen AMPA-Rezeptoren, dem Recycling von E-Cadherin und der Phagozytose von Monozyten beteiligt (Manavski et al., 2014).

### 2.13 Bei der Internalisierung von Proteinen können unterschiedliche Endocytosewege eine Rolle spielen

Proteine, die aufgrund ihrer Größe die Membran nicht selbstständig überwinden können, werden mithilfe unterschiedlicher Endocytosemechanismen in die Zelle transportiert. Dabei kann zwischen verschiedenen Transportwegen unterschieden werden (El-Sayed und Harashima, 2013; Mercer und Greber, 2013). Partikel, die eine Größe von wenigen Mikrometern haben, werden mittels Phagozytose in die Zellen aufgenommen. Flüssigkeiten, die Partikel im Nanobereich enthalten, können durch Pinocytose aufgenommen werden. Weitere Unterscheidungsmerkmale bei der Pinocytose sind die Beteiligung von Dynaminen, des Coatingproteins Clathrin oder die Abhängigkeit von sogenannten Lipid Rafts (Abb. 2.8). Lipid Rafts bezeichnen einen 10-200 nm großen Membranbereich, der vermehrt Sterol- und Sphingolipid-reiche Regionen umfasst. Hierbei sind Sphingolipide mit Cholesterol assoziiert. Diese Lipidcluster sind heterogen und sehr dynamisch (El-Sayed und Harashima, 2013).



**Abb. 2.8 Überblick der unterschiedlichen Endocytosewege und der daran beteiligten Proteine.** Kleinere Proteine werden mittels Pinocytose aufgenommen, größere durch Macropinocytose oder Phagozytose. (Mercer und Greber, 2013).

Das Coatingprotein Clathrin ist ein lösliches, intrazelluläres Protein, welches vom Cytosol zur Zellmembran rekrutiert wird. Dort bildet sich eine Clathrin-umhüllte Einschnürung, aus der sich im weiteren Verlauf ein Clathrin-umhülltes Vesikel abschnürt. Die Umhüllung wird im Cytosol recycelt und die Vesikel fusionieren mit frühen Endosomen (Doherty und McMahon, 2009; El-Sayed und Harashima, 2013; Mulcahy et al., 2014). Bei der Clathrin-vermittelten Endocytose erfolgt eine Erkennung der cytoplasmatischen Domänen der zu internalisierenden Proteine mithilfe von

Adapterproteinen (AP 2). Zudem wird für die Abschnürung der Vesikel meist Dynamin benötigt (Grant und Donaldson, 2009).

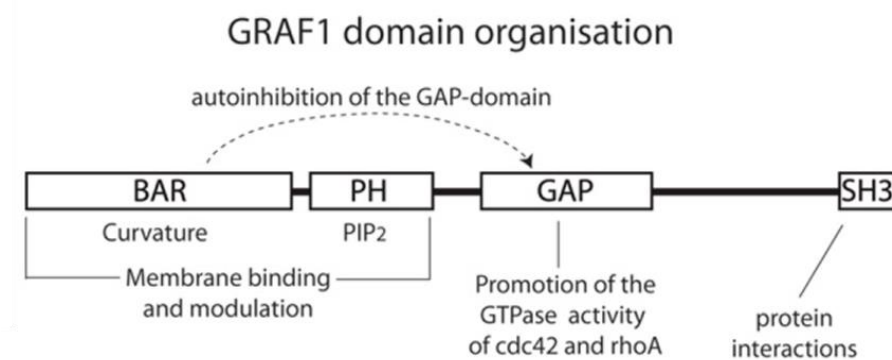
Zu den Clathrin-unabhängigen Mechanismen gehören unter anderem auch die Makropinocytose sowie die Phagozytose (Grant und Donaldson, 2009). Die aufgenommenen Vesikel werden normalerweise zu den frühen Endosomen transportiert, in denen die Inhalte sortiert und entweder zum trans-Golgi-Netzwerk (TGN) oder zurück an die Membran gebracht werden. Eine weitere Möglichkeit ist der Weg über späte Endosomen zu sogenannten Lysosomen, in denen die Degradierung der Proteine stattfindet (Grant und Donaldson, 2009). Sowohl die Makropinocytose als auch die Phagozytose erfordern eine Umgestaltung des Aktincytoskeletts und somit die Aktivität von Aktinnukleatoren für die Aufnahme (Doherty und McMahon, 2009). Auch bei der Clathrin-abhängigen Endocytose wurde die Beteiligung von Aktin beschrieben (McMahon und Boucrot, 2011). Die Caveolin-abhängige Endocytose, bei welcher das Protein Caveolin für die Bildung der Vesikel benötigt wird, gehört zu den Clathrin-unabhängigen Mechanismen, ist jedoch Dynamin-abhängig (Doherty und McMahon, 2009; Grant und Donaldson, 2009; Mulcahy et al., 2014). Für die Internalisierung des Interleukin 2 Rezeptors (IL2R) werden die GTPasen RhoA und Rac1 benötigt, bei der Flotillin-abhängigen Endocytose ist eine Beteiligung von GTPasen noch unklar (Doherty und McMahon, 2009). Auch Arf6 ist an Endocytoseprozessen beteiligt, hauptsächlich an der Internalisierung von Membranproteinen und Proteinen, welche von den cytoplasmatischen Adapterproteinen nicht erkannt werden (Grant und Donaldson, 2009).

Proteine, welche mittels Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI) an der Membran lokalisiert sind, werden meist mithilfe eines Clathrin- und Dynamin-unabhängigen Prozesses aufgenommen. Cdc42 vermittelt dabei die Aufnahme dieser Proteine in sogenannte CLICs/GEECs (Clathrin-independent carriers/GPI-anchored protein enriched early endosomal compartments) (Doherty und Lundmark, 2009; Chi et al., 2013). Neben Cdc42 kann auch Arf1 eine Funktion bei diesem Transportweg übernehmen (Doherty und Lundmark, 2009). Bei den in Vertebraten während der CLIC/GEEC Endocytose beobachteten Einschnürungen scheint es sich um tubuläre Strukturen zu handeln. In diesem Zusammenhang wurde auch eine Beteiligung des Proteins Graf1 (GTPase regulator associated with focal adhesion kinase-1) beschrieben (Doherty und McMahon, 2009).

#### **2.14 Graf1 wird in *Mus musculus* während der Muskelentwicklung benötigt**

Mittels Experimenten in murinen C2C12 Zellen und der Analyse einer neuen Mausmutante konnte gezeigt werden, dass Graf1 für die Fusion der Myoblasten während der Entwicklung sowie für die Regeneration des Muskels nach einer Verletzung benötigt wird (Lenhart et al., 2014). Graf1 lokalisiert

dabei an der Kontaktstelle der fusionierenden Myoblasten. Außerdem konnte eine Co-Lokalisation mit Rab5, einem Marker für frühe Endosomen, und dem GPI-gebundenen Membranprotein Thy-1 beobachtet werden. Thy-1 wird mittels Endosomen zum Golgi transportiert, recycelt und zurück zur Plasmamembran gebracht (Lenhart et al., 2014). In Graf-depletierten Zellen konnte eine erhöhte Aktivität der RhoA-GTPase beobachtet werden. Graf1 reguliert wahrscheinlich die Differenzierung der Skelettmuskeln mittels Limitierung des Rho/ROCK Signalweges (Doherty et al., 2011). Graf1 besteht aus einer N-terminalen BAR-, einer PH- und GAP-Domäne sowie einer C-terminalen SH3-Domäne (Abb. 2.9; Doherty und Lundmark, 2009). Eine Autoinhibition von Graf1 erfolgt durch die direkte und spezifische Interaktion der N-terminalen BAR-Domäne mit der GAP-Domäne. Zudem kann die BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs)-Domäne an die Membran binden und dadurch eine lokale Krümmung auslösen (Eberth et al., 2009; Doherty et al., 2011). Für die in Endocytoseprozessen anschließende Vesikulierung der Membran ist die GAP-Domäne essentiell (Cai et al., 2014).



**Abb. 2.9: Proteinstruktur von Graf1.** In Vertebraten besitzt Graf1 eine N-terminale BAR-Domäne und eine PH-Domäne, welche zusammen die Krümmung der Membran vermitteln, eine GAP-Domäne zur Förderung der GTPase-Aktivität von Cdc42 und RhoA sowie eine SH3-Domäne, welche für weitere Proteininteraktionen essentiell ist (Doherty und Lundmark, 2009).

## 2.15 Zielsetzung

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass der Arf1-GEF Schizo vermutlich die Endocytose des auf den Membranen der Myoblasten lokalisierenden Transmembranproteins N-Cadherin vermittelt. Diese Internalisierung von N-Cadherin scheint für die Myoblastenfusion essentiell zu sein, da die Zellmembranen dadurch in den für die Fusion und die Bildung einer Fusionspore benötigten direkten Kontakt gebracht werden können (Dottermusch-Heidel et al., 2012). Um diese Vermutung zu bestätigen, sollte zunächst überprüft werden, ob in der *schizo*-Mutante Fusionsporen ausgebildet werden.

Der an der Internalisierung von N-Cadherin beteiligte Endocytoseweg konnte bislang noch nicht identifiziert werden (Dottermusch-Heidel et al., 2012). Deshalb sollten im Rahmen dieser Arbeit weitere Hinweise auf den am Abbau von N-Cadherin beteiligten Endocytosemechanismus gewonnen werden. Dafür wurde eine mögliche Beteiligung von Proteinen untersucht, welche bei verschiedenen Transportwegen eine Rolle spielen. Dazu gehören die Dynamine sowie Cdc42 und Graf. Weiterhin sollte auch geklärt werden, wie eine Verbindung zwischen N-Cadherin und dem Aktincytoskelett oder den Aktinnukleatoren hergestellt werden könnte, um die für die Endocytose benötigte Aktinpolymerisation zu initiieren.

Auch die Regulation der N-Cadherin-vermittelten Adherens Junctions durch eine mögliche Stabilisierung oder Destabilisierung des Proteins an der Membran wurde näher analysiert. Im Zusammenhang mit diesem Prozess wurde die Rolle der nicht-Rezeptor Tyrosinkinase Fps85D untersucht.



### 3. Material

#### 3.1 Verwendete Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Herstellern bezogen:

AppliChem GmbH, Darmstadt

Beckton, Dickinson and Company, Heidelberg

Boehringer, Mannheim

Fluka, Neu-Ulm

Life Technologies, Darmstadt

Merck, Darmstadt

Roche, Mannheim

Roth, Karlsruhe

Sigma-Aldrich, Steinheim

#### 3.2 Verwendete Geräte

##### 3.2.1 Mikroskope

Binokulare „Stemi SV6“ Zeiss, Jena

Floureszenzmikroskop „AxioPlan2 mit AxioCam MRm“ Zeiss, Jena

Inverses Mikroskop „AxioPhot Observer Z1“ Zeiss, Jena

Konfokales Laserscannmikroskop „TCS SP2“ Zeiss, Solms

##### 3.2.2 Sonstige Geräte

Elektrophoreseapparaturen Werkstatt Philipps-Universität  
Marburg

Kühlzentrifuge Heraeus Fresco17 Thermo Fisher Scientific Germany BV  
& Co. KG, Braunschweig

Kühlzentrifuge Universal 320R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
NanoDrop 2000 Spectrophotometer	Waltham, MA
PCR-Maschine Primus 25 advanced	PeqLab, Erlangen
Personal Thermocycler	Biometra, Göttingen
pH-Meter GPRT 1400A	Greisinger Electron, Regenstauf
Photometer GeneQuant 1300 Photometer	GE Healthcare, Deutschland
Schüttler GFL 3016	Biometra, Göttingen
Spannungsquelle Biostep MP-300V	biostep GmbH, Jahnsdorf
Tischzentrifugen Hereaus Pico17	Thermo Fisher, Osterode
Vortexiergerät Mixer Uzusio VTX-3000L	LLG, Tokyo
Wasserbad GFL 1002	Biometra, Göttingen
Zentrifuge Perfect Spin 24	PeqLab, Erlangen

### 3.3 Verwendete Enzyme

AccuPrime Taq-DNA-Polymerase	Life Technologies, Darmstadt
Gateway® LR Clonase™ II Enzym Mix	Life Technologies, Darmstadt
Proteinase K	AppliChem, Darmstadt
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, Heidelberg
	New England Biolabs, Frankfurt am Main
RNase A	Sigma-Aldrich, Steinheim
Taq-DNA-Polymerase	Axon Laboratories, Kaiserslautern
	PeqLab, Erlangen

### 3.4 Verwendete Kits und Sonstiges

Dan Klorix	Colgate, Palmolive, Hamburg
Flouromount-G™	Biozol, Eching
FuGENE® HD Transfection Reagent	Promega, Mannheim
JETsorb Kit (Gelelution)	Genomed, Bad Oeynhausen
JETstar Plasmid Midiprep Kit	Genomed GmbH, Löhne
2-Log DNA Ladder	New England BioLabs, Frankfurt am Main
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren
Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3	Clontech Laboratories, CA
TOPO® TA Cloning® Kit	Life Technologies, Darmstadt
pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kit	Life Technologies, Darmstadt
Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit	Life Technologies, Darmstadt

### 3.5 Antibiotika und Stocklösungen

	Konzentration der Stocklösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin (Amp)	100 mg/ml Amp in 70 % EtOH	100 µg/ml
Chloramphenicol (Chl)	34 mg/ml in 70 % EtOH	175 µg/ml
Ethidiumbromid	10 mg/ml	2 µl/100 ml
Kanamycin (Kan)	50 mg/ml Kan in H <sub>2</sub> O	50 µg/ml
Lachssperma-DNA	10 mg/ml in 0,05 M Tris/HCl pH 8,0, Denaturierung für 10 min bei 99 °C	
Proteinase K	20 mg/ml	

RNase	50 mg/ml
X- $\alpha$ -Gal	20 mg/ml in 100 % DMF

### 3.6 Verwendete Puffer und Lösungen

1 % Agarosegel in TBE	1 % (w/v) Agarose in 1x TBE aufkochen und lösen, mit 2 $\mu$ l/100 ml Ethidiumbromid versetzen
10x DNA Auftragspuffer	0,1 % (w/v) Xylencylanol 0,1 % (w/v) Bromphenolblau 80 % Glycerin 10 % 10x TBE
dNTP-Mix	10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP
E1-Resuspensionspuffer	50 mM Tris/HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA 100 $\mu$ g/ml RNase
E2-Lysepuffer	200 mM NaOH 1 % SDS
E3-Neutralisierungspuffer	3,1 M KAc, mit Essigsäure auf pH 5,5 einstellen
E4-Äquilibrierungspuffer	600 mM NaCl 100 mM NaAc 0,15 % TritonX-100, mit Essigsäure auf pH 5,0 einstellen
E5-Waschpuffer	800 mM NaCl 100 mM NaAc, mit Essigsäure auf pH 5,0 einstellen
E6-Elutionspuffer	1,5 M NaCl 100 mM NaAc, mit Essigsäure auf pH 5,0 einstellen

4 % F-PBS	4 % Paraformaldehyd in 1x PBS, bei 60°C lösen
Lysispuffer für S2 Zellen	1 % Triton-X100 1 mM PMSF 1 mM DTT Protease Inhibitor gelöst in PBS
10 x PBS	130 mM NaCl 7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 3 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1x PBT	0,1 % Tween20 in PBS
RF I	100 mM RbCl 50 mM MnCl <sub>2</sub> 30 mM KAc 10 mM CaCl <sub>2</sub> 15 % Glycerin mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen
RF II	10 mM MOPS 75 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM RbCl 15 % Glycerin mit NaOH auf pH 6,8 einstellen
10x TBE	89 mM Tris/HCl (pH 8,2) 89 mM Borsäure 2 mM EDTA

10x TE	0,1 M Tris/HCl (pH 7,5)
	10 mM EDTA

### 3.7 Verwendete Medien und Platten

#### 3.7.1 Nähr- und Zuchtmedien für *Drosophila melanogaster*

Fruchtsaftagar	25 % (w/v) Apfel- oder Traubensaft
	1,25 % (w/v) Saccharose
	0,2 % (w/v) Nipargin
	2,7 % Select Agar
Maismehlagar	60 % (w/v) Maismehl
	7,15 % (w/v) Fructose
	1,2 % (w/v) Trockenhefe
	60 % (w/v) Malzextrakt
	0,14 % (w/v) Nipargin
	0,7 % Select Agar
	0,6 % (w/v) Propionsäure
Schneiderzellmedium	Gibco <i>D. melanogaster</i> Medium
	5 mg/ml Penicillin/Streptomycin
	10 % FCS (hitzeinaktiviert)

#### 3.7.2 Nähr- und Zuchtmedien für *Escherichia coli*

LB-Medium (Luria-Bertani)	1 % (w/v) Baktotrypton
	0,5 % (w/v) Hefeextrakt
	0,5 % (w/v) NaCl
	2 % (w/v) Bacto-Agar für LB-Platten

### 3.7.3 Nähr- und Selektionsmedien für *Saccharomyces cerevisiae*

YPDA Medium	5 % (w/v) YPD-Broth 0,003 % Adenin Hemisulfat
YPDA Platten	5 % (w/v) YPD-Broth 0,003 % Adenin Hemisulfat 2 % (w/v) Select Agar
Selektionsplatten	6,7 g/l Yeast nitrogene base
SD -His/ -Leu/ -Trp	10 % (v/v) 10x Dropout Lösung 10 % (v/v) 10x Adenin 2 % (v/v) Glucose 2 % (w/v) Select Agar
Induktionsplatten	6,7 g/l Yeast nitrogene base
SD -Ade/ -Leu/ -His/ -Trp	10 % (v/v) 10x Dropout Lösung 2 % (v/v) Glucose 20 mg/ml X- $\alpha$ -Gal 2 % (w/v) Select Agar

### 3.8 Verwendete Zellkulturlinie (*Drosophila melanogaster*)

SL2	Schneider's <i>Drosophila melanogaster</i> line 2 cells etabliert aus OregonR Embryonen (Schneider, 1972)
-----	--

### 3.9 Verwendete Bakterienstämme (*Escherichia coli*)

DH5 $\alpha$	<i>supE44, <math>\Delta</math>lacU169 (<math>\Phi</math>80lacZ <math>\Delta</math>M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i> chemischkompetenter Klonierungsstamm
--------------	--

### 3.10 Verwendeter Hefestamm

AH109      *MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 ::*  
*GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3, GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2, URA3 ::*  
*MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ* (James et al., 1996)  
 Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3, (Clontech Laboratories, CA)

### 3.11 Verwendete Antikörper

Die eingesetzten Verdünnungen sowie die Herkunft der primären und Sekundären Antikörper sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

**Tabelle 3.1: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper.**

Antikörper	Verdünnung	Herkunft	Referenz
<b>Primäre Antikörper</b>			
anti-β3-Tubulin	1:10000	Meerschweinchen	Buttgereit et al., 1996
anti-β-Galactosidase	1:3000	Kaninchen	Cappel, Hamburg
anti-CadN	1:500	Ratte	Iwai et al., 1997, Hybridoma Bank, Iowa DN-Ex #8
anti-GFP	1:1000	Kaninchen	Abcam, Cambridge ab6556
anti-HA. 11 (16B12)	1:1000	Maus	Covance, Münster
anti-Myc	1:300	Ziege	Abcam, Cambridge ab19234
anti-Rab5	1:200	Kaninchen	Abcam, Cambridge ab31267
anti-RFP (5F8)	1:500	Ratte	ChromoTek GmbH, Planegg-Martinsried



**Sekundäre Antikörper**

anti-Kaninchen Cy2/Cy3/Cy5	1:300	Ziege	Dianova, Hamburg
anti-Maus Cy2/Cy3/Cy5	1:300	Ziege	Dianova, Hamburg
anti- Meerschweinchen Cy2/Cy3/Cy5	1:300	Ziege	Dianova, Hamburg
anti-Ratte Cy2/Cy3/Cy5	1:300	Ziege	Dianova, Hamburg
anti-Ziege Cy5	1:300	Kaninchen	Dianova, Hamburg

**3.12 Verwendete cDNAs**

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten cDNAs wurden von Berkeley *Drosophila* Genome Project (BDGP, Berkeley, CA) bezogen.

**Tabelle 3.2: Übersicht der verwendeten cDNAs und Matrizen.**

Gen	cDNA	Vektor	Referenz
Abi	LD37010	pOT2	Rubin et al., 2000
Arf1		pUAS <sub>t</sub> -attB- <i>rfa</i> -eGFP	C. Dottermusch
Arf1 <sup>Q71L</sup>		pUAS <sub>t</sub> -attB- <i>rfa</i> -eGFP	C. Dottermusch
Cdc42	HL08128	pOT2	Rubin et al., 2000
Dia	LD14246	pBluescript_SK(-)	Rubin et al., 2000
Dock	LD42588	pOT2	Rubin et al., 2000
Drp1	AT04516	pOTB7	Stapleton et al., 2002
Fps85D	RH14840	pFLC-I	Stapleton et al., 2002
Graf	LD28528	pOT2	Rubin et al., 2000

N-Cadherin	pBluescript_SK(-)	Iwai et al, 1997
Schizo	pUAS <sub>t</sub> -attB- <i>rfa</i> -eGFP	Dissertation V. Groth, 2011

### 3.13 Verwendete Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins Genomics, Ebersberg bezogen. Die für die PCR verwendeten Primer sind in Tabelle 3.5 aufgelistet.

#### Vektorspezifische Sequenzierungsprimer

M13 fw (Topo®)	GTAAAACGACGGCCAG
M13 rv (Topo®)	CAGGAAACAGCTATGAC
T7 (pGADT7/pGBKT7)	TAATACGACTCACTATAGGGC
pUA3EC (pUAS <sub>t</sub> )	CTGCAACTACTGAAATCTGCC
pUA5XB (pUAS <sub>t</sub> )	TCTCTGTAGGTAGTTTGTC

### 3.14 Vektoren und Konstrukte

Tabelle 3.3: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Vektoren.

Vektor	Größe	Beschreibung	Referenz
<b>Expressionsvektoren</b>			
pUAS <sub>t</sub> -C-YFP	9,2 kb	enthält das C-terminale Fragment von Venus YFP und einen Myc-Anhang	Dissertation V. Groth, 2011
pUAS <sub>t</sub> -attB- <i>rfa</i> -eGFP	10,9 kb	verwendet zur Generierung von Fusionsproteinen mit C-terminalem eGFP	S. Bogdan, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

pUAS <sub>t</sub> -attB-rfa-mCherry	10,9 kb	verwendet zur Generierung von Fusionsproteinen mit C-terminalem mCherry	S. Bogdan, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
pUAS <sub>p</sub> -attB-rfa-Myc	11,6 kb	verwendet zur Generierung von Fusionsproteinen mit C-terminalem Myc	S. Bogdan, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
pUAS <sub>t</sub> -N-YFP	9,4 kb	enthält das N-terminale Fragment von Venus YFP und einen HA-Anhang	Dissertation V. Groth, 2011

### Klonierungsvektoren

pCR <sup>®</sup> -Blunt II-TOPO <sup>®</sup>	3,5 kb	verwendet zur Klonierung von PCR-Produkten mit glatten Enden, Kanamycin Resistenz	Life Technologies, Darmstadt
pENTR <sup>™</sup> /D-TOPO <sup>®</sup>	2,5 kb	verwendet zur Klonierung von PCR-Produkten mit N-terminalem cacc-Überhang, zur Gateway <sup>®</sup> Klonierung, Kanamycin Resistenz	Life Technologies, Darmstadt
pCR2.1 <sup>™</sup> -TOPO <sup>®</sup> TA	3,9 kb	verwendet zur Klonierung von PCR-Produkten mit 3' überhängenden Desoxyadenosinenden, Ampicillin Resistenz	Life Technologies, Darmstadt

### Hefektoren

pGADT7	8 kb	enthält die Gal4 Aktivierungsdomäne und einen HA-Anhang, <i>LEU2</i> Auxotrophie Marker, Ampicillin Resistenz	Matchmaker <sup>™</sup> GAL4 Two-Hybrid System 3, Clontech
--------	------	---	--

pGBKT7	7,3 kb	enthält die Gal4 DNA-Bindedomäne und einen c-Myc-Anhang, <i>TRP1</i> Auxotrophie Marker, Kanamycin Resistenz	Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3, Clontech
--------	--------	--	--

**Tabelle 3.4: Verwendete Konstrukte, die im Rahmen anderer Arbeiten generiert wurden.**

Konstrukt	Beschreibung	Referenz
<b>BiFC-Konstrukte</b>		
pUAS <sub>t</sub> -N-YFP- <i>cadN</i> <sup>TM<sub>intra</sub></sup>	Fusionsprotein zwischen N-YFP und der transmembran- und intrazellulären Domäne von N-Cadherin	Dissertation V. Groth, 2011
pUAS <sub>t</sub> - <i>dock</i> CYFP	Fusionsprotein zwischen C-YFP und dem gesamten offenen Leserahmen von <i>dock</i>	Masterarbeit J. Hamp, 2012
pUAS <sub>t</sub> -C-YFP- <i>schizo</i> 2.3	Fusionsprotein zwischen C-YFP und den N-terminalen 2,3 kb von <i>schizo</i>	Dissertation V. Groth, 2011
<b>Gateway Konstrukte</b>		
pUAS <sub>t</sub> -attB- <i>arf1</i> -eGFP	Fusionsprotein des gesamten offenen Leserahmens von <i>arf1</i> und C-terminalem eGFP	C. Dottermusch
pUAS <sub>t</sub> -attB- <i>arf1</i> <sup>Q71L</sup> -eGFP	Fusionsprotein der konstitutiv aktivierten Form von <i>arf1</i> und C-terminalem eGFP	C. Dottermusch
pUAS <sub>t</sub> -attB- <i>cadN</i> <sup>TM<sub>intra</sub></sup> -eGFP	Fusionsprotein der transmembran- und intrazellulären Domäne von <i>N-Cadherin</i> und C-terminalem eGFP	Dissertation V. Groth, 2011
pUAS <sub>t</sub> -attB-mCherry- <i>graf</i>	Fusionsprotein des gesamten offenen Leserahmens von <i>graf</i> und N-terminalem mCherry	Masterarbeit J. Hamp, 2012

pUAS <sub>t</sub> -attB- <i>schizo-fl</i> -eGFP	Fusionsprotein des gesamten offenen Leserahmens von <i>schizo</i> und C-terminalem eGFP	Dissertation C. Dottermusch, 2010
---	---	---

### Hefekonstrukte

pGADT7- <i>abiB1</i>	Deletion der ersten 18 Basenpaare von <i>abi</i>	S. Bogdan, Westfälische Wilhelms- Universität Münster
pGADT7- <i>abiΔN</i>	Deletion der N-terminalen WAVE-interagierenden Domäne	S. Bogdan, Westfälische Wilhelms- Universität Münster
pGADT7- <i>abiΔSH3</i>	Deletion der SH3-Domäne	S. Bogdan, Westfälische Wilhelms- Universität Münster
pGADT7- <i>cadN<sup>intra</sup></i>	intrazelluläre Domäne von N-Cadherin	Dissertation V. Groth, 2011
pGADT7- <i>dock</i>	gesamter offener Leserahmen von <i>dock</i>	Masterarbeit J. Hamp, 2012
pGBKT7- <i>hbs</i>	gesamter offener Leserahmen von <i>hbs</i>	V. Groth
pGBKT7- <i>kette</i>	gesamter offener Leserahmen von <i>kette</i>	C. Klämbt, Westfälische Wilhelms- Universität Münster

pGBKT7-*schizo* 2.3

N-terminale 2,3 kb von *schizo*

Dissertation  
V. Groth, 2011

Tabelle 3.5: Verwendete Konstrukte, die in dieser Arbeit generiert wurden.

Konstrukt	Aminosäure-region	verwendete cDNA/ Matrize	Primer	Klonierung	Bemerkungen
<b>BiFC Konstrukte</b>					
pUAS <i>cadN</i> <sup>Mintra</sup> -C-YFP	2899-3097 aa	Iwai et al., 1997	<b>CadNiCYFPEcofw</b> GAATTCATGGGCGAGAATTG <b>CadNiCYFPrv2</b> AGATCTTCAATTCTAGTTC	EcoRI + BglII	transmembran- und intrazelluläre Domäne von N-Cadherin
pUAS-N-YFP- <i>cdc42</i> -fl	1-192 aa	HL08128	<b>Cdc42NYFPBglfw</b> AGATCTGATGCAAACCATCAAG <b>Cdc42NYFPXbarv</b> TCTAGATTATAAGAATTTGCACTT	BglII + XbaI	
pUAS-N-YFP- <i>fps85D</i> -fl	1-1326 aa	RH14840	<b>FpsNYFPXhofw</b> CTCGAGATGGGCTTCTCATC <b>FpsNYFPXbarev</b> TCTAGATTAGTGGCTGTTGTC	XhoI + XbaI	
pUAS-N-YFP- <i>graf</i> -fl	1-859 aa	LD28528	<b>GrafNYFPBglfw</b> AGATCTGATGTCAACTAAAAAGC <b>GrafNYFPXbarv</b> TCTAGACTAATGGTGCGGCTT	BglII + XbaI	

pUAS <i>t-graf</i> $\Delta$ PH-C-YFP	224-859 aa	LD28528	<b>GrafDPHCYFPfw</b> AGATCTATGCTGGCTCCCG <b>GrafCYFPAscrv</b> GGCGCGCCAATGGTGCG	BglII + AscI	Deletion der PH-Domäne
pUAS <i>t-graf</i> $\Delta$ RhoGAP $\Delta$ SH3-C-YFP	1-238 aa	LD28528	<b>GrafCYFPBglfw</b> AGATCTATGTCAACTAAAAAGCC <b>GrafDRSHCYFPrv</b> GGCGCGCCAATATGTCCG	BglII + AscI	Deletion der RhoGAP- und SH3-Domäne
pUAS <i>t-graf</i> $\Delta$ PH $\Delta$ SH3-C-YFP	224-575 aa	LD28528	<b>GrafDPHCYFPfw</b> AGATCTATGCTGGCTCCCG <b>GrafDSH3CYFPrv</b> GGCGCGCCAGGTGCC	BglII + AscI	Deletion der PH- und SH3-Domäne
pUAS <i>t-N-YFP-graf</i> $\Delta$ PH $\Delta$ SH3	224-575 aa	LD28528	<b>GrafDPHNYFPfw</b> AGATCTGCTGGCTCCCGG <b>GrafDSH3NYFPrv</b> TCTAGACTAGGTGCCCGTTG	BglII + XbaI	Deletion der PH- und SH3-Domäne
pUAS <i>t-N-YFP-graf</i> $\Delta$ SH3	1-798 aa	LD28528	<b>GrafNYFPBglfw</b> AGATCTGATGTCAACTAAAAAGC <b>GrafDSH3NYFPrv</b> TCTAGACTAGGTGCCCGTTG	BglII + XbaI	Deletion der SH3-Domäne



## Gateway Konstrukte

pUAS <sub>t</sub> -attB- <i>cdc42-fl</i> -eGFP	1-191 aa	HL08128	<b>Cdc42-gw-for</b> CACCATGCAAACCATCAAGTGCG <b>Cdc42-gw-rev</b> TAAGAATTTGCACTTCCTTTTCT	Gateway	C-terminaler eGFP-Anhang
pUAS <sub>t</sub> -attB- <i>cdc42-fl</i> -mCherry	1-191 aa	HL08128	<b>Cdc42-gw-for</b> CACCATGCAAACCATCAAGTGCG <b>Cdc42-gw-rev</b> TAAGAATTTGCACTTCCTTTTCT	Gateway	C-terminaler mCherry-Anhang
pUAS <sub>t</sub> -attB- <i>CG12006-fl</i> -mCherry	1-560 aa			Gateway	C-terminaler mCherry-Anhang
pUAS <sub>t</sub> -attB- <i>drp1-fl</i> -mCherry	1-735 aa	AT04516	<b>Drp1-fw1</b> CACCATGGAGGCCCTAATTC <b>Drp1-rev</b> CCACATGTGGGTCTCGCG	Gateway	C-terminaler mCherry-Anhang
pUAS <sub>t</sub> -attB- <i>fps85D-fl</i> -eGFP	1-1326 aa	RH14840	<b>Fps85D_Ctagf1</b> CACCCATGGGCTTCTCATCAG <b>Fps85D_r1</b> CTCGTAATCTAGACAGGACTTGG <b>Fps85D_Ctf3</b> CCAGAGCCTCGGATCCTTG <b>Fps85D-rev-Asc</b> GGCGCGCCACCCCTTGTGGCTGTTGTC	Gateway BamHI	C-terminaler eGFP-Anhang; Klonierung über mehrere Schritte

pUAS <sub>t</sub> -attB- <i>fps85D-fl</i> -mCherry	1-1326 aa	RH14840	<p><b>Fps85D_Ctagf1</b> CACCCATGGGCTTCTCATCAG</p> <p><b>Fps85D_r1</b> CTCGTAATCTAGACAGGACTTGG</p> <p><b>Fps85D_Ctf3</b> CCAGAGCCTCGGATCCTTG</p> <p><b>Fps85D-rev-Asc</b> GGCGCGCCCACCCTTGTGGCTGTTGTC</p>	Gateway BamHI	C-terminaler mCherry-Anhang; Klonierung über mehrere Schritte
pUAS <sub>t</sub> -attB- <i>fps85D-fl</i> -myc	1-1326 aa	RH14840	<p><b>Fps85D_Ctagf1</b> CACCCATGGGCTTCTCATCAG</p> <p><b>Fps85D_r1</b> CTCGTAATCTAGACAGGACTTGG</p> <p><b>Fps85D_Ctf3</b> CCAGAGCCTCGGATCCTTG</p> <p><b>Fps85D-rev-Asc</b> GGCGCGCCCACCCTTGTGGCTGTTGTC</p>	Gateway BamHI	C-terminaler Myc-Anhang; Klonierung über mehrere Schritte
pUAS <sub>t</sub> -attB- <i>myr-fps85D-fl</i> -mCherry	1-1326 aa	RH14840 LD12327	<p><b>Srcmyr-Kpnfw</b> GGTACCATGGGTAAGTGC</p> <p><b>Srcmyr-Kpnrev</b> GGTACCGGCGTTGGCAC</p> <p><b>Fps-myr-fw-Kpn</b> CACCGGTACCATGGGCTTCTCATCAGCC</p> <p><b>Fps85D_r1</b> CTCGTAATCTAGACAGGACTTGG</p>	Gateway KpnI + BamHI	N-terminale Myristoylierungs- sequenz von Src42A, C-terminaler mCherry-Anhang; Klonierung über mehrere Schritte

			<b>Fps85D_Ctf3</b> CCAGAGCCTCGGATCCTTG		
			<b>Fps85D-rev-Asc</b> GGCGCGCCACCCCTTGTGGCTGTTGTC		
pUAS <sub>attB</sub> - <i>fps85DΔSH2ΔTyr</i> -myc	1-957 aa	RH14840	<b>Fps85D_Ctagf1</b> CACCCATGGGCTTCTCATCAG	Gateway BamHI	Deletion der SH2- und Tyrosinkinase- Domäne, C-terminaler Myc-Anhang; Klonierung über mehrere Schritte
			<b>Fps85D_DSTr2</b> TCTAGAGGACGATTTGTGGAG		
pUAS <sub>attB</sub> - <i>shibireΔGEDΔPRR</i> - mCherry		LD21622	<b>Shi-fw</b> CACCGCCGCAATGGATAGT	Gateway	Deletion der GED-Domäne und Prolin-reichen Region, C-terminaler mCherry-Anhang
			<b>Shi-D-GED-rev</b> TGGATCGCTGGAACTCTCC		
pUAS <sub>attB</sub> - <i>shibireΔDynC</i> - mCherry		LD21622	<b>ShiDDyn-fw</b> CACCGATATCCACCAGGCA	Gateway	Deletion der DynC-Domäne, C-terminaler mCherry-Anhang
			<b>Shi-rev</b> CTTGAATCGCGAACTGAAGG		

## Hefekonstrukte

pGADT7- <i>abi</i>	1-474 aa	LD37010	<b>AbiY2HEcofw</b> GAATTCATGTTGACCGAAACC	EcoRI + BamHI	
			<b>AbiY2HBamrv</b> GGATCCTTAGACACAAGGCT		
pGBKT7- <i>abi</i>	1-474 aa	LD37010	<b>AbiY2HEcofw</b> GAATTCATGTTGACCGAAACC	EcoRI + BamHI	
			<b>AbiY2HBamrv</b> GGATCCTTAGACACAAGGCT		
pGADT7- <i>arf1</i> <sup>Q71L</sup>	1-474 aa	pUAS <sub>t</sub> -attB- <i>arf1</i> <sup>Q71L</sup> -eGFP	<b>Arf1-pGildaf</b> GAATTCATGGGAAACGTATTCGCGAACT TATT	EcoRI + BamHI	aktivierte Form
			<b>Arf1BamYrev</b> GGATCCTTAGCGATTAGCGT		
pGBKT7- <i>arf1</i> <sup>Q71L</sup>	1-474 aa	pUAS <sub>t</sub> -attB- <i>arf1</i> <sup>Q71L</sup> -eGFP	<b>Arf1-pGildaf</b> GAATTCATGGGAAACGTATTCGCGAACT TATT	EcoRI + BamHI	aktivierte Form
			<b>Arf1BamYrev</b> GGATCCTTAGCGATTAGCGT		
pGADT7- <i>arf1</i>	1-474 aa	pUAS <sub>t</sub> -attB- <i>arf1</i> -eGFP	<b>Arf1-pGildaf</b> GAATTCATGGGAAACGTATTCGCGAACT TATT	EcoRI + BamHI	
			<b>Arf1BamYrev</b> GGATCCTTAGCGATTAGCGT		

pGBKT7- <i>arf1</i>	1-474 aa	pUAS-attB- <i>arf1</i> -eGFP	<b>Arf1-pGildaf</b> GAATTCATGGGAAACGTATTCGCGAACT TATT <b>Arf1BamYrev</b> GGATCCTTAGCGATTAGCGT	EcoRI + BamHI
pGADT7- <i>cdc42</i>	1-192 aa	HL08128	<b>Cdc42Y2HEcofw</b> GAATTCATGCAAACCATCAAGT <b>Cdc42Y2HBamrv</b> GGATCCTTATAAGAATTTGCAC	EcoRI + BamHI
pGBKT7- <i>cdc42</i>	1-192 aa	HL08128	<b>Cdc42Y2HEcofw</b> GAATTCATGCAAACCATCAAGT <b>Cdc42Y2HBamrv</b> GGATCCTTATAAGAATTTGCAC	EcoRI + BamHI
pGADT7- <i>dia</i>	1-1015 aa	LD14246	<b>DiaY2HNdefw</b> CATATGATGAACATTCCGAAG <b>DiaY2HADSacIrev</b> GAGCTCCTACGCGGAGC	NdeI + SacI
pGBKT7- <i>dia</i>	1-1015 aa	LD14246	<b>DiaY2HNdefw</b> CATATGATGAACATTCCGAAG <b>DiaY2HBKSalrv</b> GTCGACCTACGCGGAGC	NdeI + SalI

pGBKT7- <i>dock</i>	1-549 aa	LD42588	<b>DockFLYEcofw</b> GAATTCATGTTGGAACACCC	EcoRI + BamHI	
			<b>DockflYBamrv</b> GGATCCTTACGTGCCATT		
pGADT7- <i>dock</i> $\Delta$ SH2	1-445 aa	LD42588	<b>DockFLYEcofw</b> GAATTCATGTTGGAACACCC	EcoRI + BamHI	Deletion der SH2-Domäne
			<b>DockDSH2YBamrv</b> GGATCCTTAGCCCGCCAG		
pGBKT7- <i>dock</i> $\Delta$ SH2	1-445 aa	LD42588	<b>DockFLYEcofw</b> GAATTCATGTTGGAACACCC	EcoRI + BamHI	Deletion der SH2-Domäne
			<b>DockDSH2YBamrv</b> GGATCCTTAGCCCGCCAG		
pGADT7- <i>dock</i> $\Delta$ SH3	386-549 aa	LD42588	<b>DockDSH3YEcofw</b> GAATTCGACTACCTGGCCA	EcoRI + BamHI	Deletion der SH3-Domänen
			<b>DockflYBamrv</b> GGATCCTTACGTGCCATT		
pGBKT7- <i>dock</i> $\Delta$ SH3	386-549 aa	LD42588	<b>DockDSH3YEcofw</b> GAATTCGACTACCTGGCCA	EcoRI + BamHI	Deletion der SH3-Domänen
			<b>DockflYBamrv</b> GGATCCTTACGTGCCATT		
pGADT7- <i>fps85D</i>	1-1326 aa	RH14840	<b>FpsY2HNdefw</b> CATATGATGGGCTTCTCATCA	NdeI + EcoRI	
			<b>FpsY2HEcorv</b> GAATTCTTAGTGGCTGTTGTC		

pGBKT7- <i>fps85D</i>	1-1326 aa	RH14840	<b>FpsY2HNdefw</b> CATATGATGGGCTTCTCATCA	NdeI + EcoRI	
			<b>FpsY2HEcorv</b> GAATTCTTAGTGGCTGTTGTC		
pGADT7- <i>fps85DΔFCH</i>	93-1326 aa	RH14840	<b>FpsDFCHY2Hfw</b> CATATGCAGCTGGAGGTCG	NdeI + EcoRI	Deletion der FCH-Domäne
			<b>FpsY2HEcorv</b> GAATTCTTAGTGGCTGTTGTC		
pGBKT7- <i>fps85DΔFCH</i>	93-1326 aa	RH14840	<b>FpsDFCHY2Hfw</b> CATATGCAGCTGGAGGTCG	NdeI + EcoRI	Deletion der FCH-Domäne
			<b>FpsY2HEcorv</b> GAATTCTTAGTGGCTGTTGTC		
pGADT7- <i>graf</i>	1-859 aa	LD28528	<b>Grafad-Nde-fw</b> CATATGATGTCAACTAAAAAGCCCGAA	NdeI + BamHI	
			<b>Graf-Bam-rev</b> GGATCCCTAATGGTGCGGCTTCAAAT		
pGBKT7- <i>graf</i>	1-859 aa	LD28528	<b>Grafad-Nde-fw</b> CATATGATGTCAACTAAAAAGCCCGAA	NdeI + BamHI	
			<b>Graf-Bam-rev</b> GGATCCCTAATGGTGCGGCTTCAAAT		
pGADT7- <i>grafΔPH</i>	224-859 aa	LD28528	<b>GrafDPHY2Hfw</b> CATATGCTGGCTCCCGGCA	NdeI + BamHI	Deletion der PH-Domäne
			<b>Graf-Bam-rev</b> GGATCCCTAATGGTGCGGCTTCAAAT		

pGBKT7- <i>grafΔPH</i>	224-859 aa	LD28528	<b>GrafDPHY2Hfw</b> CATATGCTGGCTCCCGGCA <b>Graf-Bam-rev</b> GGATCCCTAATGGTGCGGCTTCAAAT	NdeI + BamHI	Deletion der PH-Domäne
pGADT7- <i>grafΔRhoGAPΔSH3</i>	1-238 aa	LD28528	<b>Grafad-Nde-fw</b> CATATGATGTCAACTAAAAAGCCCGAA <b>GrafDRhoY2Hrev</b> GGATCCATCCAGATGGTATG	NdeI + BamHI	Deletion der RhoGAP- und SH3-Domäne
pGBKT7- <i>grafΔRhoGAPΔSH3</i>	1-238 aa	LD28528	<b>Grafad-Nde-fw</b> CATATGATGTCAACTAAAAAGCCCGAA <b>GrafDRhoY2Hrev</b> GGATCCATCCAGATGGTATG	NdeI + BamHI	Deletion der RhoGAP- und SH3-Domäne
pGADT7- <i>grafΔPHΔSH3</i>	224-575 aa	LD28528	<b>GrafDPHY2Hfw</b> CATATGCTGGCTCCCGGCA <b>GrafDSH3Y2Hrev</b> GGATCCGGTGCCCGTTGA	NdeI + BamHI	Deletion der PH- und SH3-Domäne
pGBKT7- <i>grafΔPHΔSH3</i>	224-575 aa	LD28528	<b>GrafDPHY2Hfw</b> CATATGCTGGCTCCCGGCA <b>GrafDSH3Y2Hrev</b> GGATCCGGTGCCCGTTGA	NdeI + BamHI	Deletion der PH- und SH3-Domäne
pGADT7- <i>grafΔSH3</i>	1-798 aa	LD28528	<b>Grafad-Nde-fw</b> CATATGATGTCAACTAAAAAGCCCGAA <b>GrafDSH3Y2Hrev</b> GGATCCGGTGCCCGTTGA	NdeI + BamHI	Deletion der SH3-Domäne



pGBKT7- <i>grafΔSH3</i>	1-798 aa	LD28528	<b>Grafad-Nde-fw</b> CATATGATGTCAACTAAAAAGCCCGAA <b>GrafDSH3Y2Hrev</b> GGATCCGGTGCCCGTTGA	NdeI + BamHI	Deletion der SH3-Domäne
pGADT7- <i>grafΔPHΔRhoGAP</i>	427-859 aa	LD28528	<b>GrafSH3Y2HNdefw</b> CATATGAGCGCCGATATCAA <b>Graf-Bam-rev</b> GGATCCCTAATGGTGCGGCTTCAAAT	NdeI + BamHI	Deletion der PH- und RhoGAP-Domäne
pGBKT7- <i>grafΔPHΔRhoGAP</i>	427-859 aa	LD28528	<b>GrafSH3Y2HNdefw</b> CATATGAGCGCCGATATCAA <b>Graf-Bam-rev</b> GGATCCCTAATGGTGCGGCTTCAAAT	NdeI + BamHI	Deletion der PH- und RhoGAP-Domäne
pGADT7- <i>schizo</i>	1-1314 aa	pUAS <sub>t</sub> -attB- <i>schizo-fl</i> -eGFP	<b>SizY2HNdefw</b> CATATGATGTCCAGGTGTGA <b>SizY2HBamrv</b> GGATCCTTAGACCTCCGTC	NdeI + BamHI	
pGBKT7- <i>schizo</i>	1-1314 aa	pUAS <sub>t</sub> -attB- <i>schizo-fl</i> -eGFP	<b>SizY2HNdefw</b> CATATGATGTCCAGGTGTGA <b>SizY2HBamrv</b> GGATCCTTAGACCTCCGTC	NdeI + BamHI	

### 3.15 Verwendete Fliegenstämme

Die mit BL versehenen Stämme wurden vom *Bloomington Drosophila Stock Center* (Indiana University, Bloomington, USA) bezogen. Alle anderen Fliegenlinien stammen entweder aus anderen Laboren oder der Labor-internen Stammsammlung.

**Tabelle 3.6: Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten und generierten Fliegenstämme.**

Fliegenlinie	Lokalisation	Beschreibung	Referenz
<i>white</i> ( <i>w<sup>1118</sup></i> )	X Chromosom	trägt die <i>white</i> Mutation, weiße Augen	
<i>P{CaryP}attP40</i>	2. Chromosom	zur $\Phi$ C31 vermittelten Integration der Gateway-Konstrukte auf dem zweiten Chromosom	BL25709
<i>M{3xP3-RFP.attP}</i>	3. Chromosom	zur $\Phi$ C31 vermittelten Integration der Gateway-Konstrukte auf dem dritten Chromosom	BL24749
Balancerlinien und Marker			
<i>w<sup>-</sup> ; <math>\frac{if}{CyO\ hg-lacZ}</math></i>	2. Chromosom	vershmälerte Augen ( <i>Inflated</i> , <i>If</i> ) nach oben gebogene Flügel ( <i>CurlyO</i> , <i>CyO</i> ) Expression von <i>lacZ</i> im Hinterdarm ( <i>hg-lacZ</i> )	
<i>w<sup>-</sup> ; + ; <math>\frac{Dr}{TDIZ, sb}</math></i>	3. Chromosom	<i>white</i> -mutanter Hintergrund vershmälerte Augen ( <i>Drop</i> , <i>Dr</i> )	

		verkürzte Thorakalborsten ( <i>Stubble, sb</i> ) Expression von <i>lacZ</i> im Maxillarsegment
$W^- ; \frac{sp}{CyO\ hg\ lacZ} ; \frac{Dr}{TD1Z, sb}$	2. / 3. Chromosom	<i>white</i> -mutanter Hintergrund vermehrte Borsten auf der Sternopleuralplatte ( <i>sternopleura, sp</i> ) nach oben gebogene Flügel ( <i>CurlyO, CyO</i> ) Expression von <i>lacZ</i> im Hinterdarm ( <i>hg-lacZ</i> ) verschmälerte Augen ( <i>Drop, Dr</i> ) verkürzte Thorakalborsten ( <i>Stubble, sb</i> ) Expression von <i>lacZ</i> im Maxillarsegment

### Gal4-Treiberlinien

P{UAS- <i>Dcr-2</i> }; <i>Mef2</i> -Gal4	X Chromosom / 3. Chromosom	Expression von Gal4 und <i>Dcr</i> im gesamten Mesoderm, genutzt zur Überexpression von RNAi-Konstrukten	BL25707
<i>Mef2</i> -Gal4	3. Chromosom	Expression von Gal4 im gesamten Mesoderm	Ranganayakulu et al., 1996

$\frac{CadN^{M19}, FRT40A}{CyO\ hg\ lacZ}; Mef2-Gal4$	2. Chromosom / 3. Chromosom	Expression von Gal4 im gesamten Mesoderm, im <i>N-cadherin</i> -mutanten Hintergrund	S. Önel
<i>rp298-Gal4 (duf-Gal4)</i>	X Chromosom	Expression von Gal4 im <i>duf/kirre</i> Muster	Menon und Chia, 2001
<i>rp298-Gal4</i> ; $\frac{E14}{TDLZ, sb}$	X Chromosom / 3. Chromosom	<i>rp298-Gal4</i> im <i>schizo</i> -mutanten Hintergrund	S. Önel
<i>sg24</i> ; $\frac{schizo^{C1-28}}{TDLZ, sb}$	2. Chromosom / 3. Chromosom	Expression von Gal4 im <i>twist</i> -Muster, im <i>schizo</i> -mutanten Hintergrund	C. Dottermusch
<i>sns pro3-Gal4</i>	2. Chromosom	Expression von Gal4 im <i>sns</i> -Muster	S. Abmayr
<i>twist-Gal4 (TGX)</i>	X Chromosom	Expression von Gal4 im gesamten Mesoderm	A. Michelson, Baylies und Bate, 1996

### UAS-Effektorstämme

$\frac{UAS-cdc42^{V12}}{CyO\ twi\ gfp}$ ; $\frac{schizo^{U112}}{TM3\ twi\ gfp}$	2. Chromosom / 3. Chromosom	konstitutiv aktiviertes <i>cdc42</i> unter UAS-Kontrolle, im <i>schizo</i> -mutanten Hintergrund	S. Önel
$\frac{UAS-graf^{fl}eGFP}{CyO\ twi\ gfp}$ ; $\frac{schizo^{U112}}{TM3\ twi\ gfp}$	2. Chromosom / 3. Chromosom	<i>graf<sup>fl</sup></i> unter UAS-Kontrolle, im <i>schizo</i> -mutanten Hintergrund	S. Önel
<i>UAS-gfp.S65T</i>	2. Chromosom	<i>gfp</i> unter UAS-Kontrolle, lokalisiert im Cytoplasma	BL1521

UAS-*graf-egfp*                      2. Chromosom                      Masterarbeit J. Hamp,  
2012

### Mutanten und Deletionsstämme

<i>cadN<sup>M19</sup></i>	2. Chromosom	enthält ein Stop Codon in der extrazellulären Domäne	Iwai et al., 1997
<i>cadN, cadN2<sup>Δ14</sup></i>	2. Chromosom	Deletionslinie für N-Cadherin und N-Cadherin2; Excision des P-Elements	Prakash et al., 2005
<i>Df(2L)TW137</i>	2. Chromosom	Deletionslinie für N-Cadherin; 36C2-37C1	BL420
<i>dock<sup>04723</sup></i>	2. Chromosom	P-Element Insertion im 1. Intron	BL11385
<i>schizo<sup>C1-28</sup></i>	3. Chromosom	durch EMS Mutation erzeugte <i>schizo</i> -Mutante, nicht näher charakterisiert	Önel et al., 2004
<i>schizo<sup>U112</sup></i>	3. Chromosom	durch EMS Mutation erzeugte <i>schizo</i> -Mutante, nicht näher charakterisiert	Önel et al., 2004

### In dieser Arbeit generierte Fliegenstämme

UAS- <i>cdc42-fl</i> -mCherry	2. Chromosom	gesamter offener Leserahmen von <i>cdc42</i> fusioniert mit mCherry	transgene Linie
UAS- <i>drp1</i> -mCherry	2. Chromosom	gesamter offener Leserahmen von <i>drp1</i> fusioniert mit mCherry	transgene Linie

UAS- <i>fps85Dp100</i> eGFP	3. Chromosom	gesamter offener Leserahmen von <i>fps85d</i> fusioniert mit eGFP	transgene Linie
UAS- <i>fps85Dp100</i> -mCherry	3. Chromosom	gesamter offener Leserahmen von <i>fps85d</i> fusioniert mit mCherry	transgene Linie
UAS- <i>fps85Dp100</i> myc	3. Chromosom	gesamter offener Leserahmen von <i>fps85d</i> fusioniert mit Myc	transgene Linie
UAS- <i>fps85DΔSH2ΔTyr</i> -myc	3. Chromosom	Deletion der SH2- und Tyrosinkinase-Domäne, fusioniert mit Myc	transgene Linie
UAS- <i>myrfps85Dp100</i> -mCherry	3. Chromosom	gesamter offener Leserahmen von <i>fps85d</i> fusioniert mit mCherry, N-terminales Myristoylierungssignal	transgene Linie
$w^{-}; \frac{cadN^{M19}, dock^{04723}}{CyO\ hg\ lacZ}$	2. Chromosom		doppelmutante, rekombinante Linien  #23, #30, #44
$w^{-}; \frac{cadN^{M19}, UAS-fps92myr}{CyO\ hg\ lacZ}$	2. Chromosom		doppelmutante, rekombinante Linie
UAS- <i>gfp</i> ; $\frac{schizo^{U112}}{TDIZ}$	2./3. Chromosom	UAS- <i>gfp</i> im <i>schizo</i> -mutanten Hintergrund	

## 4 Methoden

### 4.1 Arbeiten mit *Drosophila melanogaster*

#### 4.1.1 Stammhaltung und Zucht von *Drosophila melanogaster*

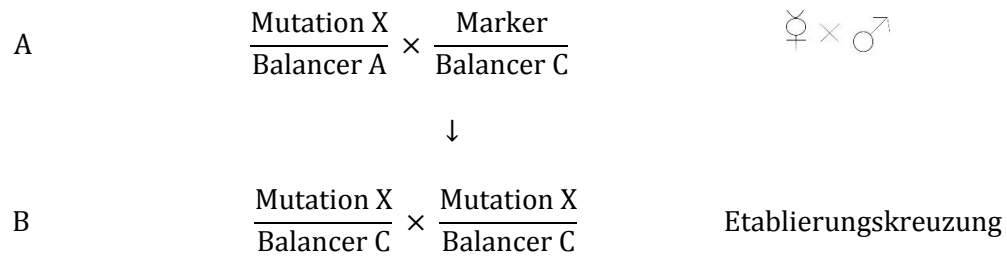
Die Fliegen werden auf mit Maismehlagar gefüllten Flaschen bei 18 °C oder 25 °C und einer Luftfeuchtigkeit von etwa 70 % in einer Klimakammer gehalten und etwa alle zwei bis drei Wochen umgesetzt. Die Generationszeit beträgt bei 25 °C ungefähr 10 Tage, bei 18 °C 18 Tage.

#### 4.1.2 Ansetzen von Kreuzungen

Zum Ansetzen einer Einzelpaarkreuzung werden ein Männchen und ein jungfräuliches Weibchen auf eine neue Flasche gesetzt. Frisch geschlüpfte Tiere sind an einer helleren Körperfarbe sowie einem durch die Körperwand durchscheinenden Darm zu erkennen, männliche Tiere sind erst sechs Stunden nach dem Schlüpfen fertil. Mittels CO<sub>2</sub> werden die Tiere betäubt und können so unter einem Binokular betrachtet und sortiert werden.

##### 4.1.2.1 Umbalancierung einer Fliegenlinie

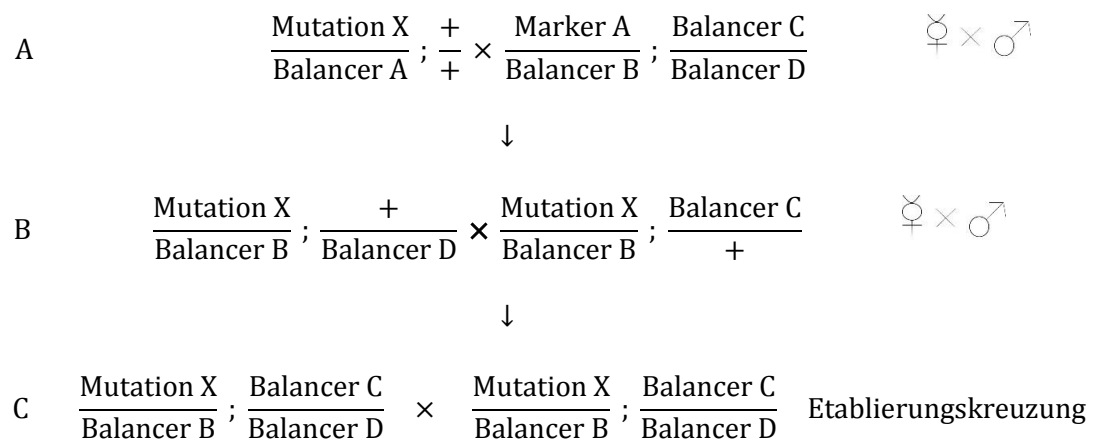
Ein sogenannter Balancer wird benötigt, um eine homozygot letale Mutation stabil in einer Fliegenlinie zu halten. Es handelt sich dabei um Chromosomen, die parazentrische Inversionen besitzen. Da Balancerchromosomen meist homozygot letal sind, schlüpfen nur heterozygote Tiere, welche sowohl die Mutation als auch den Balancer tragen. Mithilfe eines dominanten Markers, der phänotypisch ausgeprägt wird und an das Balancerchromosom gekoppelt ist, lässt sich der Balancer bei einer Kreuzung nachverfolgen (Janning und Knust, 2008). Mithilfe einer Umbalancierung lässt sich ein bereits in einer Fliegenlinie eingebrachter Balancer gegen einen anderen austauschen. Dazu wird die Ursprungslinie mit einer Fliegenlinie verpaart, die den einzubringenden Balancer sowie einen Marker trägt (Abb. 4.1 A). Im zweiten Schritt werden Weibchen und Männchen verkreuzt, welche die Mutation über dem gewünschten Balancer tragen (Abb. 4.1 B).



**Abb. 4.1: Kreuzungsschema für eine Umbalancierung.** Im ersten Schritt wird die Ausgangslinie mit einer Fliegenlinie verkreuzt, die den gewünschten Balancer trägt (A). Danach folgt die Etablierungskreuzung, in der Fliegen verpaart werden, die sowohl die Mutation als auch den neu einzubringenden Balancer tragen (B).

#### 4.1.2.2 Mehrfachmarkierung einer Fliegenlinie

Sogenannte Mehrfachmarkierungen der Chromosomen sind Voraussetzung bei der Generierung einer doppelmutanten Fliegenlinie (siehe 4.1.2.3), welche Mutationen auf zwei unterschiedlichen Chromosomen trägt. Dafür wird zunächst die Ausgangslinie mit einem Balancerstamm verpaart, welcher Balancer auf beiden Chromosomen trägt (Abb. 4.2 A). Für den zweiten Kreuzungsschritt werden Fliegen verwendet, welche die Mutation über dem gleichen Balancer sowie den jeweils anderen Balancer auf dem anderen Chromosom tragen (Abb. 4.2 B). Die Etablierung der Linie erfolgt durch die Kreuzung von Fliegen, welche sowohl die Mutation als auch die gleiche Balancerkombination aufweisen (Abb. 4.2 C).

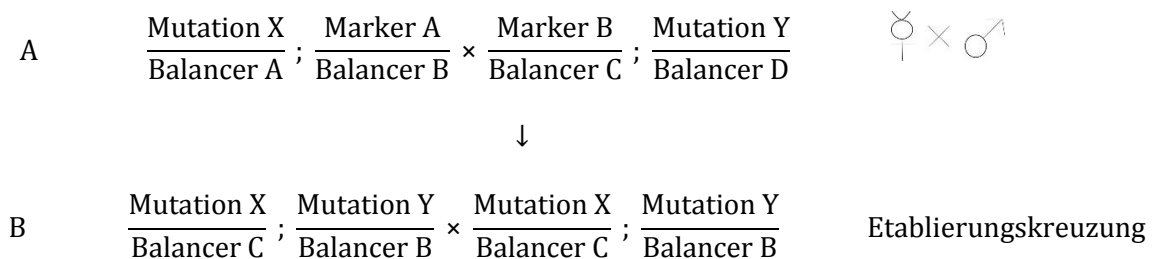


**Abb. 4.2: Kreuzungsschema für die Mehrfachmarkierung einer Fliegenlinie.** Die Ausgangslinie wird im ersten Schritt mit einem Balancer verkreuzt (A). In der Folgegeneration werden jungfräuliche Weibchen und Männchen verpaart, welche den gleichen Genotyp für das Chromosom, auf dem die Mutation liegt, besitzen. Auf dem anderen Chromosom wird auf unterschiedliche Balancer selektiert (B), sodass für die Etablierungskreuzung Fliegen eingesetzt werden, welche alle Balancer tragen (C).



### 4.1.2.3 Generierung einer doppelmutanten Fliegenlinie

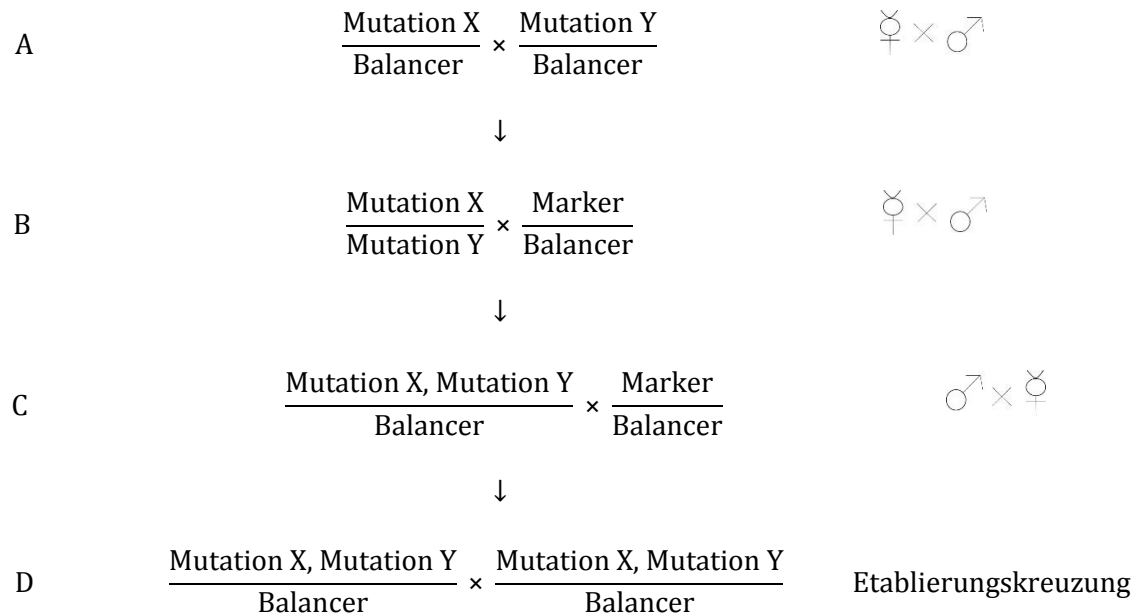
Sogenannte Doppelmutanten tragen zwei Mutationen, die in diesem Fall auf verschiedenen Chromosomen liegen. Die Generation dieser Fliegenlinien ermöglicht Untersuchungen zu genetischen Interaktionen zweier Proteine. Abbildung 4.4 zeigt beispielhaft ein vereinfachtes Kreuzungsschema für die Generierung einer Doppelmutante für das zweite und dritte Chromosom. Die für diese Kreuzung verwendeten Fliegen müssen zunächst mehrfachmarkiert werden (siehe 4.1.2.2) und werden anschließend verkreuzt (Abb. 4.3 A). In der Folgegeneration werden Männchen und Weibchen miteinander verpaart, die sowohl beide Mutationen als auch die gewünschte Balancerkombination tragen (Abb. 4.3 B).



**Abb. 4.3: Kreuzungsschema für die Generierung einer Doppelmutante.** Im ersten Schritt werden Jungfrauen der einen Mutante mit Männchen der zweiten Mutante verpaart (A). Im zweiten Schritt folgt die Etablierungskreuzung, bei der Männchen und Weibchen, die jeweils beide Mutationen sowie die gleiche Balancerkombination tragen, verkreuzt werden (B).

### 4.1.2.4 Generierung einer rekombinanten Fliegenlinie

Liegen die zwei auf genetische Interaktion zu untersuchenden Gene auf dem gleichen Chromosom, ist die Generierung einer rekombinanten Fliegenlinie notwendig. Zunächst werden Weibchen und Männchen der beiden mutanten Ausgangslinien verpaart (Abb. 4.4 A). Im zweiten Schritt folgt die Kreuzung jungfräulicher Weibchen, die beide Mutationen in trans und dadurch keinen Balancer mehr tragen, mit Männchen eines Balancerstammes (Abb. 4.4 B). Die meiotische Rekombination findet in *D. melanogaster* während dieses Schrittes ausschließlich in Weibchen statt. Die in der folgenden Generation auftretenden Männchen der potentiellen Rekombinante, welche nun wieder einen Balancer tragen, werden im nächsten Schritt gegen Weibchen des Balancerstammes gekreuzt (Abb. 4.4 C), bevor im letzten Schritt die Etablierung der Linie folgt (Abb. 4.4 D). Die etablierten Fliegenlinien müssen vor der Verwendung noch auf erfolgreiche Rekombination hin getestet werden.



**Abb. 4.4: Kreuzungsschema für die Generierung einer rekombinanten Fliegenlinie.** Nach der Kreuzung der Ausgangslinien (A) wird in der nächsten Generation ein jungfräuliches Weibchen, welches keinen Balancer trägt, mit einem Männchen eines Balancerstammes verpaart (B). Von der Folgegeneration wird ein Männchen mit einem weiblichen Tier eines Balancerstammes verkreuzt (C). Für die Etablierungskreuzung werden Männchen und jungfräuliche Weibchen verwendet, welche beide den Balancer tragen (D).

#### 4.1.3 Mikroinjektion in *D. melanogaster* und Keimbahntransformation mittels $\Phi$ C31-Integrase

(Bischof et al., 2007)

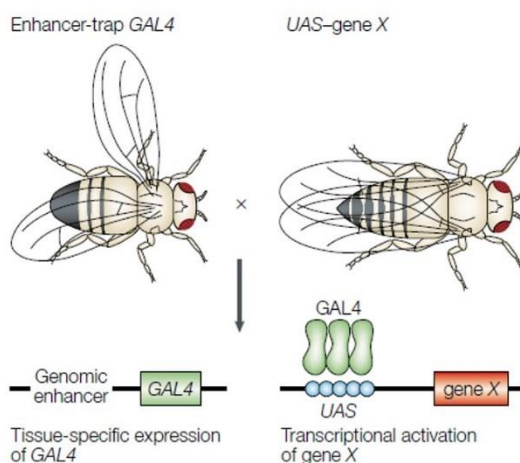
Die Keimbahntransformation mithilfe der  $\Phi$ C31-Integrase ermöglicht eine gerichtete Integration von transposablen Elementen, sogenannten P-Elementen, auf das gewünschte Chromosom von *D. melanogaster*. Zur Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten transgenen Fliegenstämme werden P-Elemente verwendet, welche ein Zielgen unter UAS-Kontrolle tragen (siehe 4.1.4). Der für die Injektion benötigte Fliegenstamm wird auf große Fruchtsaftagarflaschen gesetzt. Die innerhalb eines Zeitintervalls von etwa 20 Minuten abgelegten Embryonen werden zuerst in einem Siebchen gesammelt und durch eine fünf-minütige Inkubation in 1:1 H<sub>2</sub>O/Klorix dechorionisiert. Es folgt ein kurzer Waschschrift in ddH<sub>2</sub>O. Im Anschluss werden die Embryonen mit einem Pinsel auf einem Agarblock aufgereiht. Mithilfe eines mit Heptankleber beschichteten Deckgläschens werden die Embryonen für die Injektion fixiert und für zehn Minuten im Exsikkator getrocknet. In der Zwischenzeit werden 5 µg der zuvor aufgereinigten DNA mit 2,5 µl 10x Injektionspuffer versetzt, mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt und für 30 Minuten bei 13000 UpM und 4 °C

abzentrifugiert. Die DNA wird in die Injektionsnadel gegeben und posterior in die aufgereihten und mit Voltalef-Öl überschichteten Embryonen injiziert. In den darauf folgenden Tagen werden die Larven abgesammelt und in kleine Futterflaschen transferiert. Die daraus geschlüpften potentiellen transgenen Fliegen werden jungfräulich mit  $w^{1118}$  Fliegen verkreuzt. Die verwendeten Gateway-Vektoren tragen zusätzlich zum UAS-Konstrukt des Zielgens das *white* Gen, welches zur Ausprägung der roten Augenfarbe führt. Die Injektion erfolgt im syncytialen Blastodermstadium, in dem noch keine Zellgrenzen gebildet wurden. Dadurch kann die DNA in die sich bildenden Keimzellen aufgenommen werden. Bei einer erfolgreichen Integration des UAS-Konstruktes in die Keimbahn der Embryonen schlüpfen nach der ersten Kreuzung mit  $w^{1118}$  Tieren in der zweiten Generation rotäugige Fliegen. Diese werden noch zweimal mit  $w^{1118}$  Fliegen verpaart und anschließend erfolgt die Etablierung des Stammes durch die Kreuzung zweier rotäugiger Fliegen.

#### 4.1.4 Das UAS-Gal4 System zur ektopischen Expression von UAS-Konstrukten

(Brand und Perrimon, 1993)

Das UAS-Gal4 System ermöglicht eine ektopische Expression von Zielgenen in spezifischen Geweben oder Zellen. Dafür werden zwei verschiedene Fliegenstämme genutzt. Ein Stamm exprimiert das *gal4* Gen unter Kontrolle eines gewebespezifischen genomischen Enhancers von *D. melanogaster*. Der zweite Stamm trägt das zu untersuchende Zielgen, welches hinter einer Upstream activating sequence (UAS), der Bindestelle des Gal4, liegt. Werden beide Fliegenlinien miteinander verkreuzt, wird das Gal4 Protein exprimiert und kann an die UAS-Aktivierungsdomäne binden, was zur Expression des Zielgens im gewünschten Gewebe führt (Abb. 4.5). Mithilfe der spezifischen Promotorsequenz wird festgelegt, in welchen Zellen oder welchem Gewebe das Zielgen exprimiert wird.



**Abb. 4.5: Schematische Darstellung des UAS-Gal4 Systems.** Zur Expression des Zielgens werden zwei Fliegenstämme miteinander verpaart. Ein Stamm trägt Gal4 unter Kontrolle eines spezifischen Promotors, der andere die UAS-Bindestelle vor dem zu exprimierenden Gen. In der Folgegeneration kann das nun gebildete Gal4-Protein an die UAS-Aktivierungsdomäne binden und die Expression des Zielgens initiieren. (St. Johnston, 2002).

#### 4.1.5 Sammeln von Embryonen

Zum Sammeln der Embryonen werden die Elterntiere auf mit Fruchtsaftagar gefüllte Röhren gesetzt. Jeweils morgens und abends werden die Röhren gewechselt und die auf dem Agar abgelegten Embryonen bei 18 °C bis zum gewünschten Altersstadium nachgealtert. Bis zur Fixierung werden die Röhren mit den Embryonen bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Die Fixierung erfolgt jeweils nach drei oder maximal vier Tagen.

#### 4.1.6 Fixieren von Embryonen

Die Embryonen werden zunächst mithilfe eines Pinsels in Siebchen transferiert. Es folgt ein fünf-minütiger Inkubationsschritt in 1:1 H<sub>2</sub>O/Klorix zur Entfernung des Chorions. Anschließend werden die Embryonen für fünf Minuten in H<sub>2</sub>O gewaschen und danach trocken geblottet. Mittels Heptan werden die Tiere in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Der Fixierungsschritt erfolgt nach der Zugabe von 500 µl frischem Heptan und 500 µl 4 % F-PBS für 20 Minuten auf dem Schüttler. Die untere Phase wird abgenommen und verworfen. Es werden 500 µl Methanol zugegeben und für eine Minute gevortext. Der letzte Schritt wird wiederholt. Im Anschluss werden die Embryonen zweimal mit Methanol gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

### 4.2 Immunhistochemische Methoden

#### 4.2.1 Antikörpernachweis an *whole mount* Embryonen

Die in Methanol gelagerten Embryonen werden zunächst durch drei zehn-minütige Waschschriffe in PBT rehydriert. Anschließend wird der primäre Antikörper in PBT verdünnt, auf die Embryonen gegeben und über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wird der Antikörper abgenommen und die Embryonen werden dreimal für zehn Minuten in PBT gewaschen. Zur Absättigung von unspezifischen Bindestellen folgt ein Blockschritt für 30 Minuten in 2 % Ziegen Serum in PBT. Nach der Zugabe des in PBT verdünnten sekundären Antikörpers werden die Embryonen für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Bei Fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörpern müssen die Inkubation sowie die folgenden Schritte zusätzlich im Dunkeln erfolgen. Der sekundäre Antikörper wird abgenommen und die Embryonen erneut dreimal für zehn Minuten in PBT gewaschen. Danach werden die Tiere in Fluoromount aufgenommen und auf einem Objektträger eingebettet.

## 4.3 Molekularbiologische Methoden

### 4.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

(Mullis et al., 1986)

Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können spezifische DNA-Fragmente amplifiziert und vervielfältigt werden. Für diese Reaktion werden kurze Oligonukleotide benötigt, die sogenannten Primer, welche Start- und Endpunkt des zu amplifizierenden DNA-Fragments bilden. Mithilfe eines Denaturierungsschrittes zu Beginn der PCR werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen Adenin und Thymin sowie Guanin und Cytosin aufgebrochen, was zur Auftrennung des DNA-Doppelstranges führt. Im zweiten Schritt, dem Annealing, binden die Primer bei einer spezifischen Temperatur ( $T_m$ ) an die DNA-Stränge. Es folgt die Elongation, bei der eine Polymerase das zu der Zielsequenz komplementäre Produkt synthetisiert. Die Temperatur für den Elongationsschritt ist dabei abhängig von der verwendeten Polymerase, die Zeit wird durch die Größe des zu amplifizierenden Fragments festgelegt. Dieses Produkt wird in den folgenden Zyklen, in denen die drei Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation jeweils wiederholt werden, vervielfältigt. Mittels einer 3'-5'-Exonucleaseaktivität der verwendeten Polymerase wird die Fehlerzahl bei der Synthese verringert.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Polymerase-Kettenreaktionen wurden unter folgenden Bedingungen mithilfe der AccuPrime Taq-DNA-Polymerase (Life Technologies, Darmstadt) nach Herstellerangaben durchgeführt:

1. Denaturierung	95 °C	5 Minuten	
2. Denaturierung	95°C	30 Sekunden	35 x
3. Annealing	$T_m$	60 Sekunden	
4. Elongation	68 °C	1 Minute pro 1 kb	
5. Elongation	68 °C	10 Minuten	

#### 4.3.2 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Für die Gelelektrophorese wird ein 1 % iges Agarosegel verwendet, welches mit TBE überschichtet wird. Es werden 1,5 µl Größenstandard sowie die aufzutrennenden Proben, versetzt mit Ladepuffer, in die Taschen geladen und bei 60 V bis 120 V aufgetrennt. Die aufgrund der Phosphatreste negativ geladenen DNA-Fragmente wandern im elektrischen Feld zum Pluspol, kleinere Fragmente schneller als große. Mithilfe des zugesetzten Ethidiumbromids, welches in die DNA interkaliert, kann das Ergebnis der Größenauftrennung unter UV-Licht ausgewertet werden.

#### 4.3.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der Auftrennung wird das DNA-Fragment der richtigen Größe zunächst auf einem UV-Licht-Tisch aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert. Die Isolierung der DNA erfolgt mithilfe des JETSORB Kits (Genomed, Löhne). Es werden 300 µl Puffer A1 und 10 µl der JETSORB Gelsuspension zugegeben und kurz gevortext. Danach folgt eine 15-minütige Inkubation bei 50 °C im Wasserbad, bei der die DNA gebunden wird. Die Probe wird anschließend bei 1000 g für eine Minute zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 300 µl Puffer A1 resuspendiert und für eine Minute bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wird erneut abgenommen und das Pellet in Puffer A2 resuspendiert und für eine Minute bei 1000 g abzentrifugiert. Der letzte Schritt wird wiederholt. Anschließend wird das Pellet getrocknet und in 20 µl  $d_4H_2O$  aufgenommen. Die Eluation der DNA erfolgt durch eine fünf-minütige Inkubation bei 50 °C im Wasserbad. Die Gelsuspension wird nun abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert.

#### 4.3.4 Aufreinigung von DNA mittels NucleoSpin® Kit

Die Aufreinigung der DNA für die Injektion wird mittels NucleoSpin® Kit (Machrey-Nagel, Düren) durchgeführt. Dafür werden 10 µg der DNA mit  $d_4H_2O$  auf 50 µl verdünnt, anschließend mit 100 µl NTI Puffer versetzt und auf eine Säule gegeben. Es folgt ein Zentrifugationsschritt für 30 Sekunden bei 13000 UpM. Der Überstand wird verworfen und die Säule mit 700 µl NT3 Puffer mittels Zentrifugation für 30 Sekunden bei 13000 UpM gewaschen. Der Waschschrift wird wiederholt. Anschließend wird die Säule durch einen Zentrifugationsschritt für eine Minute bei 13000 UpM getrocknet. Zum Eluieren der gebundenen DNA werden 20 µl  $d_4H_2O$  auf die Säule gegeben und für fünf

Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Mithilfe einer erneuten Zentrifugation für eine Minute bei 13000 UpM wird die DNA von der Säule eluiert.

#### 4.3.5 Konzentrationsbestimmung

Der DNA-Gehalt der Proben wird mithilfe des NanoDrop 2000 Spectrophotometers (Thermo Scientific, Waltham, MA) bestimmt. Dafür wird zunächst 1 µl  $\text{ddH}_2\text{O}$  als Referenzwert und anschließend 1 µl der Probe bei 260 nm gemessen. Das Verhältnis des Absorptionskoeffizienten bei 260 nm zu 280 nm gibt den Reinheitsgrad der DNA an. Bei einem Wert von etwa 1,8 gilt die DNA als rein.

#### 4.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten in TOPO® Vektoren

Die Ligation wird mithilfe der TOPO® Cloning Kits (Life Technologies, Darmstadt) durchgeführt. Um PCR-Fragmente in die TOPO® Vektoren einzubringen, werden 0,5 - 4 µl des PCR-Produkts mit 0,5 µl TOPO® Vektor versetzt und mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  auf ein Gesamtvolumen von 6 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wird für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend werden 2 µl für die Transformation der chemisch kompetenten Zellen eingesetzt.

Bei der Ligation in den pCR2.1™-TOPO® TA Vektor erfolgt der Inkubationsschritt bei Raumtemperatur für 30 Minuten.

#### 4.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4 Ligase

Die mithilfe eines präparativen Restriktionsverdau aus den Zwischenvektoren (TOPO® Vektoren) ausgeschnittenen DNA-Fragmente werden zunächst mittels Gelelektrophorese bei 60 V aufgetrennt. Das Fragment der richtigen Größe wird anschließend aus dem Agarosegel isoliert (siehe 4.3.3) und die Konzentration am NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA) gemessen. Die einzusetzende Menge von Insert und Vektor berechnet sich nach folgender Formel:

$$\frac{(\text{Insertgröße in kb} \times \text{Vektormenge in ng})}{\text{Vektorgröße in kb}} = \text{einzusetzende Menge des Inserts in ng}$$

Insert und Vektor werden mit 2 µl Ligasepuffer und 1 µl T4-DNA Ligase versetzt und auf 20 µl Gesamtvolumen mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  aufgefüllt. Die Ligation erfolgt über Nacht bei 16 °C im Kryobad.

#### 4.3.8 Klonierung in Gateway®-Vektoren

Das Gateway System ermöglicht eine einfache Umklonierung von DNA-Fragmenten aus dem pENTR™ TOPO Vektor in verschiedene N- oder C-terminal markierte pUAS<sub>t</sub> oder pUAS<sub>p</sub> Vektoren. Voraussetzung für die Klonierung ist ein N-terminaler cacc-Überhang, über den die Ligation in den pENTR™ TOPO Vektor erfolgt. Für die Klonierung werden 50-150 ng des pENTR Konstrukts mit 150 ng des Zielvektors und 2 µl Gateway® Clonase II Enzym Mix versetzt und mit ddH<sub>2</sub>O auf 10 µl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgt für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Aktivität des Enzyms wird durch einen zehn-minütigen Inkubationsschritt bei 37 °C im Wasserbad gestoppt. Für die anschließende Transformation chemisch kompetenter Zellen werden 2 µl eingesetzt.

#### 4.3.9 Herstellung chemisch kompetenter DH5α Zellen

(Sambrook et al., 1989)

Die Bakterien werden zunächst auf einer LB-Platte ohne Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Am nächsten Tag werden 50 ml LB-Medium mit einer Kolonie inokuliert und bei 37 °C über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Von dieser Kultur wird am nächsten Tag LB-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 angeimpft und bis auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5 bei 37 °C schüttelnd wachsen gelassen. Im Anschluss werden die Zellen für 30 Minuten auf Eis inkubiert und danach für zehn Minuten bei 2000 UpM und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 16 ml eiskaltem RFI-Puffer aufgenommen und für eine weitere Stunde auf Eis inkubiert. Es folgt ein Zentrifugationsschritt für zehn Minuten bei 2000 UpM und 4 °C. Nach Verwerfen des Überstandes wird das Pellet in 4 ml RFII-Puffer aufgenommen und für 15 Minuten auf Eis gelagert. Jeweils 100 µl der Zellen werden in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert, zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

#### 4.3.10 Transformation von kompetenten DH5α Zellen

Zur Transformation werden 0,5 - 5 µl des Ligationsansatzes auf die Zellen gegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA in die Bakterienzellen wird durch einen Hitzeschock für 2,5 Minuten bei 37 °C im Wasserbad ausgelöst. Es folgt die Zugabe von 300 µl vorgewärmtem LB-Medium und ein 45 minütiger Inkubationsschritt bei 37 °C auf dem Schüttler. Anschließend werden die transformierten Bakterien auf mit entsprechendem Antibiotikum versetzten LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.



#### 4.3.11 Plasmid Präparation mittels alkalischer Lyse (Mini-Präparation)

Um die DNA aus den Bakterien zu isolieren, werden zunächst 3 ml LB-Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum versetzt und mit jeweils einer Kolonie inokuliert. Die Vermehrung der Bakterienzellen erfolgt über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler. Am nächsten Tag wird die Kultur in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und zunächst für fünf Minuten bei 4000 UpM abzentrifugiert. Das Zellpellet wird nach Abnahme des Überstands in 250 µl E1 Puffer resuspendiert. Anschließend werden 250 µl E2 Puffer zur Zelllyse hinzugegeben und vorsichtig invertiert. Nach einem fünf-minütigen Inkubationsschritt bei Raumtemperatur erfolgt die Neutralisation durch Zugabe von 250 µl E3 Puffer. Die Proben werden kurz invertiert und anschließend bei 13000 UpM für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird in neue, mit 750 µl Isopropanol gefüllte, Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und die DNA bei einem erneuten Zentrifugationsschritt für 30 Minuten bei 13000 UpM gefällt. Anschließend wird der Überstand abgenommen, 750 µl 70 % Ethanol zugegeben und das Pellet durch einen 20-minütigen Zentrifugationsschritt bei 13000 UpM gewaschen. Das Pellet wird im Anschluss getrocknet, in 30 µl  $\text{ddH}_2\text{O}$  aufgenommen und bei 37 °C im Wasserbad gelöst.

#### 4.3.12 Plasmid Präparation im großen Maßstab (Midi-Präparation)

Zur Erhöhung der DNA Ausbeute wird eine sogenannte Midi-Präparation durchgeführt. Dafür werden 50 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und mit 30 µl der 3 ml Kultur angeimpft. Über Nacht bei 37 °C schüttelnd erfolgt die Vermehrung der Bakterienzellen. Die Midi Kultur wird am nächsten Tag in ein 50 ml Falcon überführt und für fünf Minuten bei 4000 UpM abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 4 ml E1 Puffer resuspendiert. Zur Zelllyse werden 4 ml E2 Puffer zugegeben, vorsichtig invertiert und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Neutralisation erfolgt durch Zugabe von 4 ml E3 Puffer. Es wird erneut kurz invertiert und abschließend für 30 Minuten bei 4000 UpM abzentrifugiert. In der Zwischenzeit wird eine Säule mit 10 ml E4 Puffer äquilibriert. Nach dem Zentrifugationsschritt wird der Überstand auf die Säule gegeben und anschließend zweimal mit 10 ml E5 Puffer gewaschen. Durch die Zugabe von 6 ml E6 Puffer wird die an die Säule gebundene DNA schließlich in ein mit 4 ml Isopropanol gefülltes 15 ml Falcon eluiert. Zur Fällung der DNA folgt ein 30-minütiger Zentrifugationsschritt bei 4000 UpM. Der Überstand wird verworfen und das Pellet nach Zugabe von 2 ml 70 % Ethanol durch einen weiteren Zentrifugationsschritt für 20 Minuten bei 4000 UpM gewaschen. Nach Abnahme des Überstands wird das Pellet zunächst getrocknet, anschließend in 100 µl  $\text{ddH}_2\text{O}$  aufgenommen und bei 37 °C im Wasserbad gelöst. Die Lagerung der DNA erfolgt bei -20 °C.

#### 4.3.13 Analytischer und präparativer Restriktionsverdau

Sowohl für den analytischen als auch für den präparativen Restriktionsverdau wird etwa 1 µg der Plasmid DNA eingesetzt. Diese wird mit 2 µl 10x Reaktionspuffer und 0,2 µl Restriktionsenzym versetzt und mit  $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$  auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Der Restriktionsverdau erfolgt bei 37 °C im Wasserbad, bei dem analytischen Restriktionsverdau für eine Stunde, bei dem präparativen für bis zu drei Stunden. Die Probe wird anschließend mit Ladepuffer versetzt und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt.

#### 4.3.14 Sequenzierung

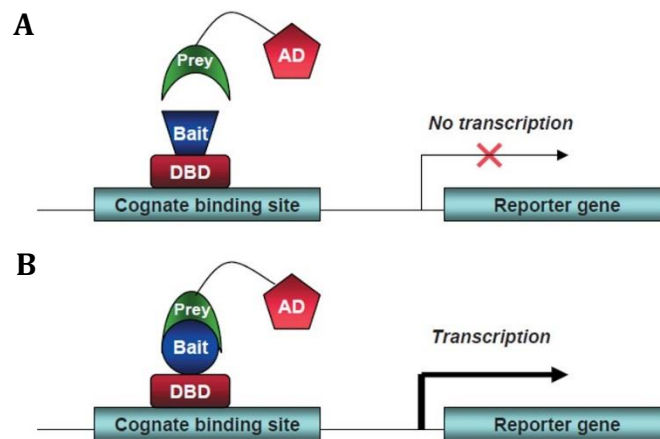
Die Sequenzierung der DNA-Konstrukte wird durch die Firma LGC Genomics (Berlin) durchgeführt. Dafür werden etwa 1 µg DNA und 20 pmol des entsprechenden Primers mit  $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$  auf ein Gesamtvolumen von 14 µl aufgefüllt und zur Sequenzierung verschickt.

### 4.4 Das Hefe 2-Hybrid System

(Fields und Song, 1989; Review: Ratushny und Golemis, 2008)

Das Hefe 2-Hybrid System ermöglicht die Analyse direkter Proteininteraktionen in der Hefe. Für alle Interaktionstests wurde das Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3, (Clontech Laboratories, CA) verwendet. Dafür werden zunächst die offenen Leserahmen mit C-terminalem Stopp-Codon der auf Interaktion zu testenden Proteine in die Hefevektoren eingebracht. Der pGBKT7-Vektor beinhaltet neben der DNA-Bindedomäne (DBD), mit welcher das Köderprotein (Bait) fusioniert ist, den Selektionsmarker *Trp1*. Im zweiten Vektor, pGADT7, sind eine Transkriptions-Aktivierungsdomäne (AD), die mit einem Beuteprotein (Prey) fusioniert ist, sowie der Selektionsmarker *LEU2* enthalten. Bei dem verwendeten Hefestamm handelt es sich um eine Mangelmutante, die erst nach Aufnahme beider Vektoren auf den Selektionsplatten wachsen kann. Erst nach dem Überstreichen der transformierten Hefe auf die Induktionsplatten kann auf Interaktion getestet werden. Die Detektion erfolgt mittels UAS-Gal4 System. Die UAS-Bindedomäne liegt vor den Reportergenen *ade* und *MEL1*. Das zur Aktivierung benötigte Gal4 ist in Teilfragmenten (AD und DBD) an die zu testenden Proteine fusioniert. Durch eine Interaktion von Köder- und Beuteprotein wird die Aktivierungsdomäne in räumliche Nähe der Bindedomäne gebracht und eine Transkription des Reportergens kann dadurch initiiert werden (Abb. 4.6 B). Die Transkription bleibt aus, wenn beide Proteine nicht miteinander interagieren (Abb. 4.6 A). Eine Interaktion der Fusionsproteine wird damit durch das Wachstum der

Zellen sowie durch die Blaufärbung der Kolonien durch Umsetzung des X- $\alpha$ -Gal als Substrat für die Galactosidase MEL1 nachgewiesen.



**Abb. 4.6: Schematische Darstellung des Hefe 2-Hybrid Systems.** Interagieren die zu untersuchenden, an die Transkriptions-Aktivierungsdomäne (AD) beziehungsweise DNA-Bindedomäne (DBD) fusionierten, Proteine nicht miteinander, werden die Reportergene *ade* und *MEL1* nicht transkribiert (A). Es kommt weder zum Wachstum noch zur Blaufärbung der Kolonien auf der Induktionsplatte. Bei einer Interaktion kann die Aktivierungsdomäne an die Bindedomäne binden und das Reportergen wird transkribiert (B). Die Interaktion lässt sich durch Wachstum und Blaufärbung der Kolonien zeigen. (Modifiziert nach Ratushny und Golemis, 2008).

#### 4.4.1 Anzucht und Transformation der Hefe

Der Hefestamm wird in einem Glycerinstock bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für die Interaktionstests wird die Hefe aus diesem Stock zunächst auf YPDA Platten ausgestrichen und für etwa zwei bis drei Tage bei  $30^{\circ}\text{C}$  inkubiert, bis die Kolonien etwa 2 mm groß sind. Von dieser Platte werden zwei bis drei Hefekolonien in 50 ml YPDA Medium resuspendiert und über Nacht bei  $30^{\circ}\text{C}$  und 220 UpM inkubiert. Am folgenden Tag werden aus dieser Kultur 300 ml YPDA Medium auf eine  $\text{OD}_{600}$  von etwa 0,2 angeimpft und erneut bei  $30^{\circ}\text{C}$  und 220 UpM auf dem Schüttler inkubiert. Nach 3 - 4 Stunden sollte die  $\text{OD}_{600}$  bei einem Wert über 0,5 liegen. Die Kultur wird nun in 50 ml Falcons aufgeteilt und für fünf Minuten bei 2000 UpM und Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Pellets werden in 50 ml sterilem  $\text{ddH}_2\text{O}$  vereint. Es folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt für fünf Minuten bei 2000 UpM und Raumtemperatur. Das Pellet wird in 2 ml frisch angesetztem LiAC/TE aufgenommen. Für die Transformation werden jeweils 2-3  $\mu\text{g}$  der Plasmid-DNA, welche für das Köder- beziehungsweise Beuteprotein kodieren, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben, zunächst

mit 10 µl denaturierter Lachssperma DNA und anschließend mit 100 µl der kompetenten Hefezellen versetzt und kurz gemischt. Zu dem Gemisch werden 600 µl frisch angesetztes PEG/LiAC gegeben und durch Invertieren vermischt. Es folgt ein Inkubationsschritt für 40 Minuten bei 30 °C und 220 UpM auf dem Schüttler. Anschließend werden 70 µl DMSO zugegeben, kurz invertiert und die Hefe bei 42 °C für 15 Minuten im Heizblock inkubiert. Danach werden die Zellen zunächst für zwei Minuten auf Eis gelagert und schließlich für fünf Minuten bei 2000 UpM und Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 250 µl autoklaviertem  $\text{ddH}_2\text{O}$  resuspendiert und durch einen erneuten Zentrifugationsschritt für fünf Minuten bei 2000 UpM und Raumtemperatur gewaschen. Das Pellet wird nun in 150 µl sterilem  $\text{ddH}_2\text{O}$  resuspendiert und mithilfe von autoklavierten Glasperlen werden die Zellen auf Selektionsplatten ausplattiert. Diese werden für vier bis sechs Tage bei 30 °C inkubiert. Die transformierten Zellen, die beide Vektoren aufgenommen haben, besitzen beide Selektionsmarker und können auf den Selektionsplatten wachsen.

#### 4.4.2 Überstreichen der Hefekolonien auf Induktionsplatten

Die auf den Selektionsplatten gewachsenen Hefekolonien werden mithilfe von autoklavierten Zahnstochern auf den Induktionsplatten ausgestrichen. Im Anschluss werden die Platten für zwei bis drei Tage bei 30 °C inkubiert. Wenn eine Interaktion der getesteten Proteine vorliegt, wachsen Hefekolonien auf den Induktionsplatten und verfärben sich aufgrund der Umsetzung von X- $\alpha$ -Gal durch die Galactosidase MEL1 blau.

### 4.5 Arbeiten mit *Drosophila* S2 Zellen

#### 4.5.1 Haltung und Aussäen von *Drosophila* S2 Zellen

Die Zellen werden bei 25 °C in sterilen Kulturflaschen gehalten und zweimal in der Woche passagiert. Dazu werden 2,5 ml der Zellsuspension mit 2,5 ml frischem Medium in eine neue kleine Kulturflasche überführt. Für die Transfektion werden die Zellen zunächst in Wellplatten ausgesät. Mittels einer Neubauer Zählkammer kann die Zellzahl pro Milliliter bestimmt werden. Dafür werden 10 µl der unverdünnten Zellsuspension in die Kammer gegeben und insgesamt 4x16 Kästchen ausgezählt. Der Mittelwert der ausgezählten Kästchen wird mit dem Kammerfaktor multipliziert und anschließend kann die gewünschte Verdünnung berechnet werden.

#### 4.5.2 Transfektion von *Drosophila* S2 Zellen

Die Transfektion der S2 Zellen erfolgt mithilfe des FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega, Mannheim). Dafür werden 0,5 µg der DNA pro Well eingesetzt. Um eine Expression von Konstrukten unter UAS-Kontrolle zu ermöglichen, müssen zusätzlich 0,5 µg Aktin-Gal4 zugegeben werden. Zu der DNA werden 20 µl Medium gegeben, das Gemisch anschließend mit 4,5 µl FuGENE® HD versetzt und für fünf bis zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird das Gemisch zu den ausgesäten Zellen gegeben. Zur Aufnahme der DNA werden die Zellen für 48 Stunden bei 25 °C inkubiert. Um an den transfizierten S2 Zellen Immunfluoreszenzfärbungen durchzuführen, wird eine neue Wellplatte mit Glasplättchen bestückt und mit jeweils 200 µl Poly-L-Lysin beschichtet. Nach einem Inkubationsschritt von 20 Minuten wird das Poly-L-Lysin abgenommen. Die Zellen werden nun in die neue Wellplatte überführt. Nach etwa zwei Stunden, in denen die Zellen absinken und sich an die beschichteten Glasplättchen anheften, kann mit der Fixierung begonnen werden.

#### 4.5.3 Fixierung von *Drosophila* S2 Zellen

Die Zellen werden für 15 Minuten in 500 µl 4 % F-PBS fixiert und anschließend zweimal für fünf Minuten mit 500 µl PBS gewaschen. Es folgt die Permeabilisierung mit 500 µl 0,5 % Triton-X100 in PBS für zweieinhalb Minuten. Danach werden die Zellen erneut zweimal für fünf Minuten mit 500 µl PBS gewaschen.

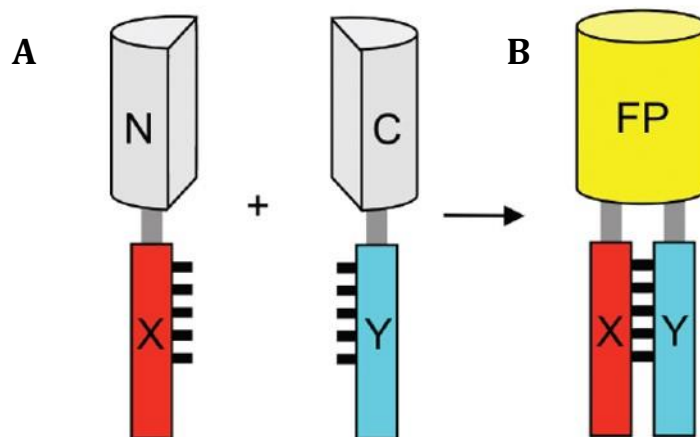
#### 4.5.4 Antikörpernachweis an *Drosophila* S2 Zellen

Um unspezifische Bindestellen abzusättigen, werden die Zellen nach der Fixierung für 30 Minuten in 500 µl 3 % BSA/PBS geblockt. Das Deckgläschen wird anschließend mithilfe einer Präpariernadel und einer Pinzette aus der Wellplatte entnommen und mit der Zellseite nach unten in einen 20 µl Tropfen des in PBS verdünnten Antikörpers gelegt. Die Inkubation erfolgt im Dunkeln für zwei Stunden bei Raumtemperatur in einer Feuchtekammer. Der primäre Antikörper wird durch kurzes Schwenken des Deckgläschens in PBS abgewaschen und es folgt die Inkubation mit dem sekundären Antikörper unter Lichtausschluss für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Feuchtekammer. Die DNA wird mittels Hoechst markiert. Dafür werden die Zellen erneut für zehn Minuten im Dunkeln in der Feuchtekammer inkubiert. Die Deckgläschen werden erneut dreimal in PBS und anschließend dreimal in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und in einem Tropfen Fluoromount-G™ eingebettet.

#### 4.5.5 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (Bimolecular Fluorescence Complementation, BiFC)

(Hu et al., 2002; Review: Kodana und Hu, 2012)

Das BiFC System dient dem Nachweis direkter Proteininteraktionen in der Zellkultur. Benötigt werden dafür spezielle Vektoren, die jeweils das N- beziehungsweise C-terminale Fragment des Venus YFP enthalten. Die offenen Leserahmen der auf Interaktion zu testenden Proteine müssen daher zunächst in die entsprechenden Vektoren kloniert werden (Abb. 4.7 A). Die Plasmid-Konstrukte werden zusammen mit Aktin-Gal4 in S2 Zellen transfiziert (siehe 4.5.2). Bei einer Interaktion der entstehenden Fusionsproteine werden die Teilfragmente in räumliche Nähe zueinander gebracht. Es kommt zu einer Komplementation des YFP (Abb. 4.7 B), welche mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops aufgenommen werden kann.



**Abb. 4.7: Schematische Darstellung der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation.** Die Interaktionskandidaten werden mit dem N- oder C-terminalen Fragment des Venus YFP fusioniert (A). Bei einer Interaktion der Proteine kommt es zur Komplementation (B). (Modifiziert nach Kodana und Hu, 2012).

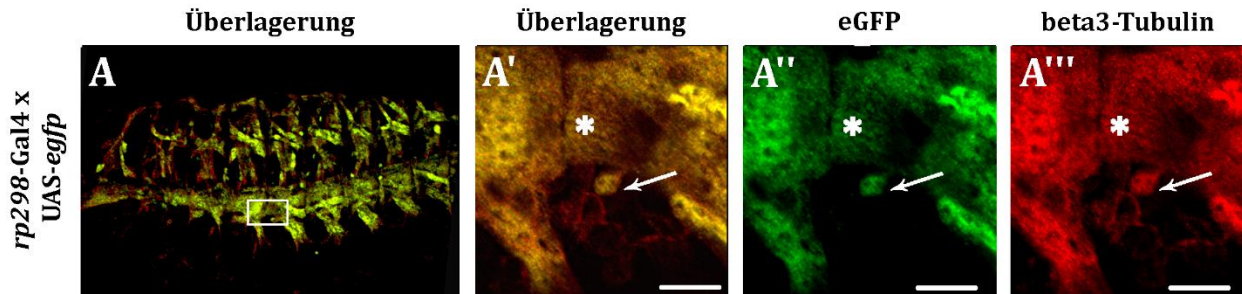
## 5. Ergebnisse

N-Cadherin lokalisiert in Embryonen an der Membran der Myoblasten (Dottermusch-Heidel et al., 2012). Aufgrund des abgeschwächten Fusionsdefektes der *N-cadherin;schizo* Doppelmutante im Vergleich zu der *schizo*-Einzelmutante wurde postuliert, dass N-Cadherin vor der Fusion von den Kontaktstellen der Membranen entfernt werden muss. Der Abstand zwischen FC/wachsender Myotube und adhärerender Myoblaste wird dadurch verringert und es kann zur Fusion kommen (Dottermusch-Heidel et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob der Fusionsprozess in *schizo*-mutanten Myoblasten vor der Bildung einer Fusionspore stoppt und welche Proteine an der Internalisierung von N-Cadherin beteiligt sind.

### 5.1 *schizo*-Mutanten zeigen Defekte bei der Bildung der Fusionspore

In *schizo*-Mutanten ist ein starker Fusionsdefekt erkennbar, bei welchem keine Fusionen stattfinden (Chen et al., 2003; Dottermusch-Heidel et al., 2012). Die Zelladhäsion scheint in den Mutanten nicht gestört zu sein (Dottermusch-Heidel et al., 2012). Der *schizo*-mutante Phänotyp basiert vermutlich auf einem Defekt bei dem Abbau von N-Cadherin von den Plasmamembranen (Dottermusch-Heidel et al., 2012). Dadurch können diese nicht mehr in unmittelbare Nähe gebracht werden und es kann sich vermutlich keine Fusionspore bilden. Um zu überprüfen, ob es in *schizo*-Mutanten zu einer Bildung von Fusionsporen kommt, wurde ein GFP-Diffusionsversuch durchgeführt. Dafür wurde zunächst eine Fliegenlinie, welche *egfp* unter UAS-Kontrolle trägt, in den *schizo*-mutanten Hintergrund eingekreuzt. Diese Linie wurde anschließend mit einer Fliegenlinie verkreuzt, welche den Treiber *rp298-Gal4* im *schizo*-mutanten Hintergrund trägt. Da das Gal4 mithilfe der *rp298-Gal4* Treiberlinie spezifisch in FCs exprimiert wird, kann das eGFP-Signal zunächst auch nur in den FCs detektiert werden. Nur wenn es zu einer Vesikulierung der Membranen kommt und eine Fusionspore gebildet wird, kann das eGFP von den FCs/wachsenden Myotuben in die FCMs diffundieren und auch dort nachgewiesen werden. Zur Kontrolle des Experiments wurde die UAS-*egfp* tragende Fliegenlinie mit der *rp298-Gal4* tragenden Treiberlinie, beide im wildtypischen Hintergrund, verkreuzt. Die Embryonen der Kreuzungen wurden gesammelt, fixiert und die Muskeln sowie alle Myoblasten wurden durch einen Antikörpernachweis gegen das muskelspezifische  $\beta$ 3-Tubulin sichtbar gemacht. Auch die Detektion des eGFP erfolgte mittels Antikörpernachweis. Für die Auswertung des Versuches wurden die Embryonen am Mikroskop betrachtet. Dabei wurden Myoblasten aufgenommen, welche an eine wachsende Myotube adhäreren.

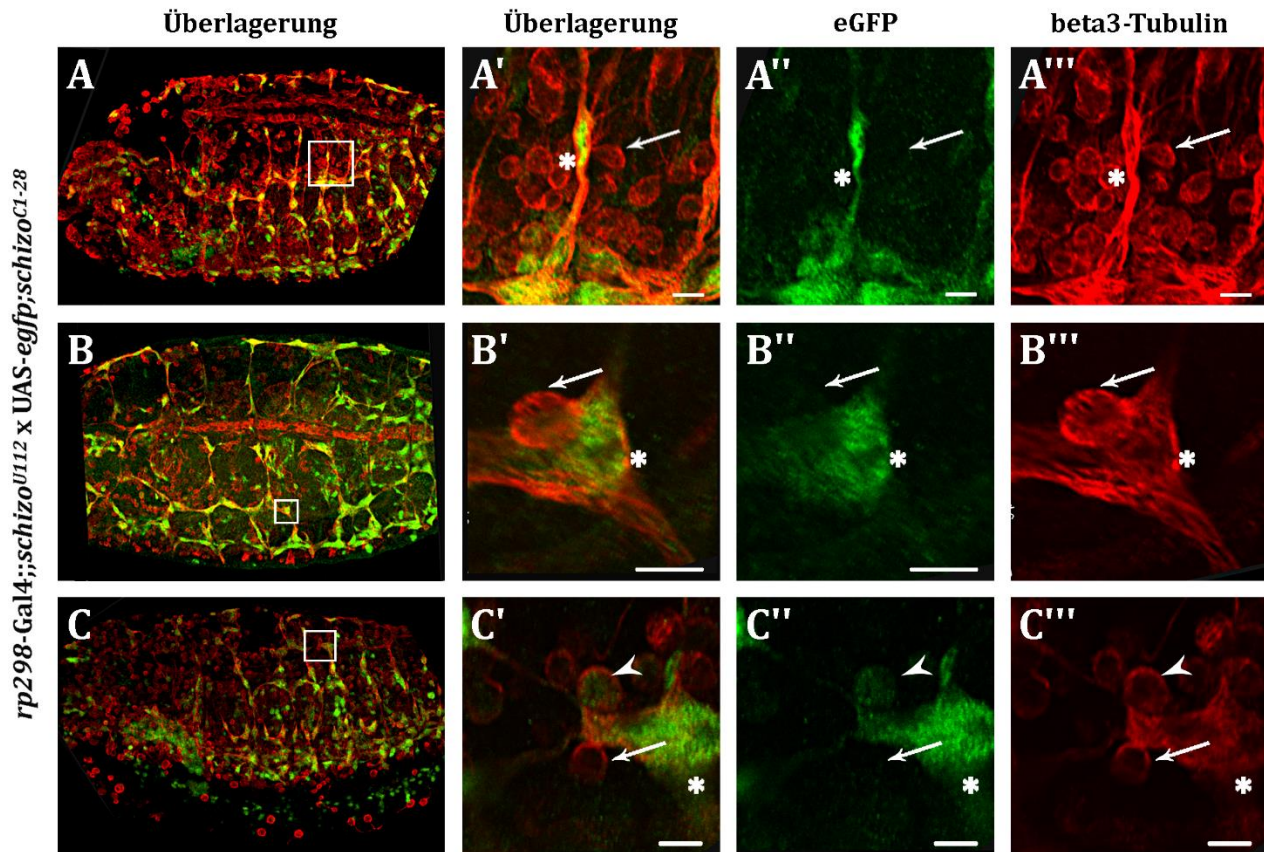
Im Wildtyp war das eGFP-Signal in den sich bildenden Myotuben sowie in den FCMs detektierbar (Abb. 5.1 A). Dies wurde besonders in der Vergrößerung sichtbar (Abb. 5.1 A'-A'''), in der eine FCM gezeigt ist (Abb. 5.1 A'-A''', Pfeil), welche an eine Myotube adhärte (Abb. 5.1 A'-A''', Sternchen).



**Abb. 5.1: Im wildtypischen Hintergrund diffundierte eGFP in die FCMs.** Die Übersicht zeigt das eGFP-Signal in den sich bildenden Myotuben und den adhärerenden FCMs (A). In den Vergrößerungen ist eine FCM zu sehen (A'-A''', Pfeil), welche an eine Myotube adhärte (A'-A''', Sternchen). In dieser Myoblaste war das eGFP-Signal deutlich detektierbar. Anterior ist links, posterior rechts, gezeigt ist ein Embryo in Stadium 15. Maßstabsbalken: 10  $\mu$ m; grün: eGFP; rot:  $\beta$ 3-Tubulin.

Als nächstes wurden *schizo*-mutante Embryonen analysiert. Drei Embryonen sind sowohl in der Übersicht (Abb. 5.2 A-C) als auch in der Vergrößerung gezeigt (Abb. 5.2 A'-A''', B'-B''', C'-C'''). Die betrachteten Embryonen zeigten einen starken Fusionsdefekt, bei dem neben den langgestreckten FCs zahlreiche unfusionierte Myoblasten zu erkennen waren (Abb. 5.2 A-C). Das eGFP-Signal war in den FCs der Mutanten detektierbar (Abb. 5.2 A' und A'', B' und B'', C' und C'', Sternchen). In den meisten adhärerenden FCMs hingegen konnte sowohl im frühen Stadium der Fusion (Abb. 5.2 A-A''', Pfeile) als auch zu einem weiter fortgeschrittenen Zeitpunkt kein eGFP-Signal detektiert werden (Abb. 5.2 B'-B''', C'-C''', Pfeile). Vereinzelt wurden jedoch auch adhärerende FCMs beobachtet, in denen eGFP nachgewiesen werden konnte (Abb. 5.2 C'-C''', Pfeilköpfe).





**Abb. 5.2:** In der *schizo*-Mutante diffundierte eGFP in den meisten Fällen nicht in die FCMs. *UAS-egfp* wurde im *schizo*-mutanten Hintergrund spezifisch in FCs exprimiert. Myotuben sowie alle Myoblasten wurden durch einen Antikörpernachweis der muskelspezifischen  $\beta$ 3-Tubulins sichtbar gemacht. Auch das eGFP wurde mithilfe eines Antikörpers nachgewiesen. Der *schizo*-mutante Phänotyp der Embryonen im Stadium 15 war in den jeweiligen Übersichten zu erkennen (A-C). In den Vergrößerungen war das eGFP-Signal in den langgestreckten FCs detektierbar (A'-A''', B'-B'''' und C'-C''', Sternchen). Die meisten adhärierenden FCMs zeigten kein eGFP-Signal (A'-A''', B'-B'''' und C'-C''', Pfeile). Lediglich in vereinzelt FCMs konnte ein eGFP-Signal detektiert werden (C'-C''', Pfeilkopf). Anterior ist links, posterior rechts. Maßstabsbalken: 5  $\mu$ m; grün: eGFP; rot:  $\beta$ 3-Tubulin.

Der eGFP-Diffusionsversuch hat gezeigt, dass es bei der Myotubenbildung im Wildtyp aufgrund der Bildung von Fusionsporen häufig zur Diffusion von eGFP in die FCMs kam. Im Gegensatz zum Wildtyp war die Fusionsporenbildung in *schizo*-Mutanten jedoch überwiegend unterdrückt. Dieses Experiment bestätigt die Annahme, dass *schizo*-Mutanten keine Fusionspore mehr bilden können und die Membranen intakt bleiben.

## 5.2 Welcher Endocytosemechanismus ist an der Internalisierung von N-Cadherin beteiligt?

Die Ergebnisse, dass *schizo*-Mutanten keine Fusionsporen mehr bilden können, bestätigen die Annahme, dass die Membranen aufgrund von N-Cadherin nicht mehr in unmittelbare Nähe gebracht werden können. Zwar wird vermutet, dass Schizo die Internalisierung von N-Cadherin reguliert, der daran beteiligte Endocytoseweg konnte bislang jedoch nicht identifiziert werden (Dottermusch-Heidel et al., 2012).

In der Literatur sind verschiedene Clathrin-abhängige sowie Clathrin-unabhängige Endocytosemechanismen beschrieben. Ein Protein, welches bei beiden Mechanismen eine Rolle spielen kann, ist Dynamin (Ferguson und De Camilli, 2012). Deshalb wurde zunächst dessen mögliche Beteiligung an der Internalisierung von N-Cadherin untersucht.

### 5.2.1 Das Dynamin Drp1 co-lokalisierte in S2 Zellen möglicherweise mit N-Cadherin, jedoch nicht mit Schizo

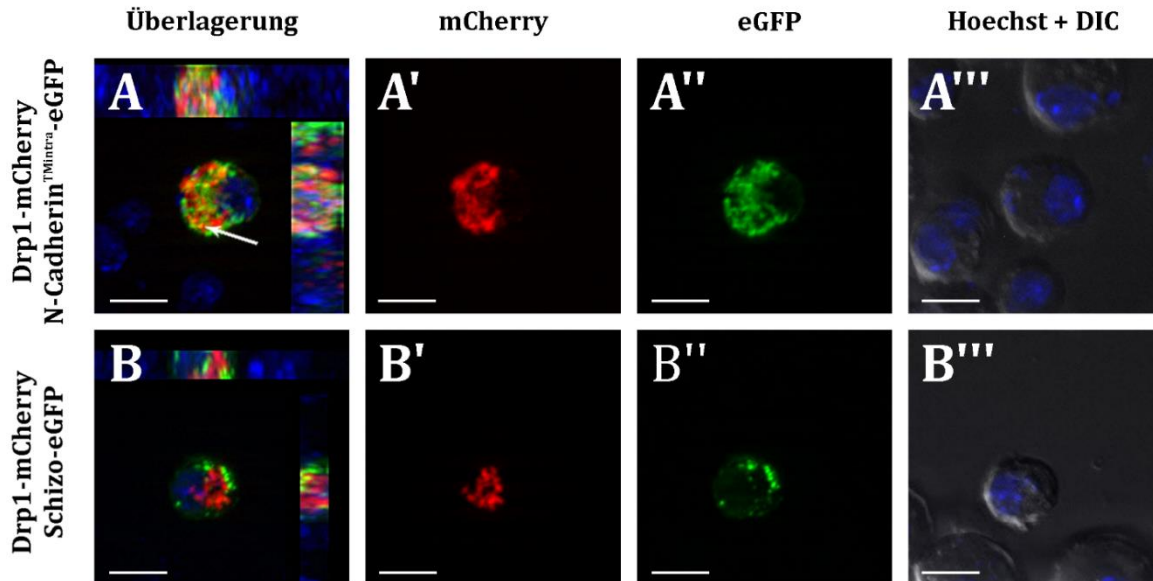
Dynamine gehören zu den sogenannten großen GTPasen und sind an zahlreichen Endocytoseprozessen beteiligt. Dabei übernehmen sie hauptsächlich eine Funktion bei der Abschnürung der Vesikel (Praefcke und McMahon, 2004; Ferguson und De Camilli, 2012). In *D. melanogaster* sind mehrere Proteine beschrieben, welche der Dynamin-Superfamilie zugeordnet werden können. Shibire ist beispielsweise das Ortholog des klassischen Dynamins aus Vertebraten (Chen et al., 1991; van der Blik und Meyerowitz, 1991), das Dynamin-ähnliche Protein 1 (Dynamin-related protein 1, Drp1) entspricht dem Dynamin 1-like (DNM1L). Zudem gibt es noch ein OPA1-ähnliches Protein (Optic atrophy 1) sowie die Proteine Fuzzy Onion, Marf, Past1 und CG9297 (Flybase), auf die im weiteren Verlauf jedoch nicht weiter eingegangen wird.

In früheren Studien wurde bereits eine Rolle von Shibire während der Muskelentwicklung von *D. melanogaster* analysiert (Dottermusch-Heidel et al., 2012). Durch die Expression eines dominant negativ-wirkenden Fusionsproteins konnte zwar ein Fusionsdefekt verursacht werden, dieser ließ sich jedoch vermutlich auf eine fehlerhafte Determination der Myoblasten zurückführen. Ein Dynamin-Antikörpernachweis an mit *schizo*-eGFP transfizierten *Drosophila* S2 Zellen zeigte zudem keine eindeutige Co-Lokalisation zwischen den beiden Proteinen (Dottermusch-Heidel et al., 2012). Auch der Phänotyp einer zu diesem Zeitpunkt nicht näher charakterisierten *drp1*-mutanten Fliegenlinie wurde bereits in früheren Experimenten analysiert (Masterarbeit C. Braukmann, 2012). Dabei konnten leichte Defekte bei der Ausbildung der somatischen Muskulatur im Embryo gezeigt werden, was auf eine Funktion während der Myoblastenfusion hindeuten könnte. Unklar blieb jedoch, ob diese Defekte, wie auch bei Shibire, auf eine fehlerhafte Determination der Myoblastentypen

zurückzuführen sind und ob Shibre und Drp1 in Redundanz wirken können (Masterarbeit C. Braukmann, 2012).

Um Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von Drp1 an der Internalisierung von N-Cadherin zu erlangen, wurden zunächst Co-Lokalisationsstudien in S2 Zellen durchgeführt. Dafür wurde der gesamte offene Leserahmen von *drp1* in einen pUAS-Vektor mit C-terminalem mCherry-Anhang kloniert und anschließend mit *schizo*-eGFP oder *N-cadherin*<sup>TMintra</sup>-eGFP Konstrukten und *aktin*-Gal4 in Zellen co-transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden fixiert und unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Es sind sowohl die Überlagerungen und die Schnittansichten der beiden Achsen (Abb. 5.3 A-B) der mCherry- (Abb. 5.3 A'-B') und eGFP-Kanäle (Abb. 5.3 A''-B'') als auch der DNA-Nachweis mittels Hoechst gezeigt (Abb. 5.3 A'''-B''').

Sowohl das Drp1-mCherry Fusionsprotein (Abb. 5.3 A' und B') als auch das N-Cadherin<sup>TMintra</sup>-eGFP Fusionsprotein lokalisierten in intrazellulären vesikulären Strukturen. N-Cadherin<sup>TMintra</sup>-eGFP zeigte überdies noch eine Lokalisation im Bereich der Plasmamembran (Abb. 5.3 A''). Eine Co-Lokalisation der beiden Fusionsproteine schien im Cytoplasma der Zelle partiell möglich zu sein (Abb. 5.3 A, Pfeil). Die Co-Transfektion von *drp1*-mCherry (Abb. 5.3 B') und *schizo*-eGFP (Abb. 5.3 B'') ließ keine Co-Lokalisation erkennen (Abb. 5.3 B).



**Abb. 5.3:** Drp1-mCherry könnte partiell mit N-Cadherin<sup>TMintra</sup>-eGFP co-lokalisieren, jedoch nicht mit Schizo-eGFP. Co-Transfektion von S2 Zellen mit *drp1*-mCherry und *N-cadherin*<sup>TMintra</sup>-eGFP sowie *drp1*-mCherry und *schizo*-eGFP. Das Drp1-mCherry Fusionsprotein akkumulierte in vesikulären Strukturen (A'-B'). N-Cadherin<sup>TMintra</sup>-eGFP lokalisierte sowohl in der Nähe der Plasmamembran als auch in intrazellulären Vesikel-ähnlichen Strukturen (A''). Eine partielle Co-Lokalisation mit Drp1-mCherry könnte im Cytoplasma

möglich sein (A, Pfeil). Auch das Schizo-eGFP Fusionsprotein lokalisierte in vesikulären Strukturen (B''), co-lokalisierte jedoch nicht mit Drp1-mcherry (B). Maßstabsbalken: 5  $\mu\text{m}$ ; grün: GFP; rot: mCherry; blau: Hoechst zum Nachweis der DNA.

Aufgrund der partiellen Co-Lokalisation besteht weiterhin die Möglichkeit einer Beteiligung von Drp1 am Abbau von N-Cadherin. Da Drp1 jedoch hauptsächlich in die Teilung der Mitochondrien involviert ist (Sesaki et al., 2014) und zudem bislang lediglich eine partielle Co-Lokalisation zwischen Drp1 und N-Cadherin, nicht jedoch Drp1 und Schizo zu beobachten war, wurde dieser Ansatz im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt.

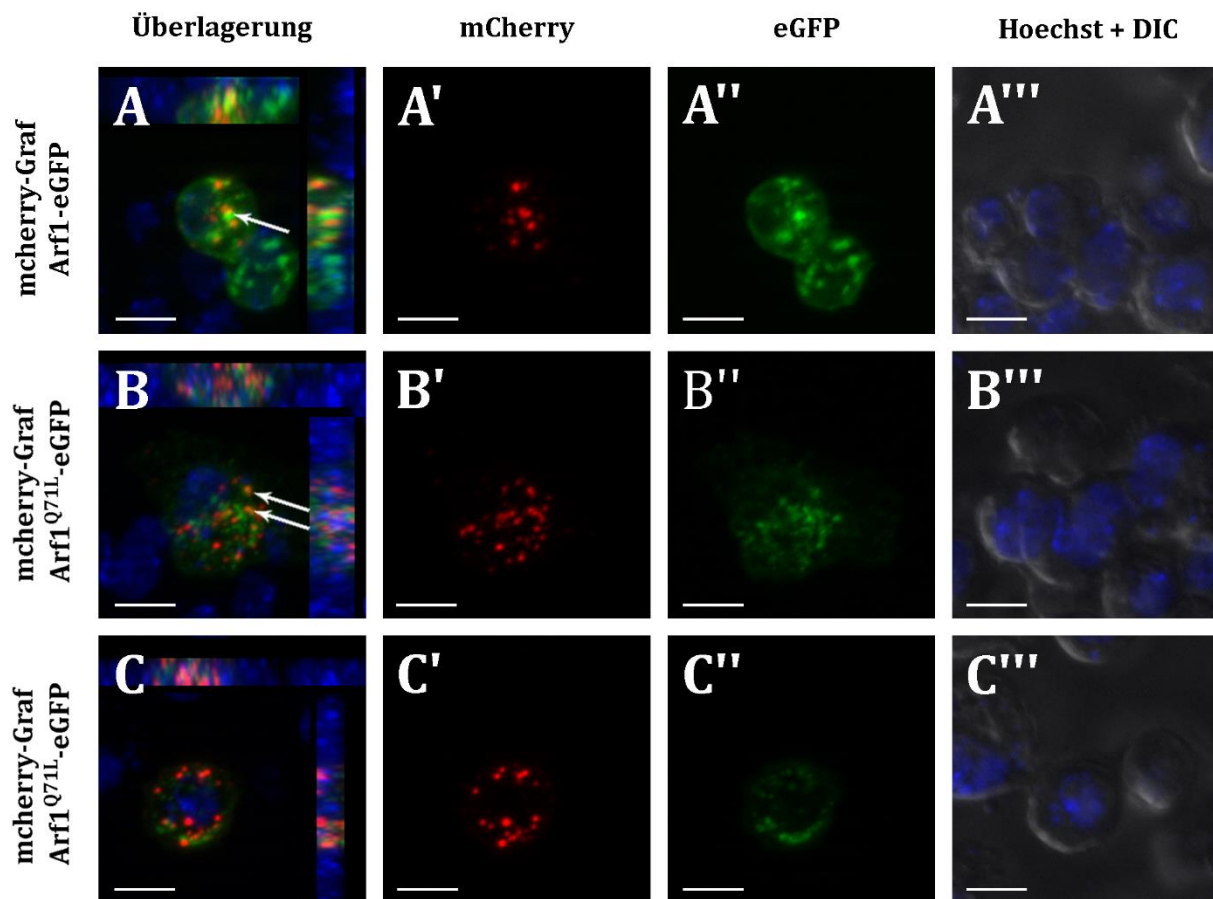
## 5.2.2 Analysen zur möglichen Funktion von Graf während der Myoblastenfusion von *D. melanogaster*

### 5.2.2.1 Graf co-lokalisierte transient mit Arf1 und aktiviertem Arf1 in *Drosophila* S2 Zellen

Interaktionsstudien im Embryo sowie im Hefe 2-Hybridsystem zeigten, dass Arf1 in *D. melanogaster* während der Myoblastenfusion mit Schizo interagiert (Dottermusch-Heidel et al., 2012). In S2 Zellen war zudem eine Co-Lokalisation der beiden Proteine zu sehen (Dottermusch-Heidel et al., 2012). In Vertebraten wurde gezeigt, dass Arf1 für die Dynamin-unabhängige, durch Cdc42 regulierte CLIC/GEEC Endocytose benötigt wird (Kumari und Mayor, 2008). In aktivierter Form vermittelt es dabei wahrscheinlich die Aktivierung der AHRGAP10-GTPase, welche die Aktivität von Cdc42 reguliert. Durch die Aktivierung wird Cdc42 zur Plasmamembran rekrutiert und initiiert die für die Endocytose benötigte Aktinpolymerisation (Kumari und Mayor, 2008). Ein weiteres Protein, welches in Vertebraten im Zusammenhang mit der Arf1-vermittelten CLIC/GEEC Endocytose beschrieben wurde, ist Graf1. Bei diesem Prozess könnte Arf1 für die Bildung der tubulären Einschnürungen zuständig sein, Graf1 für deren Stabilisierung (El-Sayed und Harashima, 2013).

Um zu untersuchen, ob Graf und Arf1 auch in *D. melanogaster* zusammen in einem Endocytoseweg wirken können und möglicherweise mit Schizo an der Internalisierung von N-Cadherin beteiligt sind, wurden zunächst Co-Lokalisationsstudien in S2 Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden mit den Konstrukten mCherry-graf (Masterarbeit J. Hamp, 2012) und arf1-eGFP (Dissertation C. Dottermusch, 2010) sowie mCherry-graf und konstitutiv aktiviertem Arf1, arf1<sup>Q71L</sup>-eGFP (Dissertation C. Dottermusch, 2010), und aktin-Gal4 co-transfiziert, anschließend fixiert und mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops betrachtet. Abbildung 5.4 zeigt die Überlagerungen (Abb. 5.4 A-C) der mCherry (Abb. 5.4 A'-C') und eGFP (Abb. 5.4 A''-C'') Kanäle sowie den DNA-Nachweis mittels Hoechst

(Abb. 5.4 A'''-C'''). Sowohl mCherry-Graf (Abb. 5.4 A'-C') als auch Arf1-eGFP (Abb. 5.8 A'') und Arf1<sup>Q71L</sup>-eGFP (Abb. 5.4 B'' und C'') zeigten eine Lokalisation in Vesikel-ähnlichen Strukturen. Das Fusionsprotein mCherry-Graf co-lokalisierte transient mit Arf1-eGFP (Abb. 5.4 A, Pfeil), sowie mit Arf1<sup>Q71L</sup>-eGFP (Abb. 5.4 B, Pfeile). Allerdings gab es auch vesikuläre Strukturen, in denen keine Co-Lokalisation zwischen Graf und Arf1 beziehungsweise Graf und Arf1<sup>Q71L</sup> zu erkennen war (Abb. 5.4 A und C).



**Abb. 5.4: mCherry-Graf co-lokalisierte transient mit Arf1-eGFP und Arf1<sup>Q71L</sup>-eGFP.** S2 Zellen wurden mit mCherry-*graf* und *arf1*-eGFP sowie mit mCherry-*graf* und *arf1*<sup>Q71L</sup>-eGFP Konstrukten co-transfiziert. Arf1-eGFP (A'), Arf1<sup>Q71L</sup>-eGFP (B'' und C'') und mCherry-Graf (A'-C') lokalisierten in vesikulären Strukturen. In der Überlagerung waren partielle Co-Lokalisationen zwischen mCherry-Graf und Arf1-eGFP (A, Pfeil) sowie zwischen mCherry-Graf und Arf1<sup>Q71L</sup>-eGFP (B, Pfeile) zu erkennen. Jedoch war nicht in allen Zellen eine Co-Lokalisation zu detektieren (C) Maßstabsbalken: 5 µm; grün: GFP; rot: mCherry; blau: Hoechst zur Markierung der DNA.

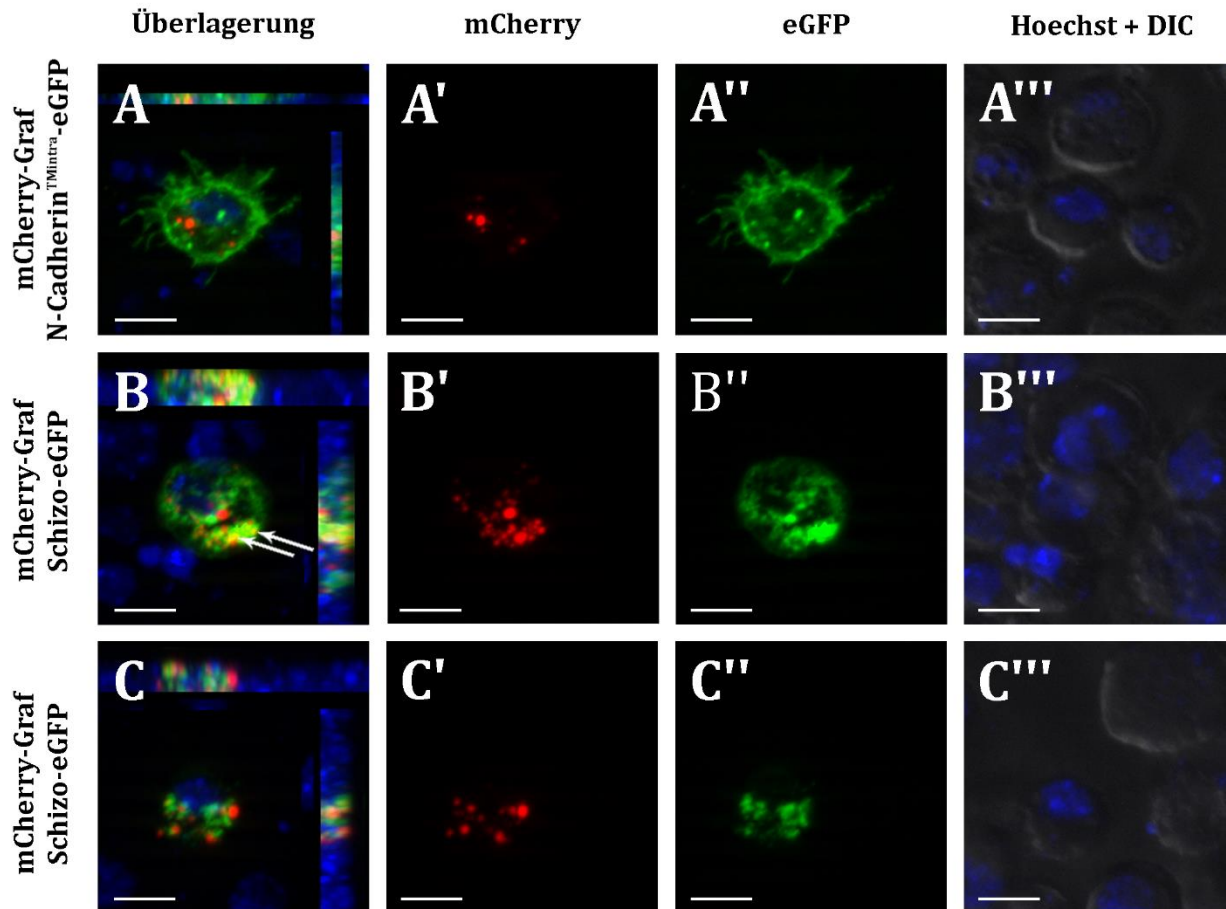
Die beobachtete partielle Co-Lokalisation zwischen den Fusionsproteinen mCherry-Graf und Arf1-eGFP sowie mCherry-Graf und Arf1<sup>Q71L</sup>-eGFP könnte darauf hindeuten, dass diese Proteine auch in *D. melanogaster in vivo* gemeinsam in einem Endocytoseweg wirken. Als nächstes wurde untersucht, ob Graf auch mit Schizo und N-Cadherin in *Drosophila* S2 Zellen co-lokalisiert und auf Proteinebene interagiert.

### 5.2.2.2 Graf co-lokalisierte in *Drosophila* S2 Zellen transient mit Schizo

Falls Graf eine Rolle bei der Internalisierung von N-Cadherin spielt, sollten auch eine partielle Co-Lokalisationen mit N-Cadherin sowie Schizo zu detektieren sein. Mithilfe von Studien in transfizierten *Drosophila* S2 Zellen sollten die in früheren Experimenten beobachteten Co-Lokalisationen (Masterarbeit J. Hamp, 2012) bestätigt und Hinweise auf eine mögliche Interaktion zwischen N-Cadherin und Graf sowie Schizo und Graf gewonnen werden. Verwendet wurden Konstrukte, welche bereits im Rahmen früherer Arbeiten generiert wurden. Bei *schizo* (Dissertation C. Dottermusch, 2010) und *graf* (Masterarbeit J. Hamp, 2012) wurde der gesamte offene Leserahmen hinter eine UAS-Sequenz kloniert, bei *N-cadherin<sup>TMintra</sup>* (Dissertation V. Groth, 2012) nur der Bereich, der für die intrazelluläre Domäne sowie die Transmembrandomäne codiert. Zusätzlich wurden die Proteine entweder mit einem mCherry- oder einem eGFP-Anhang versehen. Die *Drosophila* S2 Zellen wurden sowohl mit mCherry-*graf* und *schizo*-eGFP als auch mit mCherry-*graf* und *N-cadherin<sup>TMintra</sup>*-eGFP Konstrukten co-transfiziert. Mithilfe des UAS-Gal4 Systems wurden die Konstrukte durch eine Co-Transfektion mit *aktin*-Gal4 in den Zellen exprimiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Gezeigt sind jeweils die Überlagerungen (Abb. 5.5 A-C) der mCherry- (Abb. 5.5 A'-C') und eGFP-Kanäle (Abb. 5.5 A''-C'') sowie der DNA-Nachweis mittels Hoechst (Abb. 5.5 A'''-C''').

Das N-Cadherin<sup>TMintra</sup>-eGFP Fusionsprotein lokalisierte in S2 Zellen vermehrt an der Zellmembran und vereinzelt in Vesikel-ähnlichen Strukturen (Abb. 5.5 A'). mCherry-Graf konnte in fixierten Zellen in vesikulären Strukturen beobachtet werden (Abb. 5.5 A'-C'). Eine Co-Lokalisation zwischen mCherry-Graf und N-Cadherin<sup>TMintra</sup>-eGFP war in fixierten Zellen nicht nachweisbar (Abb. 5.5 A). Auch Schizo-eGFP lokalisierte in vesikulären Strukturen (Abb. 5.5 B'' und C''). Zwischen den mCherry-Graf und Schizo-eGFP Fusionsproteinen war sowohl eine Co-Lokalisation (Abb. 5.5 B, Pfeile) als auch ein Nachweis in verschiedenen Vesikel-ähnlichen Strukturen (Abb. 5.5 C) zu erkennen.





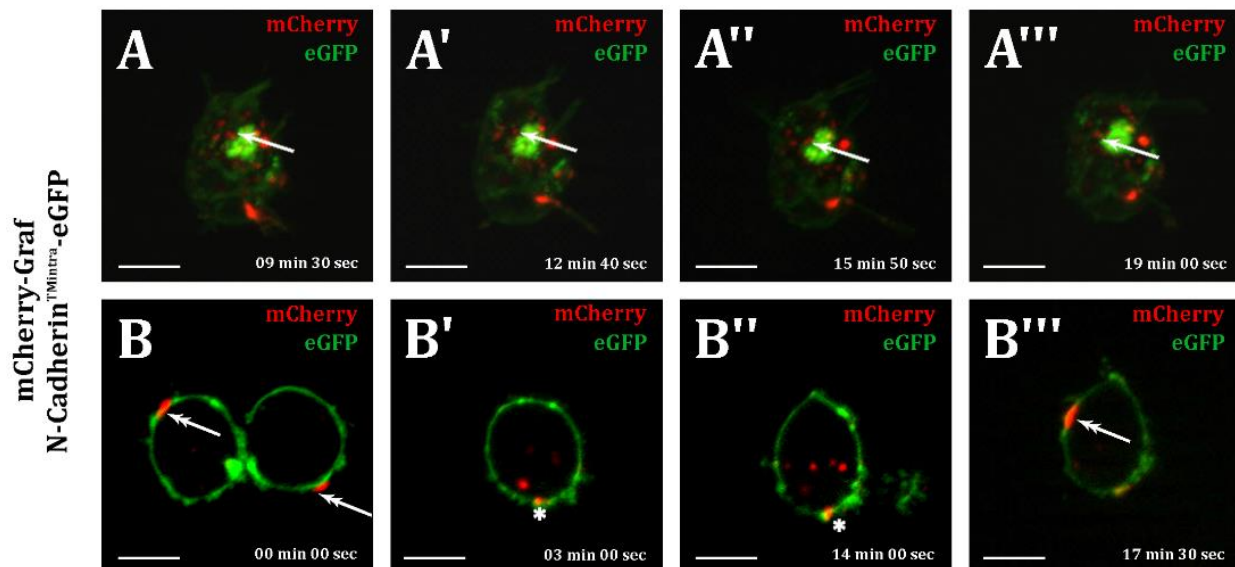
**Abb. 5.5: Transiente Co-Lokalisationen konnten in S2 Zellen zwischen mCherry-Graf und Schizo-eGFP beobachtet werden, jedoch nicht zwischen mCherry-Graf und N-Cadherin<sup>TMintra</sup>-eGFP.** N-Cadherin<sup>TMintra</sup>-eGFP lokalisierte an der Zellmembran und vereinzelt in Vesikel-ähnlichen Strukturen (A'). Sowohl mCherry-Graf (A'-C') als auch Schizo-eGFP (B'' und C'') lokalisierten in vesikulären Strukturen. Zwischen N-Cadherin<sup>TMintra</sup>-eGFP und mCherry-Graf konnten keine Co-Lokalisationen beobachtet werden (A), Schizo-eGFP und mCherry-Graf co-lokalisierten transient (B, Pfeile und C). Maßstabsbalken: 5 µm; grün: GFP; rot: mCherry; blau: Hoechst zur Markierung der DNA.

### 5.2.2.3 In Live-Imaging Studien lokalisierte Graf transient mit N-Cadherin an der Membran

In fixierten S2 Zellen konnte keine Co-Lokalisation zwischen Graf und N-Cadherin beobachtet werden. Um eine möglicherweise sehr kurze, transiente Co-Lokalisation zu untersuchen, wurden zusätzlich Live-Imaging Studien durchgeführt. Dazu wurden S2 Zellen mit mCherry-*graf* sowie *N-cadherin*<sup>TMintra</sup>-eGFP und *aktin*-Gal4 co-transfiziert und ohne Fixierung am Mikroskop betrachtet. Einzelne, mit beiden Konstrukten transfizierte Zellen wurden für jeweils 25 Minuten gefilmt. Dabei

wurden mehrere Ebenen innerhalb der Zellen aufgenommen. Die Zeitintervalle zwischen den einzelnen Aufnahmen waren deshalb abhängig von der Ebenenanzahl.

Exemplarisch für die beobachteten Zellen sind in Abb. 5.6 zwei Zellen im Verlauf der Aufnahmen gezeigt. In der ersten Zelle (Abb. 5.6 A-A''') lokalisierte das N-Cadherin<sup>TMintra</sup>-eGFP Fusionsprotein im Bereich der Membranen. Zudem war eine Akkumulation im Cytoplasma der Zelle zu erkennen. mCherry-Graf lokalisierte in vesikulären Strukturen, welche sich in der Zelle bewegten (Abb. 5.6 A-A''', Pfeile). In der zweiten Zelle war eine Lokalisation von N-Cadherin<sup>TMintra</sup>-eGFP an der Zellmembran zu erkennen (Abb. 5.6 B-B'''). Auch das mCherry-Graf Fusionsprotein zeigte eine Lokalisation im Bereich der Membran (Abb. 5.6 B und B''', Doppelpfeile) und co-lokalisierte dort möglicherweise transient mit N-Cadherin<sup>TMintra</sup>-eGFP (Abb. 5.6 B' und B'', Sternchen).



**Abb. 5.6: Live-Imaging Einzelbilder von *N-cadherin*<sup>TMintra</sup>-eGFP und *mCherry-graf* co-transfizierten S2 Zellen zeigten eine transiente Co-Lokalisation.** N-Cadherin<sup>TMintra</sup>-eGFP lokalisierte vermutlich an der Plasmamembran (B-B'''). Außerdem war in einer Zelle (A-A''') eine Akkumulation im Cytoplasma erkennbar. Das mCherry-Graf Fusionsprotein lokalisierte in den Zellen in sich im Verlauf der Aufnahme bewegenden vesikulären Strukturen (A-A''', Pfeile). Zudem war mCherry-Graf wahrscheinlich im Bereich der Membran lokalisiert (B und B''', Doppelpfeile) und zeigte dort eventuell eine Co-Lokalisation mit N-Cadherin<sup>TMintra</sup>-eGFP (B' und B'', Sternchen). Maßstabsbalken: 5 µm; grün: GFP; rot: mCherry.

N-Cadherin<sup>TMintra</sup>-eGFP lokalisierte an der Membran der transfizierten S2 Zellen. Auch mCherry-Graf schien transient im Bereich der Membran zu lokalisieren. Eine partielle Co-Lokalisation der beiden Proteine ist daher möglich und verstärkt die Vermutung, dass Graf an der Internalisierung von

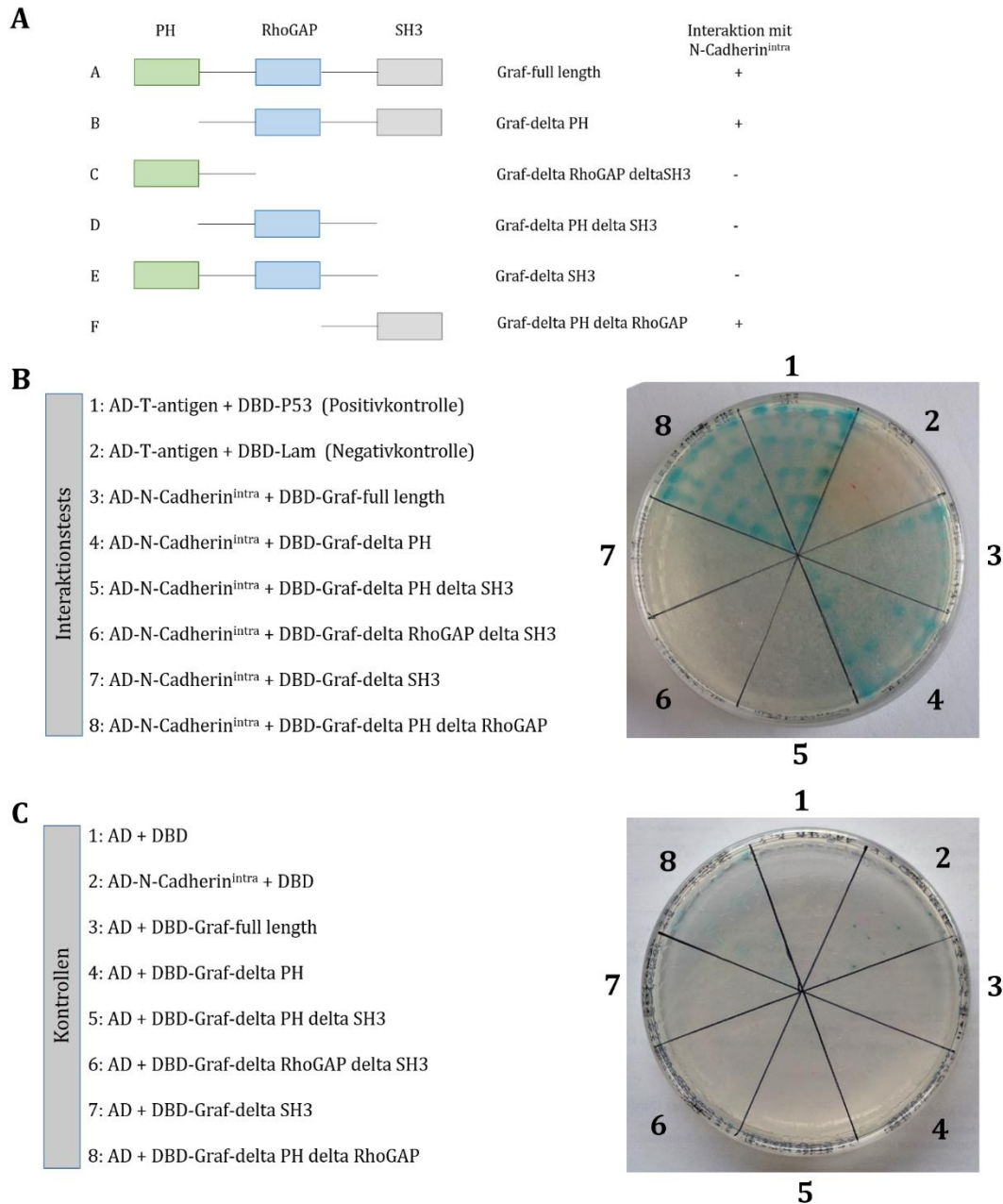


N-Cadherin beteiligt sein könnte. Ob die beobachtete Co-Lokalisation auf einer Proteininteraktion beruht, wurde im Folgenden analysiert.

#### 5.2.2.4 N-Cadherin interagiert im Hefe 2-Hybrid System mit Graf über dessen SH3-Domäne

Nach der mittels Live-Imaging Studien beobachteten partiellen Co-Lokalisation zwischen N-Cadherin und Graf an der Membran von transfizierten S2 Zellen sollte auch eine mögliche direkte Interaktion auf Proteinebene untersucht werden. Dafür wurde das Hefe 2-Hybrid System verwendet. Von *graf* war lediglich eine verkürzte cDNA verfügbar, welche die N-terminale BAR-Domäne nicht vollständig umfasst. Diese verkürzte Variante wurde in früheren Studien bereits im gesamten Mesoderm überexprimiert, führte jedoch nicht zu einem Fusionsdefekt (Masterarbeit J. Hamp, 2012). Der gesamte verfügbare offene Leserahmen von *graf* wurde in die Hefe-Expressionsvektoren pGADT7 (mit Aktivierungsdomäne, AD) und pGBKT7 (mit DNA-Bindedomäne, DBD) kloniert und zusammen mit N-Cadherin<sup>intra</sup> (Dissertation V. Groth, 2011) in Hefe co-exprimiert. Eine Interaktion der zu testenden Proteine ließ sich mittels Wachstum und Blaufärbung der Hefe auf Induktionsplatten nachweisen.

Eine schematische Übersicht der Domänen von Graf ist in Abb. 5.7 A zu sehen. In *D. melanogaster* besteht Graf aus einer PH-, einer RhoGAP- sowie einer C-terminalen SH3-Domäne. Da die verwendete cDNA die N-terminale BAR-Domäne nicht umfasst, wurde die Domäne in diesem Schema nicht berücksichtigt. Eine direkte Interaktion zwischen DBD-Graf full length und AD-N-Cadherin<sup>intra</sup> konnte im Hefe 2-Hybrid System gezeigt und wiederholt bestätigt werden (Abb. 5.7 B 3). Aufgrund dieser Ergebnisse sollte auch getestet werden, welche Domäne von Graf für die Interaktion essentiell ist. Bei einer Deletion der SH3-Domäne konnte keine Interaktion mit der intrazellulären Domäne von N-Cadherin beobachtet werden (Abb. 5.7 B 5-7). Verkürzte Proteinvarianten, welche entweder nur die SH3-Domäne oder sowohl die RhoGAP- als auch die SH3-Domäne umfassten, zeigten bei Co-Expression mit AD-N-Cadherin<sup>intra</sup> eine direkte Interaktion auf Proteinebene, welche durch Wachstum und Blaufärbung der Hefe zu erkennen war (Abb. 5.7 B 3,4 und 8). In den Kontrollen (Abb. 5.7 C 1-8) war zu sehen, dass lediglich DBD-Graf-delta PH delta RhoGAP eine sehr leichte Autoinduktion zeigte (Abb. 5.7 C 8). Alle anderen Proteine interagierten nicht mit den co-exprimierten Leervektoren.

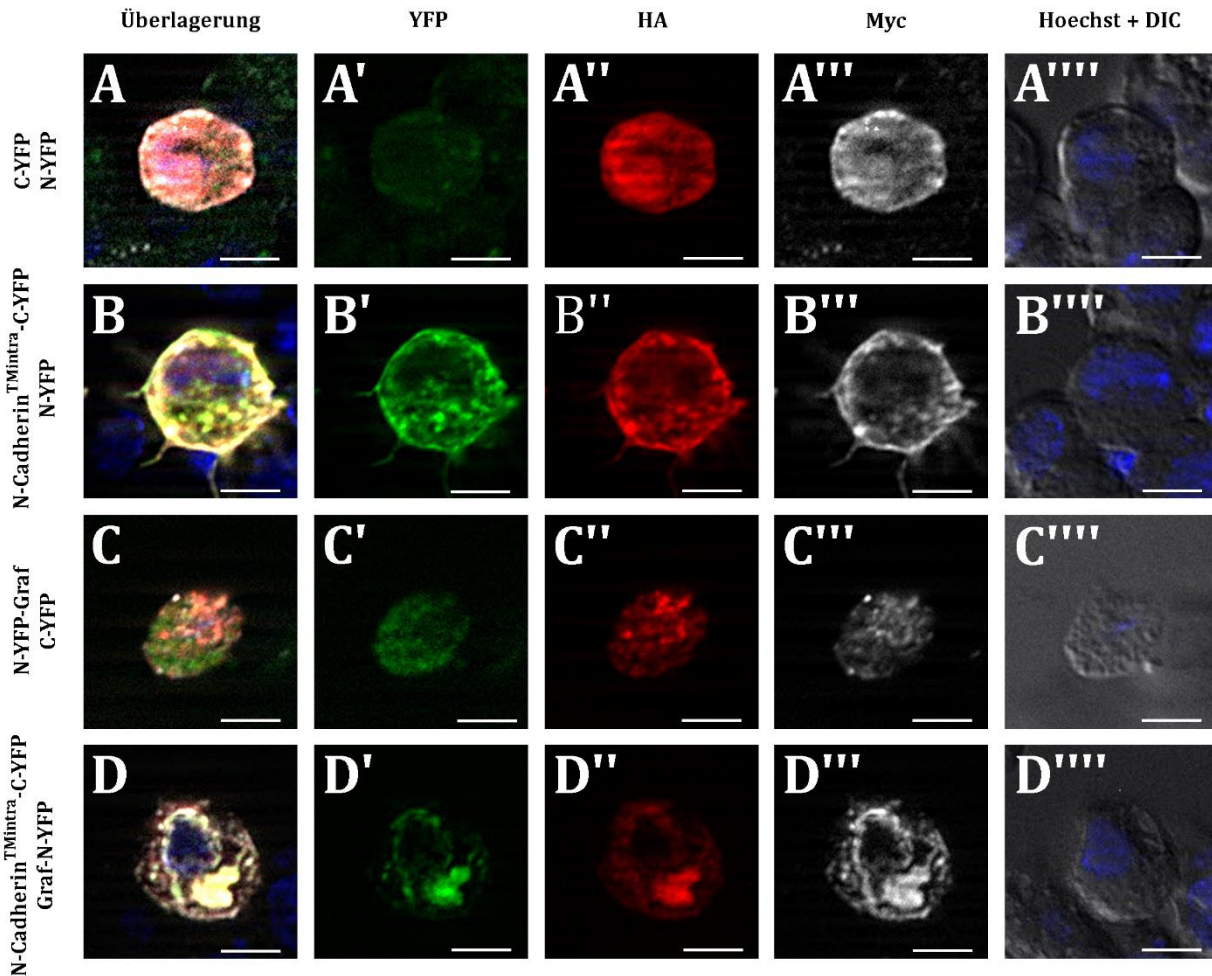


**Abb. 5.7: Die SH3-Domäne von Graf interagiert mit der intrazellulären Domäne von N-Cadherin.** Eine schematische Übersicht der generierten *graf*-Konstrukte sowie die Ergebnisse der Interaktionstests mit dem *N-cadherin*<sup>TMintra</sup>-Konstrukt sind in A gezeigt. DBD-Graf-full length (3) sowie DBD-Graf-delta PH (4) und DBD-Graf-delta PH delta RhoGAP (8) interagierten mit AD-N-Cadherin<sup>TMintra</sup> (B 3, 4 und 8). Die Kontrollen auf Autoinduktion der einzelnen Konstrukte sind in C zu sehen (1-8). Bis auf das Fusionsprotein DBD-Graf-delta PH delta RhoGAP, welches ein leichtes Wachstum und eine leichte Blaufärbung zeigte (C 8), sind alle anderen Kontrollen auf Autoinduktion negativ gewesen.

Im Hefesystem interagiert Graf direkt mit N-Cadherin<sup>intra</sup>. Um zu untersuchen, welche Domäne für die Interaktion mit N-Cadherin<sup>intra</sup> essentiell ist, wurden verkürzte Proteinvarianten generiert. In weiteren Tests zeigte sich, dass die SH3-Domäne von Graf für die Interaktion essentiell ist. Auch diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass ein Graf-abhängiger Endocytoseweg an der Internalisierung von N-Cadherin beteiligt ist.

#### 5.2.2.5 Die BiFC-Analysen zur Interaktion zwischen Graf und N-Cadherin lieferten kein verlässliches Ergebnis

Die im Hefe 2-Hybrid System gezeigte Interaktion zwischen N-Cadherin<sup>intra</sup> und Graf sollte mithilfe der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC) bestätigt werden. Dazu wurden zunächst der gesamte offene Leserahmen von *graf* sowie die Transmembran- und intrazelluläre Domäne von *N-cadherin* in die dafür benötigten Vektoren (N-YFP und C-YFP) kloniert. S2 Zellen wurden mit N-YFP-*graf* und *N-cadherin*<sup>TMintra</sup>-C-YFP co-transfiziert. Der N-YFP Vektor hat zusätzlich einen HA-Anhang, der C-YFP Vektor trägt einen Myc-Anhang. Mittels Antikörpernachweis der beiden Anhänge wurden für die Auswertung Zellen ausgewählt, in denen beide Fusionsproteine nachweisbar waren. Gezeigt sind jeweils die Überlagerung (Abb. 5.8 A-D) der YFP- (Abb. 5.8 A'-D'), HA- (Abb. 5.8 A''-D'') und Myc-Antikörpernachweise (Abb. 5.8 A'''-D''') sowie der DNA-Nachweis mittels Hoechst (Abb. 5.8 A''''-D'''). Zur Kontrolle des Experiments wurde auch auf eine Interaktion der beiden Leervektoren miteinander sowie der zu untersuchenden Proteine mit dem entsprechenden Leervektor hin getestet. Bei einer Co-Transfektion beider Leervektoren war im YFP-Kanal lediglich ein Hintergrundsignal detektierbar (Abb. 5.8 A'). Das N-Cadherin<sup>TMintra</sup>-C-YFP Fusionsprotein hingegen zeigte eine falsche Interaktion mit dem N-YFP-Leervektor, welche durch ein deutliches YFP-Signal nachweisbar war (Abb. 5.8 B'). N-YFP-Graf scheint nicht mit dem C-YFP Leervektor zu interagieren, ein Hintergrundsignal ist jedoch trotzdem sichtbar (Abb. 5.8 C'). Auch bei einer Co-Transfektion von N-YFP-*graf* und *N-cadherin*<sup>TMintra</sup>-C-YFP war ein YFP-Signal detektierbar (Abb. 5.8 D').



**Abb. 5.8: Die Interaktionstests zwischen Graf und N-Cadherin mittels BiFC-Versuch in S2 Zellen waren nicht auswertbar.** Co-Transfektionen der Zellen mit beiden Leervektoren, mit *N-cadherin*<sup>TM</sup><sub>Mintra</sub>-C-YFP und dem N-YFP Leervektor sowie mit N-YFP-*graf* und dem C-YFP Leervektor wurden zur Kontrolle des Experiments durchgeführt. Für den Test auf Interaktion wurden die S2 Zellen mit N-YFP-*graf* und *N-cadherin*<sup>TM</sup><sub>Mintra</sub>-C-YFP co-transfiziert. Die Einzelkanäle für den YFP- (A'-D'), HA- (A''-D'') und Myc-Nachweis (A'''-D''') sowie der DNA-Nachweis mittels Hoechst (A''''-D'') sind auch in der jeweiligen Überlagerung gezeigt (A-D). Bei einer Co-Transfektion der beiden Leervektoren war keine Interaktion zu erkennen (A), das N-Cadherin<sup>TM</sup><sub>Mintra</sub>-C-YFP Fusionsprotein interagierte scheinbar mit dem N-YFP Leervektor (B'). N-YFP-Graf co-transfiziert mit dem C-YFP Leervektor zeigte wiederum nur ein Hintergrundsignal (C). Ein YFP-Signal war bei einer Co-Transfektion mit N-YFP-*graf* und *N-cadherin*<sup>TM</sup><sub>Mintra</sub>-C-YFP zu detektieren, allerdings war dieses Ergebnis aufgrund der falsch positiven Kontrolle nicht verlässlich (D'). Maßstabsbalken: 5 µm; grün: YFP; rot: HA; grau: Myc; blau: Hoechst zur Markierung der DNA.

Aufgrund der Interaktion des N-Cadherin<sup>TMintra</sup>-C-YFP Fusionsproteins mit dem N-YFP Leervektor konnte die im Hefesystem beobachtete Interaktion zwischen Graf und N-Cadherin<sup>intra</sup> mithilfe des BiFC Systems nicht bestätigt werden.

### **5.3 Erfolgt während der Myoblastenfusion eine Signalweiterleitung von N-Cadherin zum Aktincytoskelett?**

Studien in Vertebraten zeigten, dass Aktin an der Abschnürung der Vesikel bei der Clathrin-abhängigen Endocytose beteiligt ist (McMahon und Boucrot, 2011). Weiterhin deuten Zellkulturexperimente darauf hin, dass Aktin die Beugung der Membran erleichtert und dadurch auch zur Bildung der Vesikel beitragen kann (Harris und Tepass, 2010-a). Der Arp2/3 Komplex, welcher für die Aktinpolymerisation benötigt wird, kann dabei entweder durch Cortactin oder durch WASp aktiviert werden (McMahon und Boucrot, 2011). WASp liegt in einem auto-inhibierten Zustand vor und kann durch die Bindung an Cdc42 aktiviert werden. Dadurch wird eine Interaktion zwischen WASp und dem Arp2/3 Komplex ermöglicht, die zur Aktivierung des Komplexes führt (Harris und Tepass, 2010-a). Bei der CLIC/GEEC-Endocytose in Vertebraten wurde ein Zusammenwirken von Cdc42 und Graf1 bei der Bildung der Vesikel beschrieben. Die beiden Proteine interagieren dabei direkt miteinander, wodurch Cdc42 vermutlich inaktiviert wird (Francis et al., 2015). Aufgrund dieser Kenntnisse aus der Literatur sollte untersucht werden, ob Cdc42 zusammen mit Graf und Schizo bei der Endocytose von N-Cadherin wirken und es durch Cdc42 eventuell auch zu einer Aktivierung der Aktinnukleatoren kommen könnte.

#### **5.3.1 Schizo interagiert im Hefe 2-Hybridsystem weder mit Graf noch mit Cdc42**

Erste Interaktionstests wurden mithilfe des Hefe 2-Hybridsystems durchgeführt. Da bislang nur eine verkürzte Variante von Schizo in den Hefe-Expressionsvektoren vorhanden war, wurde für dieses Experiment zunächst der gesamte offene Leserahmen von *schizo* in den pGADT7- sowie den pGBKT7-Expressionsvektor kloniert. Neben den Tests mit den an Endocytoseprozessen beteiligten Proteinen Graf und Cdc42 wurde Schizo full length auch auf Interaktion mit N-Cadherin getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst. Die in früheren Versuchen mit einer verkürzten Proteinvariante bereits gezeigte Interaktion zwischen Schizo und N-Cadherin (Dissertation V. Groth, 2011) konnte auch mit Schizo full length beobachtet werden. Eine Interaktion zwischen Schizo und Graf sowie Schizo und Cdc42 war im Hefesystem nicht nachweisbar.

**Tabelle 5.1: Schizo interagiert im Hefe 2-Hybridsystem mit N-Cadherin, jedoch nicht mit Graf und Cdc42.** Die Interaktion zwischen Schizo und N-Cadherin konnte auch mit der full length Variante von Schizo bestätigt werden. Im Gegensatz dazu konnte keine Interaktion von Schizo mit Graf oder Cdc42 beobachtet werden. (+) Interaktion; (-) keine Interaktion. Es wurden drei unabhängige Interaktionstests zur Bestätigung des Ergebnisses durchgeführt.

Protein	Interaktion mit Schizo
N-Cadherin	+
Cdc42	-
Graf	-

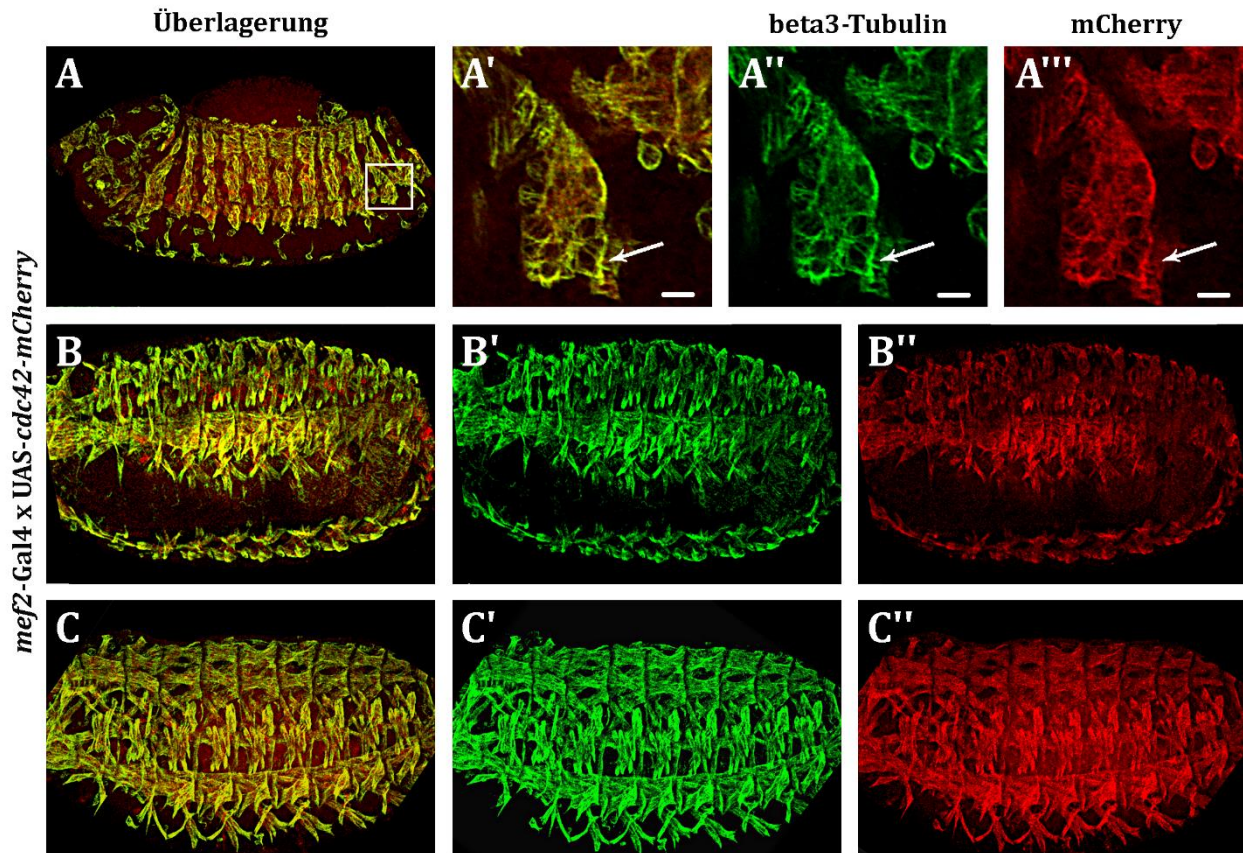
Die Interaktionstests im Hefe 2-Hybridsystem bestätigten zwar die Interaktion zwischen N-Cadherin und Schizo zeigten aber keine Interaktion zwischen Schizo und Graf sowie Schizo und Cdc42 auf Proteinebene. Auch zwischen Cdc42 und Graf konnte im Hefe 2-Hybridsystem keine direkte Interaktion gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

### 5.3.2 In frühen Stadien der Embryonalentwicklung schien Cdc42-mCherry an den Membranen zu lokalisieren, in Stadium 16 hingegen im Cytoplasma

Durch Interaktionstests im Hefe 2-Hybridsystem konnten bislang keine Hinweise darauf gewonnen werden, ob Cdc42 an der Endocytose von N-Cadherin beteiligt sein könnte. Mithilfe von Studien in *Drosophila* S2 Zellen sollte deshalb als nächstes untersucht werden, ob Cdc42 mit Schizo, N-Cadherin oder Graf co-lokalisiert. Dazu wurde der gesamte offene Leserahmen von *cdc42* in einen pUAS-Expressionsvektor mit einem C-terminalen mCherry-Anhang kloniert und das Fusionsprotein mithilfe des UAS-Gal4 Systems in *Drosophila* S2 Zellen exprimiert. Aufgrund der Beteiligung von Cdc42 an verschiedenen Endocytoseprozessen wurde eine Lokalisation in vesikulären Strukturen erwartet. Hingegen dieser Vermutung lokalisierte das Cdc42-mCherry Fusionsprotein jedoch im Cytoplasma der Zelle (Daten nicht gezeigt). Da die Lokalisationsstudien in S2 Zellen kein verlässliches Ergebnis lieferten, wurden transgene Fliegenlinien generiert. Mithilfe der *Mef2*-Gal4 Treiberlinie wurde das *cdc42*-mCherry Konstrukt in allen Myoblasten exprimiert. Die Muskeln sowie alle Myoblasten wurden durch einen Antikörpernachweis gegen das muskelspezifische  $\beta$ 3-Tubulin sichtbar gemacht (Abb. 5.9 A', B' sowie C'), das Cdc42-mCherry Fusionsprotein durch einen Antikörpernachweis des mCherry-Anhangs (Abb. 5.9 A'', B'' und C''). In Stadium 14/15 der Entwicklung (Abb. 5.9 A) schien Cdc42-mCherry an den Membranen zu lokalisieren (Abb. 5.9 A'-A'''),



Pfeil). Die Embryonen in Stadium 16, nach Abschluss der Myoblastenfusion, zeigten ein nahezu wildtypisches Muskelmuster (Abb. 5.9 B und C). Das Cdc42-mCherry Fusionsprotein lokalisierte in diesem Stadium im Cytoplasma der Muskeln (Abb. 5.9 B'' sowie C'').

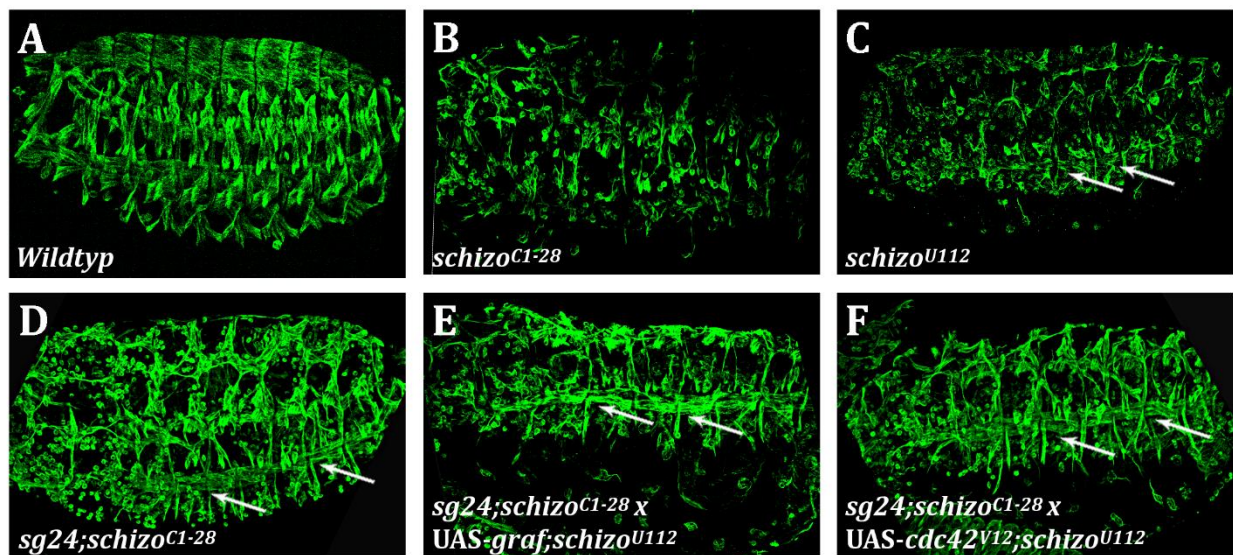


**Abb. 5.9: Cdc42-mCherry schien zunächst an den Membranen der Muskeln zu lokalisieren, später im Cytoplasma.** In Stadium 14 (A) lokalisierte Cdc42-mCherry an den Membranen der Myoblasten (A'-A''', Pfeil). In Stadium 16 hingegen war eine cytoplasmatische Lokalisation des Fusionsproteins zu detektieren (B-B'' sowie C-C''). Bei der phänotypischen Analyse der Embryonen war ein nahezu wildtypisches Muskelmuster zu sehen. Anterior ist links, posterior rechts. Grün:  $\beta$ 3-Tubulin, rot: mCherry.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das Cdc42-mCherry Fusionsprotein weder in S2 Zellen noch im Embryo in vesikulären Strukturen nachgewiesen werden. Aufgrund der an den Membranen der Myoblasten beobachteten Lokalisation des Fusionsproteins in Stadium 14 der Entwicklung ist eine Beteiligung an der Endocytose von N-Cadherin, welches zu diesem Zeitpunkt auch an den Membranen lokalisiert, weiterhin denkbar.

### 5.3.3 Die Expression von *graf<sup>full length</sup>* und aktiviertem *cdc42* im *schizo*-mutanten Hintergrund zeigten keine eindeutigen Rettungen

Frühere Studien zeigten, dass der Fusionsdefekt der *schizo*-Mutanten durch die Überexpression einer konstitutiv aktivierten Form von Arf1 partiell gerettet werden konnte (Dissertation C. Dottermusch, 2010). Wenn auch Graf oder Cdc42 in die durch Schizo regulierte Endocytose von N-Cadherin involviert sind, sollte es zu einer partiellen Rettung des *schizo*-mutanten Phänotyps kommen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden UAS-*graf<sup>full length</sup>* sowie eine konstitutiv aktivierte Form von Cdc42, UAS-*cdc42<sup>V12</sup>*, mithilfe einer *sg24;schizo<sup>C1-28</sup>* Treiberlinie im *schizo*-mutanten Hintergrund in allen Myoblasten exprimiert. Die Myotuben sowie alle Myoblasten wurden durch einen Antikörpernachweis des muskelspezifischen 3-Tubulins sichtbar gemacht. Im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 5.10 A) waren in den beiden *schizo*-mutanten Linien die Fusionsdefekte deutlich zu erkennen (Abb. 5.10 B und C). In der *schizo<sup>U112</sup>*-Mutante war jedoch die Bildung vereinzelter ventro-lateraler Muskeln zu beobachten (Abb. 5.10 C, Pfeile). Diese Muskeln waren auch in der *sg24;schizo<sup>C1-28</sup>* Treiberlinie ausgebildet (Abb. 5.10 D, Pfeile). Allerdings sollte es eigentlich in keiner der beiden Fliegenlinien zur Ausbildung dieser Muskeln kommen. Auch in den Embryonen der Rettungsexperimente mit *graf<sup>full length</sup>* sowie mit dem konstitutiv aktivierten *cdc42<sup>V12</sup>* waren diese ventro-lateralen Muskeln partiell gebildet (Abb. 5.10 E und F, Pfeile).



**Abb. 5.10:** Die Rettungen von *schizo* mit *graf<sup>full length</sup>* und *cdc42<sup>V12</sup>* zeigten wie die *sg24;schizo<sup>C1-28</sup>* Treiberlinie eine vereinzelt Ausbildung ventro-lateraler Muskeln. Die Myotuben und Myoblasten der Embryonen in Stadium 16 wurden durch einen Antikörpernachweis des muskelspezifischen  $\beta$ 3-Tubulins sichtbar gemacht. Im Wildtyp war das regelmäßige Muskelmuster gut zu erkennen (A). Die beiden



*schizo*-mutanten Linien hingegen zeigten einen starken Fusionsdefekt (B und C). Vereinzelte ventro-laterale Muskeln schienen jedoch in der *schizo*<sup>U112</sup> Mutante gebildet zu werden (C, Pfeile). Auch in der *sg24;schizo*<sup>C1-28</sup> Treiberlinie waren einige ventro-laterale Muskeln sichtbar (D, Pfeile). Zudem zeigten die beiden Rettungen mit *graf*<sup>full length</sup> sowie konstitutiv aktiviertem *cdc42*<sup>V12</sup> ausgebildete Muskeln im ventro-lateralen Bereich (E und F, Pfeile). Anterior ist links, posterior rechts.

Die Experimente lieferten keinen Hinweis darauf, dass Cdc42 in die Internalisierung von N-Cadherin involviert ist. Deshalb wurde in der Literatur nach weiteren Proteinen gesucht, welche durch eine Aktivierung der Aktinnukleatoren zu einer Umgestaltung des Aktincytoskeletts während der Endocytose beitragen könnten.

#### 5.3.4 Abi interagiert im Hefe 2-Hybridsystem mit Schizo und Graf

Ähnlich wie *schizo*-Mutanten zeigten auch *kette*-Mutanten einen starken Fusionsdefekt (Schröter et al., 2004). Auf ultrastruktureller Ebene stoppte die Myoblastenfusion in *kette*<sup>J4-48</sup>-Mutanten während der Ausbildung der elektronendichten Plaques. Im Vergleich zum Wildtyp waren diese Strukturen jedoch etwa zwei- bis dreimal so lang. Eine Vesikulierung der Membranen konnte nicht beobachtet werden (Schröter et al., 2004). Weiterhin deuten neueste Studien darauf hin, dass Kette an der Internalisierung von N-Cadherin beteiligt ist (Hamp et al., revised version). Im zentralen Nervensystem von *D. melanogaster* liegen Kette und Abi zusammen mit Sra1 und HSPC300 in einem Komplex vor und reprimieren die Aktivität des Scar/WAVE Komplexes (Bogdan und Klämbt, 2003). Eine weitere Funktion des Kette/Abi Komplexes ist vermutlich die Aktivierung von WASp an der Membran, dabei erfolgt die Interaktion mit WASp über Abi (Bogdan und Klämbt, 2003).

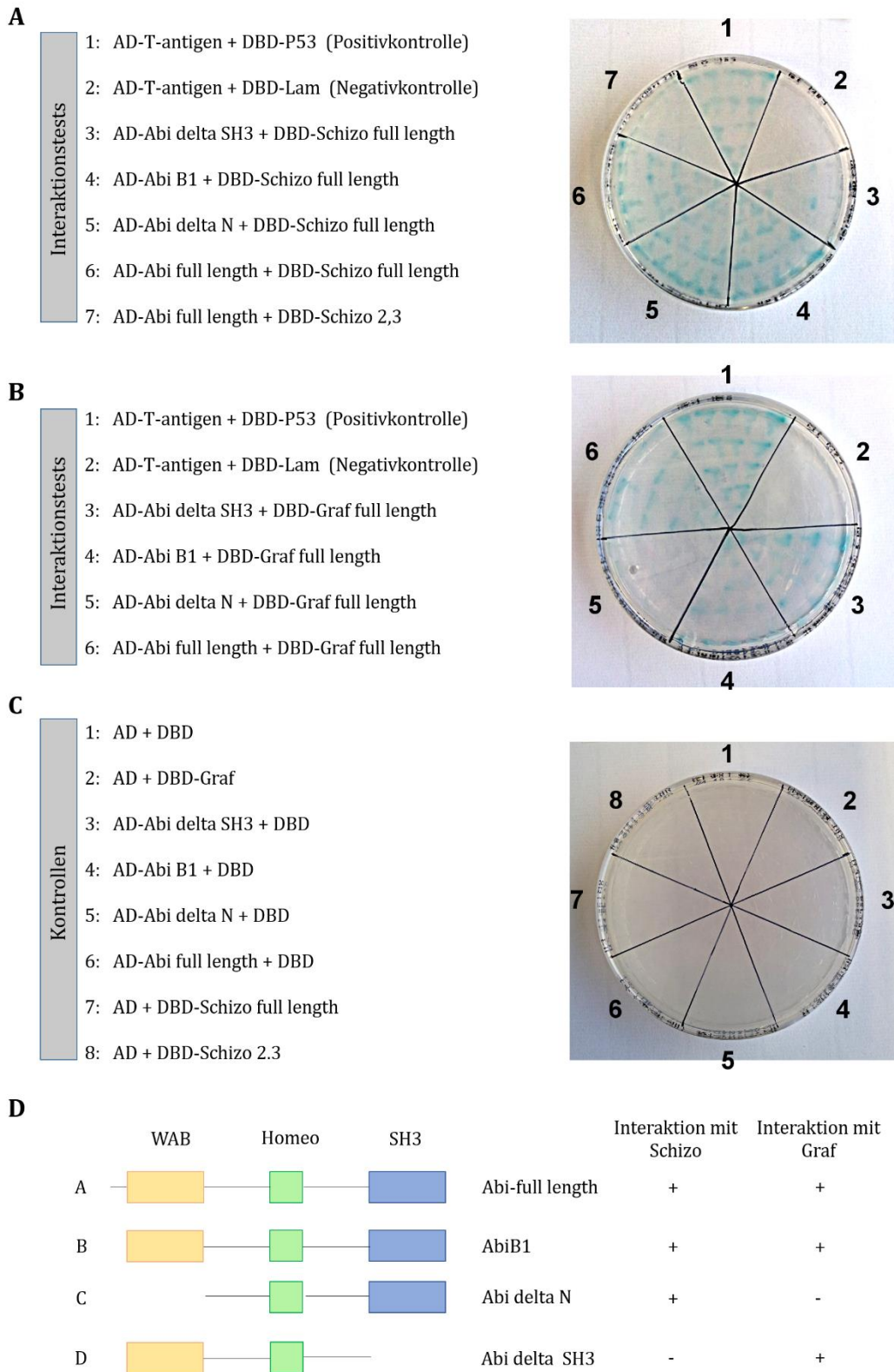
Zunächst sollte überprüft werden, ob N-Cadherin direkt mit den Scar/WAVE-Komplex Komponenten Kette und Abi oder dem Formin Dia interagieren und dadurch die Umgestaltung des Aktincytoskeletts an der Kontaktstelle initiieren kann. Dafür wurde das Hefe 2-Hybridsystem verwendet. Für die Interaktionstests wurden die gesamten offenen Leserahmen von *dia* und *abi* in die Hefe-Expressionsvektoren kloniert. In den zweimal durchgeführten Interaktionstests konnte jedoch keine direkte Interaktion zwischen N-Cadherin und Kette, N-Cadherin und Abi sowie N-Cadherin und Dia detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde als nächstes getestet, ob die mit N-Cadherin interagierenden Proteine Schizo und Graf mit den Aktinnukleatoren interagieren können. Die auf Interaktion zu testenden Proteine wurden in Hefe co-exprimiert. Zusätzlich wurden eine Positiv- sowie eine Negativkontrolle durchgeführt (Abb. 5.11 A, 1 und 2 und B, 1 und 2). Sowohl Kette als auch Dia zeigten

im Hefesystem keine Interaktion mit Schizo und Graf (Daten nicht gezeigt). Eine Co-Expression von Schizo und Abi hingegen zeigte eine deutliche Interaktion der beiden Fusionsproteine (Abb. 5.11 A, 6). Um den Bereich der Interaktion einzugrenzen, wurde der Test mit verschiedenen verkürzten Proteinvarianten von *abi* (Bogdan et al., 2005) sowie einer verkürzten Variante von *schizo* wiederholt, welche nur die N-terminalen 2,3 kB umfasst. Dieser Bereich ist auch für die Interaktion mit N-Cadherin essentiell (Dissertation V. Groth, 2011). Das im Rahmen dieser Arbeit generierte *abi full length* und *abiB1* (S. Bogdan, Münster) unterscheiden sich lediglich durch eine kleine N-terminale Deletion von 18 Basenpaaren des *abiB1*-Konstruktes. Bei einem Verlust der SH3-Domäne von Abi schienen die Proteine nicht mehr zu interagieren. Lediglich eine Kolonie wuchs in einem der Interaktionstests und zeigte eine leichte Blaufärbung (Abb. 5.11 A, 3). Sowohl zwischen DBD-Schizo und AD-AbiB1 als auch mit einer verkürzten Variante von Abi, bei welcher die N-terminale Wave-interagierende Domäne (WAB) deletiert wurde, AD-Abi delta N, war ein Wachstum der Hefekolonien sowie deren Blaufärbung zu erkennen (Abb. 5.11 A, 4 und 5). Auch die mit Abi interagierende Domäne von Schizo schien nicht im N-terminalen Bereich zu liegen. Bei einer Co-Transformation von Abi mit dem N-terminalen 2,3 kB Fragment von Schizo konnte keine Interaktion beobachtet werden (Abb. 5.11 A, 7).

Auch zwischen AD-Abi und DBD-Graf konnte eine Interaktion im Hefesystem gezeigt werden (Abb. 5.11 B, 6). Im Gegensatz zu der Interaktion mit Schizo schien jedoch die SH3-Domäne von Abi nicht für die Interaktion mit Graf essentiell zu sein. Ein Wachstum und die Blaufärbung der Hefe bei Co-Expression von Graf und Abi delta SH3 war deutlich zu erkennen (Abb. 5.11 B, 3). Eine Interaktion konnte auch mit AD-AbiB1 nachgewiesen werden (Abb. 5.11 B, 4). Bei einer Deletion der N-terminalen Wave-interagierenden Domäne (WAB) von Abi war jedoch keine Interaktion mehr detektierbar (Abb. 5.11 B, 5).

Um eine mögliche Autoinduktion auszuschließen, wurden die verwendeten Konstrukte mit dem jeweiligen Leervektor in der Hefe co-exprimiert. Alle Kontrollen zeigten kein Wachstum der Hefekolonien (Abb. 5.11 C, 1-8). Die verwendeten *abi*-Konstrukte sowie die Ergebnisse der Interaktionstests mit Schizo und Graf sind in Abb. 5. 11 D zusammengefasst.



**Abb. 5.11:** Für die Interaktion zwischen Abi und Schizo ist die SH3-Domäne von Abi essentiell, während die N-terminale WAVE-interagierende Domäne von Abi für die Interaktion mit Graf benötigt wird. Neben den Positiv- und Negativkontrollen (A, 1 und 2 sowie B, 1 und 2) wurde getestet, ob AD-Abi mit DBD-Schizo (A)

oder DBD-Graf (B) interagiert. Die beobachtete Interaktion zwischen DBD-Schizo und AD-Abi (A, 6) war nach Deletion der SH3-Domäne von Abi nicht mehr detektierbar (A, 3). Die Interaktion war auch mit AD-AbiB1 nachweisbar (A, 4). Zudem schien die WAVE-interagierende Domäne (WAB) von Abi für die Interaktion nicht essentiell zu sein (A, 5). Die N-terminalen 2,3 kB von Schizo umfassen nicht den interagierenden Bereich, bei Co-Expression dieser verkürzten Variante mit Abi konnte keine Interaktion mehr nachgewiesen werden (A, 7). Auch AD-Abi und DBD-Graf zeigten eine Interaktion (B, 6). Diese war ebenso zwischen DBD-Graf und AD-Abi delta SH3 (B, 3) sowie DBD-Graf und AD-AbiB1 zu erkennen (B, 4). Eine Deletion der WAVE-interagierenden Domäne von Abi führte zu einem Verlust der Interaktion mit Graf (B, 5). Alle durchgeführten Kontrollen zeigten keine Autoinduktion der verwendeten Konstrukte (C, 1-8). Eine Übersicht der Abi Fusionsproteine sowie die Ergebnisse der Interaktionstests mit Schizo und Graf sind in D zusammengefasst.

Schizo interagiert mit Abi, jedoch nicht mit Kette oder Dia. Für die Interaktion zwischen Schizo und Abi schien die SH3-Domäne von Abi essentiell zu sein. Bei *schizo* lag der interagierende Bereich nicht innerhalb der N-terminalen 2,3 kB des Gens. Zwischen Graf und Kette sowie Graf und Dia konnte keine Interaktion gezeigt werden. Graf interagiert jedoch mit Abi über dessen WAVE-interagierende Domäne. Die Domäne von Graf, welche für die Interaktion essentiell war, konnte nicht genau bestimmt werden. Bei den mehrfach durchgeführten Tests konnte zwar immer eine Interaktion zwischen Graf<sup>full length</sup> und Abi gezeigt werden, jedoch nicht mit den verkürzten Proteinvarianten von Graf (Daten nicht gezeigt).

Die mithilfe des Hefe 2-Hybridsystems gewonnenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass N-Cadherin zwar nicht direkt mit den Aktinregulatoren Abi, Kette und Dia interagiert, eine Verbindung zum Aktincytoskelett jedoch über Schizo und Graf vermittelt wird, welche mit Abi interagieren. Dabei bindet Schizo an die SH3-Domäne und Graf an die WAVE-interagierende Domäne von Abi.

### 5.3.5 Dock interagiert möglicherweise direkt mit N-Cadherin

Während der Myoblastenfusion wird Kette durch das SH2-SH3-Adapterprotein Dock an die Membran rekrutiert und initiiert dort möglicherweise die Auflösung N-Cadherin-vermittelter Adherens Junctions. An der Kontaktstellen reguliert Kette zudem die Aktivität von WASp und dem Scar/WAVE Komplex und damit indirekt die Arp2/3-vermittelte Aktinpolymerisation (Hamp et al., revised version). In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Dock sowohl mit den IgSF-Proteinen als auch mit Scar und WASp interagiert und dadurch eine Verbindung zwischen den Zelladhäsionsmolekülen und dem Aktincytoskelett herstellt (Kaipa et al., 2013). Um zu überprüfen, ob N-Cadherin mit Dock interagieren und dadurch eventuell die Rekrutierung von Kette vermitteln

kann, wurde zunächst das Hefe 2-Hybridsystem verwendet, um eine mögliche Interaktion auf Proteinebene nachzuweisen. Der gesamte offene Leserahmen von *dock* wurde dazu in die beiden Hefeexpressionsvektoren pGADT7 und pGBKT7 kloniert. Die damit mehrfach durchgeführten Interaktionstests zeigten jedoch unterschiedliche Ergebnisse. Eine schwache Interaktion zwischen der intrazellulären Domäne von N-Cadherin und Dock konnte zweimal nachgewiesen werden. Bei zwei weiteren Versuchen war diese jedoch nicht mehr detektierbar (Daten nicht gezeigt). Auch mittels BiFC war kein Test auf Interaktion der beiden Proteine verlässlich durchführbar, da eine Interaktion von N-Cadherin<sup>TM</sup>intra-C-YFP mit dem N-YFP Leervektor zu beobachten war (siehe Abb. 5.8).

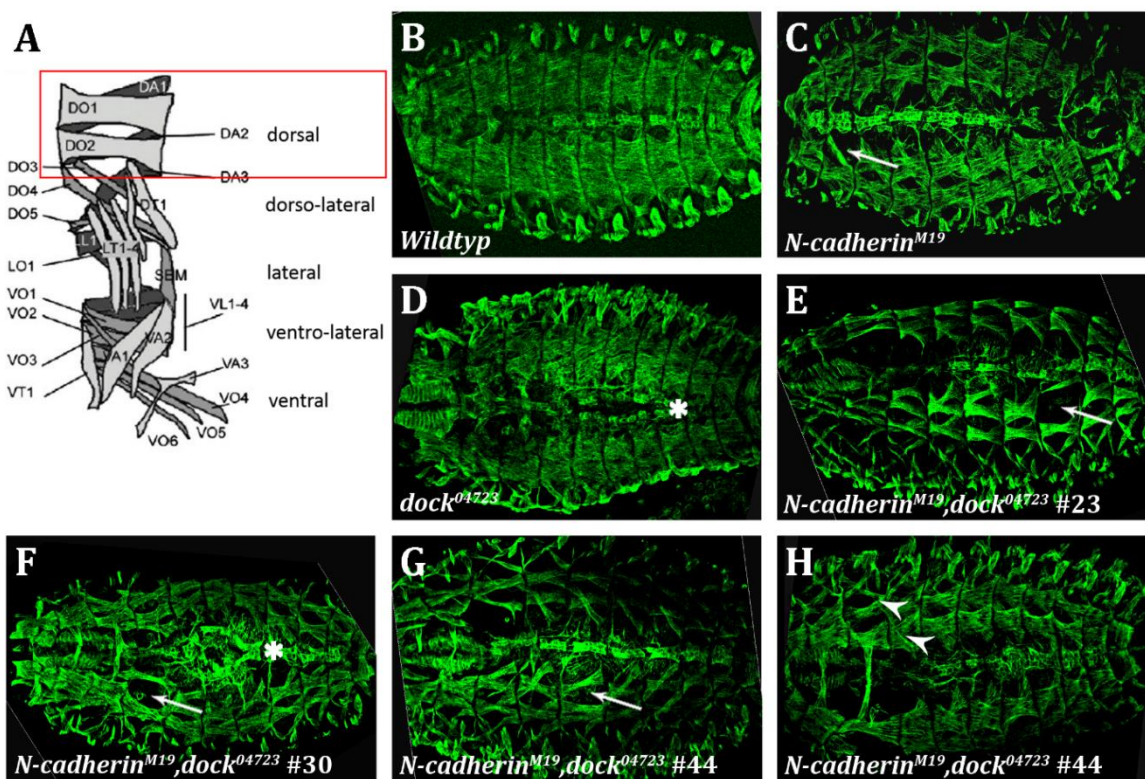
### 5.3.5.1 Herstellung einer *N-cadherin,dock* Doppelmutante zum Nachweis einer möglichen genetischen Interaktion

Aufgrund der nicht eindeutigen Ergebnisse aus den Hefeinteraktionstests zwischen N-Cadherin und Dock (Daten nicht gezeigt) wurde als nächstes analysiert, ob *dock* und *N-cadherin* genetisch miteinander interagieren. Dazu wurden mittels meiotischer Rekombination Doppelmutanten generiert. Insgesamt konnten drei unabhängige rekombinante Linien hergestellt werden, *N-cadherin*<sup>M19</sup>,*dock*<sup>04723</sup> #23, *N-cadherin*<sup>M19</sup>,*dock*<sup>04723</sup> #30 und *N-cadherin*<sup>M19</sup>,*dock*<sup>04723</sup> #44. Mittels Allelietests wurde die Letalität der Linien über dem entsprechenden Allel oder einer Defizienz für das betreffende Gen überprüft. Zur Analyse des Phänotyps wurden Embryonen gesammelt und fixiert. Durch einen Antikörpernachweis des muskelspezifischen  $\beta$ -3 Tubulins wurden alle Myoblasten sowie die Myotuben sichtbar gemacht. Zur Kontrolle wurden Embryonen beider für die Generierung der Doppelmutanten verwendeten Ausgangslinien und des Wildtyps gesammelt und die Phänotypen im Vergleich zu denen der rekombinanten Linien betrachtet. Da die beobachteten Phänotypen sehr variabel waren, wurden jeweils dorsale, laterale und ventrale Muskelgruppen einzeln verglichen.

### 5.3.5.2 In der *N-cadherin*<sup>M19</sup>,*dock*<sup>04723</sup> Doppelmutante fehlten dorsale Muskeln

Zuerst wurden die dorsalen Muskeln betrachtet (Abb. 5.12 A; Abbildung modifiziert nach Tixier et al., 2010). In Stadium 16, nach Abschluss der Muskelentwicklung, ließ sich im Wildtyp das regelmäßige Muskelmuster in den einzelnen Segmenten des Embryos erkennen (Abb. 5.12 B). Bei Betrachtung der *N-cadherin*<sup>M19</sup>-Einzelmutante waren teilweise Defekte bei der Ausbildung der dorsalen Muskeln zu beobachten (Abb. 5.12 C, Pfeil). In der *dock*<sup>04723</sup>-Mutante hingegen war das repetitive Muskelmuster zu sehen, welches dem des Wildtyps entspricht (Abb. 5.12 D). In dieser Mutante zeigte sich jedoch ein

entweder verzögerter oder nicht vollständig abgeschlossener Dorsalschluss (Abb. 5.12 D, Sternchen). In den drei analysierten *N-cadherin*<sup>M19</sup>,*dock*<sup>04723</sup>-Doppelmutanten konnte in jeder Linie ein Defekt bei der Bildung der dorsalen Muskeln beobachtet werden, bei dem einzelne Muskeln fehlten (Abb. 5.12 E-G, Pfeile). Im Vergleich zu der *N-cadherin*<sup>M19</sup>-Einzelmutante schienen diese Defekte in den Doppelmutanten jedoch leicht verstärkt zu sein. Es fehlten mehr Muskeln und die Defekte traten häufiger auf. Auch der nicht vollständige Dorsalschluss, der schon in der *dock*<sup>04723</sup>-Einzelmutante auftrat, war in Linie #30 zu erkennen (Abb. 5.12 F, Sternchen) und lässt sich wahrscheinlich auf diese Mutation zurückführen. Zudem war in Linie #44 ein Muskel sichtbar, der scheinbar fehlgeleitet wuchs (Abb. 5.12 H, Pfeilköpfe).

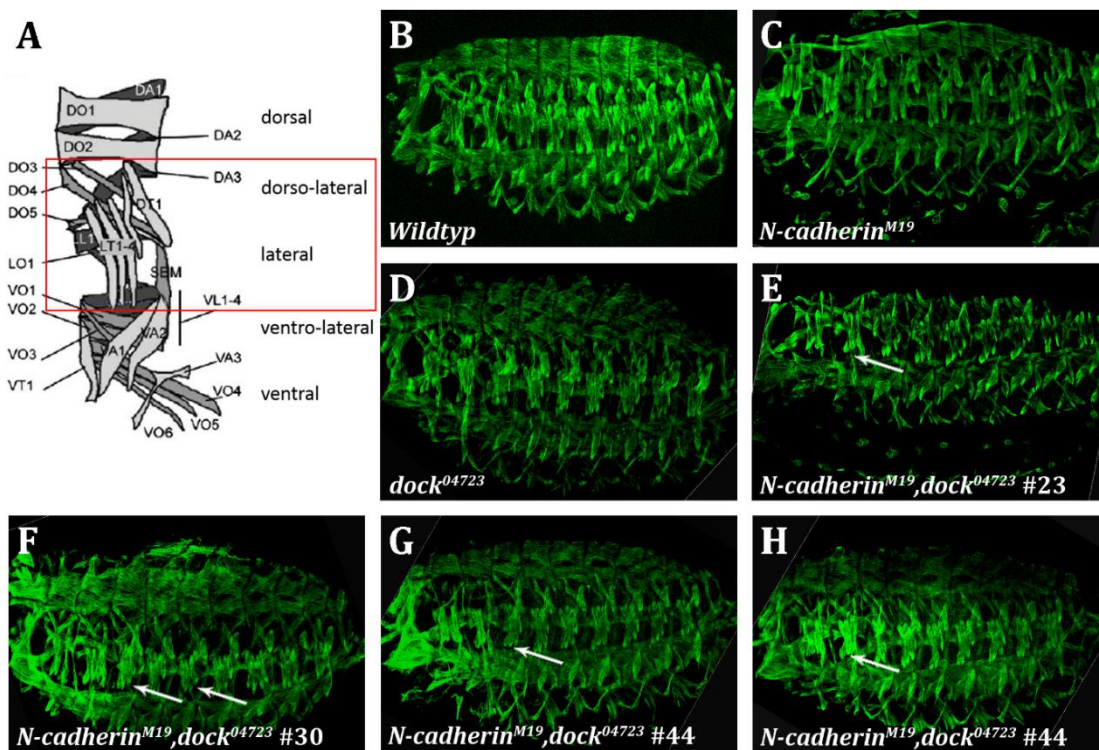


**Abb. 5.12: Die *N-cadherin*<sup>M19</sup>,*dock*<sup>04723</sup>-Doppelmutanten sowie die *N-cadherin*<sup>M19</sup>-Einzelmutante zeigten Defekte in der dorsalen Muskulatur.** Antikörpernachweis von  $\beta$ 3-Tubulin zur Detektion der Muskeln sowie unfusionierten Myoblasten an Embryonen in Stadium 16. In allen Bildern sind dorsale Muskeln zu sehen (A; Abbildung modifiziert nach Tixier et al., 2010), anterior ist links, posterior rechts. Im Vergleich zu dem regelmäßigen Muskelmuster in Wildtyp (B) und der *dock*<sup>04723</sup>-Einzelmutante (D), zeigten die Embryonen der *N-cadherin*<sup>M19</sup>-Einzelmutante (C) sowie die drei doppelmutanten Linien Defekte in der dorsalen Muskulatur. Diese schienen in den Doppelmutanten leicht verstärkt zu sein. In den jeweiligen Embryonen fehlten einzelne dorsale Muskeln (E-G, Pfeile). Der unvollständige Dorsalschluss, welcher in Linie #30 zu erkennen war (F, Sternchen), war jedoch auch in der *dock*<sup>04723</sup>-Einzelmutante zu sehen (D, Sternchen). Außerdem war in Linie #44 ein fehlgeleiteter Muskel sichtbar (H, Pfeilköpfe).



### 5.3.5.3 In den *N-cadherin*<sup>M19</sup>,*dock*<sup>04723</sup>-Doppelmutanten waren leichte Anheftungsdefekte der lateralen Muskeln zu erkennen

Als nächstes wurden Ausbildung und korrekte Positionierung der lateralen Muskeln (Abb. 5.13 A; Abbildung modifiziert nach Tixier et al., 2010) analysiert. Die sich entwickelnden Myotuben heften sich während der Myogenese an sogenannte Tendonzellen der Epidermis an, im Anschluss erfolgt die Innervierung. Dieser Prozess ist essentiell für die Funktionalität der Muskeln, welche zum Beispiel beim Schlüpfen und auch bei der Bewegung der Larve eine Rolle spielt (Schulman et al., 2015). Im Wildtyp war das regelmäßige Muster sowie die korrekte Anheftung der lateralen Muskeln an die Epidermis zu erkennen (Abb. 5.13 B). Dieses Muskelmuster war auch in den *N-cadherin*<sup>M19</sup>- (Abb. 5.13 C) und *dock*<sup>04723</sup>-Einzelmutanten (Abb. 5.13 D) sichtbar. Die *N-cadherin*<sup>M19</sup>,*dock*<sup>04723</sup>-doppelmutanten Fliegenlinien #23, #30 und #44 zeigten hingegen Anheftungsdefekte der lateralen Muskeln (Abb. 5.13 E-H, Pfeile).



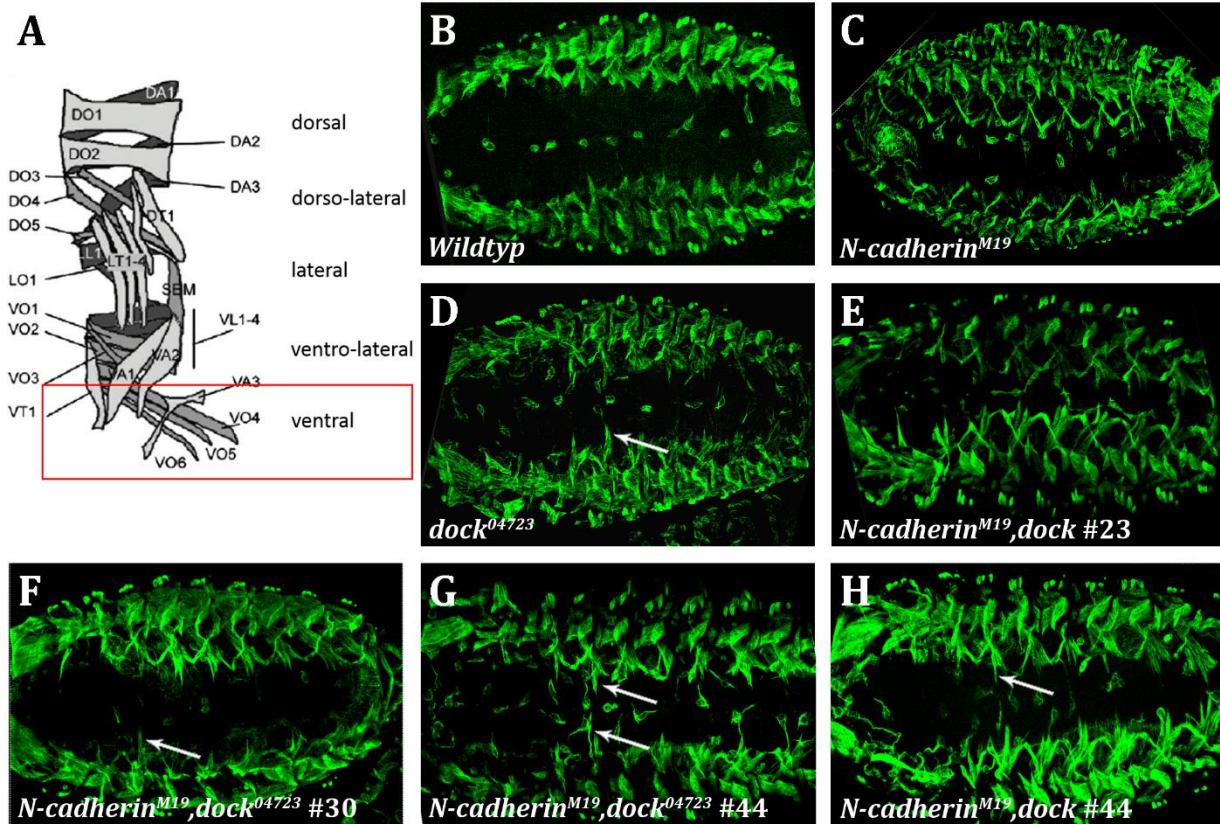
**Abb. 5.13: In den *N-cadherin*<sup>M19</sup>,*dock*<sup>04723</sup>-Doppelmutanten waren leichte Anheftungsdefekte sichtbar.** Antikörpernachweis des muskelspezifischen  $\beta$ -Tubulins an Embryonen in Stadium 16. Anterior ist links, posterior rechts. Eine schematische Darstellung der lateralen Muskeln ist in A gezeigt (Abbildung modifiziert nach Tixier et al., 2010). Das repetitive Muster der lateralen Muskulatur sowie die korrekte Anheftung der Muskeln waren im Wildtyp (B), der *N-cadherin*<sup>M19</sup>- (C) sowie der *dock*<sup>04723</sup>-Einzelmutante (D) zu sehen. In den *N-cadherin*<sup>M19</sup>,*dock*<sup>04723</sup>-doppelmutanten Linien #23, #30 und #44 waren leichte Defekte bei der Anheftung der Muskeln erkennbar (E-H, Pfeile).

Die Anheftungsdefekte konnten lediglich in den *N-cadherin*<sup>M19</sup>,*dock*<sup>04723</sup>-Doppelmutanten beobachtet werden, wodurch die Vermutung bestärkt wird, dass *N-cadherin* und *dock* auf genetischer Ebene während der Anheftung der Muskeln an die Epidermis interagieren.

#### **5.3.5.4 Sowohl die *dock*<sup>04723</sup>-Einzelmutante als auch die *N-cadherin*<sup>M19</sup>,*dock*<sup>04723</sup>-Doppelmutanten zeigten leichte Defekte bei der Anheftung der ventralen Muskeln**

Zuletzt wurden die ventralen Muskeln der *N-cadherin*<sup>M19</sup>,*dock*<sup>04723</sup>-doppelmutanten Linien mit dem Wildtyp und den Ausgangslinien verglichen. Die betrachteten Muskeln sind in Abb. 5.14 A vereinfacht dargestellt (Abbildung modifiziert nach Tixier et al., 2010). Die korrekte Anordnung der Muskeln war sowohl im Wildtyp (Abb. 5.14 B) als auch in der *N-cadherin*<sup>M19</sup>-Mutante (Abb. 5.14 C) zu sehen. In Embryonen der *dock*<sup>04723</sup>-Einzelmutante waren vereinzelt Muskeln zu erkennen, welche zu weit auf die Mittellinie zu wuchsen (Abb. 5.14 D). Auch in den doppelmutanten Fliegenlinien waren diese zu weit auf die Mittellinie zuwachsenden Muskeln sichtbar (Abb. 5.14 E-H, Pfeile). Der Phänotyp schien in den Doppelmutanten jedoch verstärkt zu sein.





**Abb. 5.14:** In den doppelmutanten Linien sowie in der *dock*<sup>04723</sup>-Einzelmutante wuchsen die ventralen Muskeln teilweise zu weit auf die Mittellinie zu. Myotuben sowie unfusionierte Myoblasten der Embryonen in Stadium 16 wurden durch einen Antikörpernachweis des muskelspezifischen  $\beta$ 3-Tubulins sichtbar gemacht. Anterior ist links, posterior rechts. Die in dieser Abbildung analysierten ventralen Muskeln sind in A schematisch dargestellt (Abbildung modifiziert nach Tixier et al., 2010). Die regelmäßige Anordnung und die Lage der ventralen Muskeln war im Wildtyp (B) und der *N-cadherin*<sup>M19</sup>-Mutante (C) zu erkennen. Embryonen der *dock*<sup>04723</sup>-Mutante (D) und der *N-cadherin*<sup>M19</sup>,*dock*<sup>04723</sup>-doppelmutanten Linien zeigten vereinzelt ein zu weites Wachstum aufeinander zu (E-H, Pfeile). Im Vergleich zu der *dock*<sup>04723</sup>-Einzelmutante schienen die Defekte leicht verstärkt zu sein.

Die in den drei analysierten doppelmutanten *N-cadherin*<sup>M19</sup>,*dock*<sup>04723</sup>-Fliegenlinien beobachteten Phänotypen waren in Bezug auf die Art der Defekte und deren Ausprägung sehr variabel. Die teilweise zu weit auf die Mittellinie zuwachsenden ventralen Muskeln, die Anheftungsdefekte der lateralen Muskeln sowie die vereinzelt fehlenden dorsalen Muskeln konnten in allen drei Linien in unterschiedlich starker Ausprägung gezeigt werden. Zwar traten diese Defekte auch in jeweils einer der Ausgangslinien auf, schienen im Vergleich jedoch verstärkt zu sein. Lediglich der nicht vollständige Dorsalschluss war nur in Linie #44 zu beobachten, ist jedoch wahrscheinlich auf den

Verlust von Dock zurückzuführen. Diese Ergebnisse deuten auf eine genetische Interaktion zwischen *N-cadherin* und *dock* sowohl während der Myoblastenfusion als auch danach bei der Anheftung der Muskeln an die Epidermis hin.

#### 5.4 Analysen zur möglichen Regulation der durch N-Cadherin vermittelten Adhäsionsstärke

N-Cadherin scheint in *schizo*-Mutanten nicht von den Membranen abgebaut zu werden (Dottermusch-Heidel et al., 2012). Neben einem nicht funktionellen Endocytosemechanismus könnte auch eine Stabilisierung von N-Cadherin an der Membran für eine Erhöhung der Adhäsionsstärke sorgen und damit eine Internalisierung des Proteins verhindern. Mittels Phosphorylierung und Dephosphorylierung der Proteine des an der Adhäsion beteiligten Cadherin-Catenin-Komplexes kann eine Umgestaltung der Adherens Junctions erfolgen (Adam, 2015). In Vertebraten übernehmen die nicht-Rezeptor Tyrosinkinase Fes/Fer/Fps eine Funktion bei der Regulation von Cadherin-vermittelten Adherens Junctions (El Sayegh et al., 2005). Durch eine Phosphorylierung oder Dephosphorylierung von  $\beta$ -Catenin, welche durch Fer reguliert wird, kommt es entweder zur Stärkung oder zur Auflösung der Adhäsion (Xu et al., 2004; Murray et al., 2006). Weiterhin wurde auch eine Beteiligung von Fps/Fes/Fer am Vesikeltransport diskutiert (Zirngibl et al., 2001). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten ähnliche Funktionen der entsprechenden nicht-Rezeptor Tyrosinkinase Fps85D in *D. melanogaster* untersucht werden, welche neben einer Stabilisierung oder Destabilisierung von N-Cadherin an der Membran möglicherweise auch dessen Endocytose vermitteln kann.

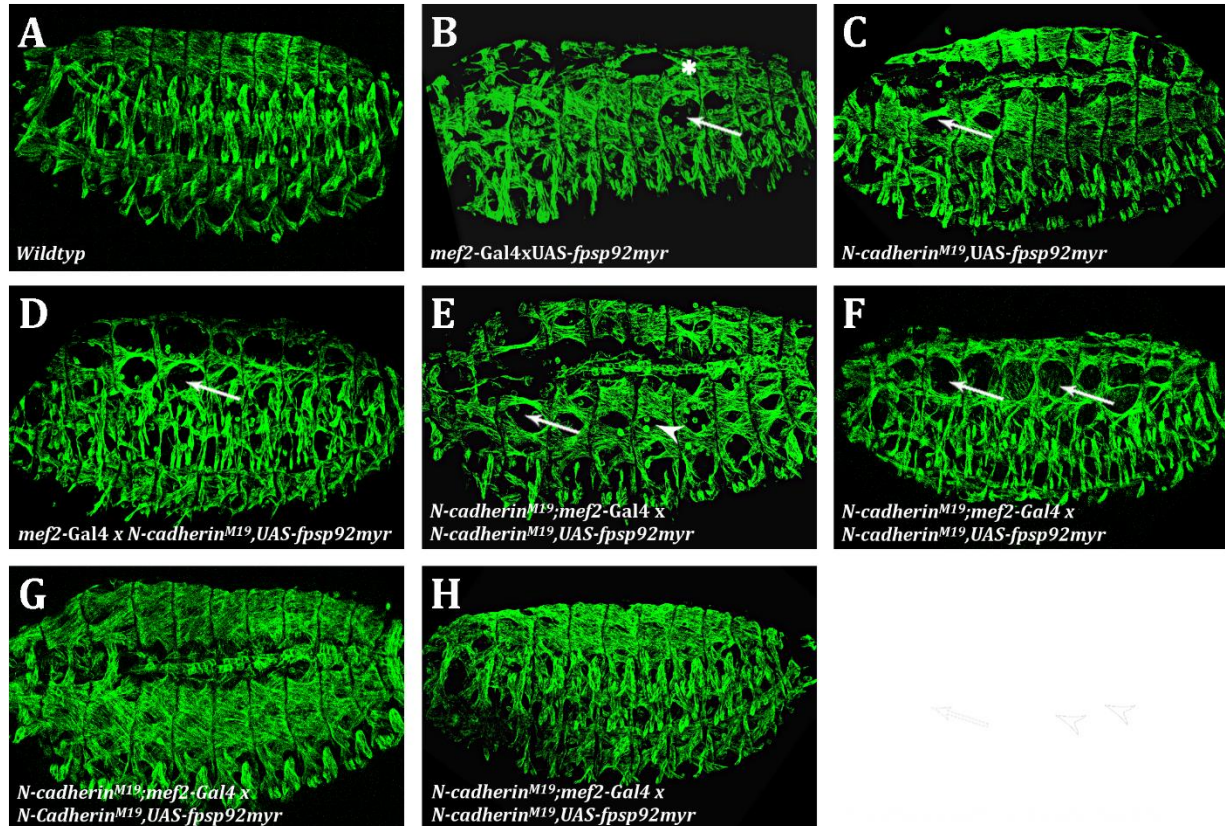
Frühere Experimente zeigten bereits, dass die Expression eines myristoylierten Konstrukts der Isoform p92 von Fps85D im gesamten Mesoderm zu einem Fusionsdefekt führte. Zudem wurden auch bei der Expression der Isoform p100 einige unfusionierte Myoblasten beobachtet (Masterarbeit C. Braukmann, 2012). Die durch die Myristoylierung aktivierte Kinase könnte eine verstärkte Stabilisierung von N-Cadherin an den Membranen vermitteln, was zu dem beobachteten Fusionsdefekt geführt haben könnte. Dies zeigt, dass die membranständige Form von Fps85D scheinbar die Myoblastenfusion stört.

##### 5.4.1 Untersuchungen zur genetischen Interaktion zwischen *N-cadherin* und *fps85Dp92*

Um diese Vermutung zu überprüfen wurde eine rekombinante Fliegenlinie generiert, welche sowohl das myristoylierte *fps85Dp92* unter UAS-Kontrolle als auch die *N-cadherin*<sup>M19</sup>-Nullmutation trägt. Mittels Alleliettest wurde die Letalität der generierten Linie über eine *N-cadherin* Defizienz überprüft.

Da die *N-cadherin* Mutante weißäugig ist, konnte das UAS-*fps85Dp92myr* Konstrukt durch das in dem Vektor vorhandene *white* Gen nachverfolgt werden. Wenn die Expression des myristoylierten *fps85D* tatsächlich eine Internalisierung von N-Cadherin verhindert, sollte der in dieser Linie beobachtete Fusionsdefekt bei Expression des Konstruktes im *N-cadherin*-mutanten Hintergrund abgeschwächt sein.

Im Wildtyp zeigte sich das regelmäßige Muskelmuster (Abb. 5.15 A). Eine Expression der myristoylierten Isoform p92 von *fps85D* in allen Myoblasten führte zu einem Defekt bei der Ausbildung der dorsalen Muskeln (Abb. 5.15 B, Pfeil) sowie zu einem unvollständigen Dorsalschluss (Abb. 5.15 B, Sternchen). Durch ein Einkreuzen des UAS-*fpsp92myr* Konstrukts in den *N-cadherin*-mutanten Hintergrund konnten lediglich vereinzelt fehlende dorsale Muskeln beobachtet werden (Abb. 5.15 C, Pfeil). Eine Expression des Konstrukts in dieser Linie mittels *Mef2*-Gal4 in allen Myoblasten ließ einen stärkeren Fusionsdefekt erkennen, bei welchem die lateralen Muskeln dünner zu sein und die Defekte bei der Ausbildung der dorsalen Muskeln verstärkt zu sein schienen (Abb. 5.15 D, Pfeil). Allerdings konnte bei den Embryonen der *N-cadherin*;*Mef2*-Gal4 Treiberlinie aufgrund eines nicht nachweisbaren Balancers nicht zwischen einer homozygoten und heterozygoten *N-cadherin* Mutante unterschieden werden. Die Richtigkeit der Treiberlinie wurde mithilfe einer *N-cadherin* Defizienz überprüft und verifiziert. Nach Einkreuzen eines neuen Balancers, welcher zusätzlich *lacZ* trägt, könnte die Linie für die Auswertung dieses Experiments wieder verwendet werden. Eine eindeutige Aussage über eine genetische Interaktion zwischen *N-cadherin* und *fps85Dp92myr* kann zu diesem Zeitpunkt nicht getroffen werden.



**Abb. 5.15: Eine genetische Interaktion zwischen *N-cadherin* und *myrfps85Dp92* konnte nicht ausgeschlossen werden.** Die Myotuben sowie unfusionierte Myoblasten der Embryonen in Stadium 16 wurden durch einen Antikörpernachweis des muskelspezifischen  $\beta$ 3-Tubulins sichtbar gemacht. Anterior ist links, posterior rechts. Das regelmäßige Muskelmuster war im Wildtyp zu sehen (A). Die Expression von *UAS-fps85Dp92myr* in allen Myoblasten mithilfe von *Mef2-Gal4* führte sowohl zu einem verzögerten Dorsalschluss (B, Sternchen) als auch zu Defekten bei der Ausbildung der dorsalen Muskeln (B, Pfeil). In der *N-cadherin*, *UAS-fps92myr* rekombinanten Fliegenlinie fehlten vereinzelt dorsale Muskeln (C, Pfeil). Eine Kreuzung dieser Linie mit der *Mef2-Gal4* Treiberlinie zeigte Defekte bei der Ausbildung der dorsalen Muskeln (D, Pfeil) sowie dünnere laterale Muskeln. Die Expression von *fps92myr* im *N-cadherin*-mutanten Hintergrund ließ variable Phänotypen erkennen. In einigen Embryonen fehlten vereinzelt dorsale Muskeln (E, Pfeil). Zudem waren einzelne unfusionierte Myoblasten detektierbar (E, Pfeilkopf). Einige Embryonen zeigten einen deutlichen Defekt bei der Ausbildung der dorsalen Muskeln (F, Pfeile). Trotzdem waren auch Embryonen zu sehen, welche ein eher wildtypisches Muskelmuster erkennen ließen (G und H).

Die Ergebnisse geben erste Hinweise auf eine genetische Interaktion zwischen *N-cadherin* und *fps85D*. Weiterhin unklar bleibt jedoch, ob die Myristoylierung zu einer Stabilisierung von N-Cadherin führt oder ob es durch die Aktivierung von Fps85D zu einer Destabilisierung und damit zum Abbau kommt.

#### 5.4.2 Analysen zur Lokalisation von Fps85Dp100 im Mesoderm

Für Fps85D wurden in *D. melanogaster* vier verschiedene Isoformen beschrieben (Katzen et al., 1991; Paulson et al., 1997; Murray et al., 2006). Zu Beginn dieser Studien war lediglich die cDNA der Isoform p100 verfügbar. Zunächst sollte analysiert werden, ob eine Überexpression einer myristoylierten Variante dieser Isoform zu einem ähnlichen Phänotyp führt, wie er für die Isoform p92 beobachtet wurde. Dafür wurde der vollständige offene Leserahmen der Isoform p100 von *fps85D* in einen pUASst-Vektor mit C-terminalem mCherry-, eGFP- oder Myc-Anhang kloniert. Weiterhin wurde ein Konstrukt generiert, welches zusätzlich zu dem C-terminalen mCherry-Anhang N-terminal die Myristoylierungssequenz des Src42A trägt (*myrfps85D*-mCherry).

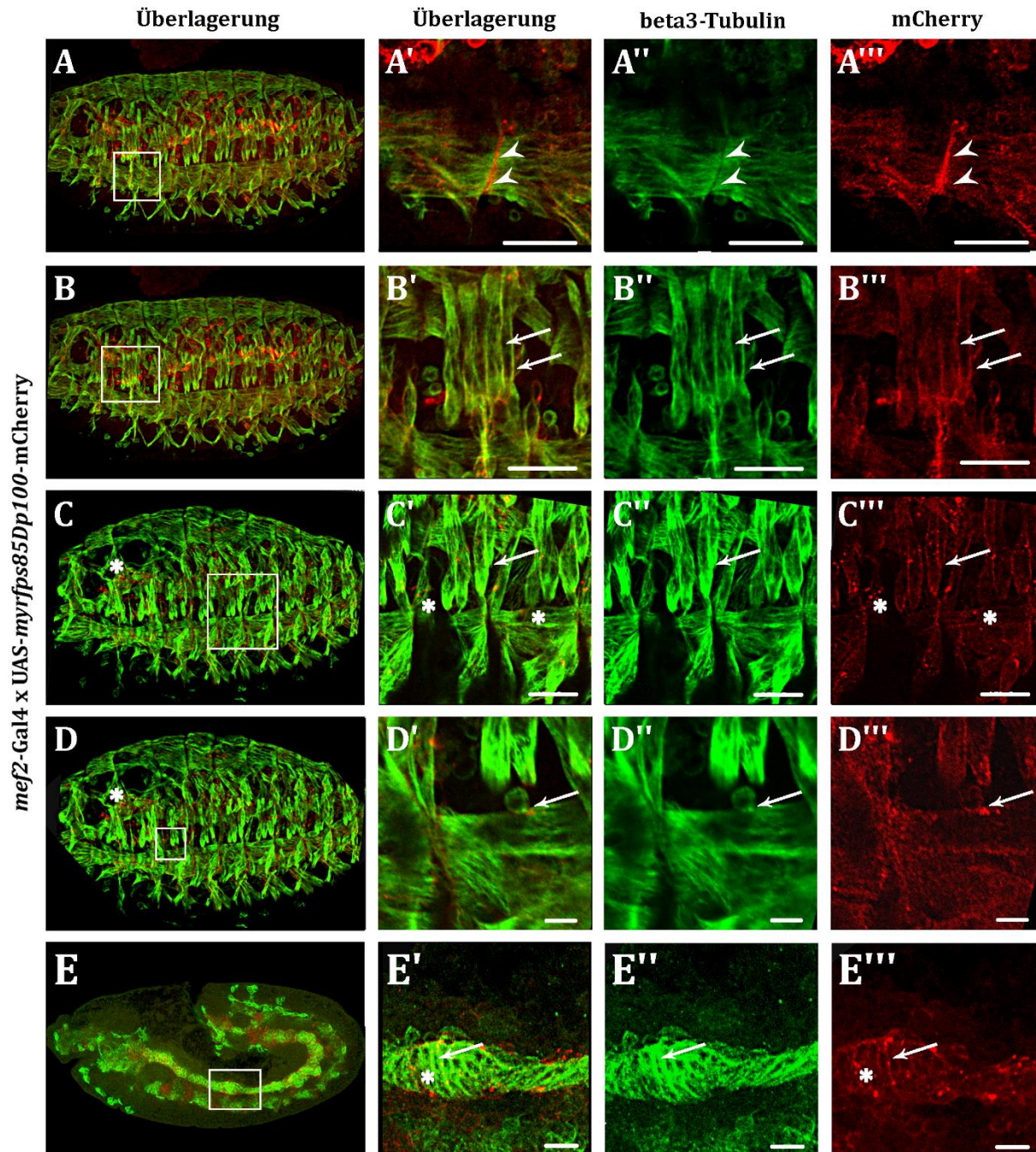
Mithilfe der muskelspezifischen *Mef2*-Gal4 Treiberlinie wurden die UAS-Konstrukte in allen Myoblasten exprimiert. Durch den Antikörpernachweis von  $\beta$ 3-Tubulin wurden alle Myotuben sowie unfusionierte Myoblasten sichtbar gemacht. Die Fusionsproteine wurden durch Antikörpernachweise der mCherry-, eGFP- oder Myc-Anhänge detektiert.

##### 5.4.2.1 Das myrFps85Dp100-mCherry Fusionsprotein lokalisierte an den Membranen der Myotuben sowie an deren Anheftungsstellen

In Stadium 16, nach Abschluss der Myoblastenfusion, konnten keine Fusionsdefekte durch die Expression von *myrfps85Dp100*-mCherry beobachtet werden, lediglich vereinzelte unfusionierte Myoblasten waren zu erkennen (Abb. 5.16 A-C). Der Phänotyp entsprach nahezu dem des Wildtyps. myrFps85Dp100-mCherry lokalisierte an den Anheftungsstellen der Muskeln (Abb. 5.16 A-A'', Pfeile). Zudem schien das Fusionsprotein an den Membranen der Myotuben zu lokalisieren (Abb. 5.16 B-B'', Pfeile sowie C-C'', Pfeile). Vereinzelt war auch eine Akkumulation von myrFps85Dp100-mCherry in den Muskeln zu erkennen (Abb. 5.16 C-C'', Sternchen). Diese Anreicherung war jedoch auch teilweise außerhalb der Myotuben zu beobachten. In einem Embryo konnte auch eine Akkumulation von myrFps85Dp100-mCherry zwischen einer adhärierenden FCM und einer Myotube gezeigt werden (Abb. 5.16 D-D'', Pfeil). Dabei handelte es sich möglicherweise um die Kontaktstelle zwischen adhärierender FCM und wachsender Myotube. Neben der Lokalisation des



Proteine in der Körperwandmuskulatur konnte auch ein Signal im visceralen Mesoderm detektiert werden (Abb. 5.16 E). In den Vergrößerungen war zu sehen, dass das myrFps85Dp100-mCherry Fusionsprotein in der visceralen Muskulatur lokalisierte (Abb. 5.16 E'-E''', Pfeil) und scheinbar auch dort in einigen Bereichen akkumulierte (Abb. 5.16 E'-E''', Sternchen).

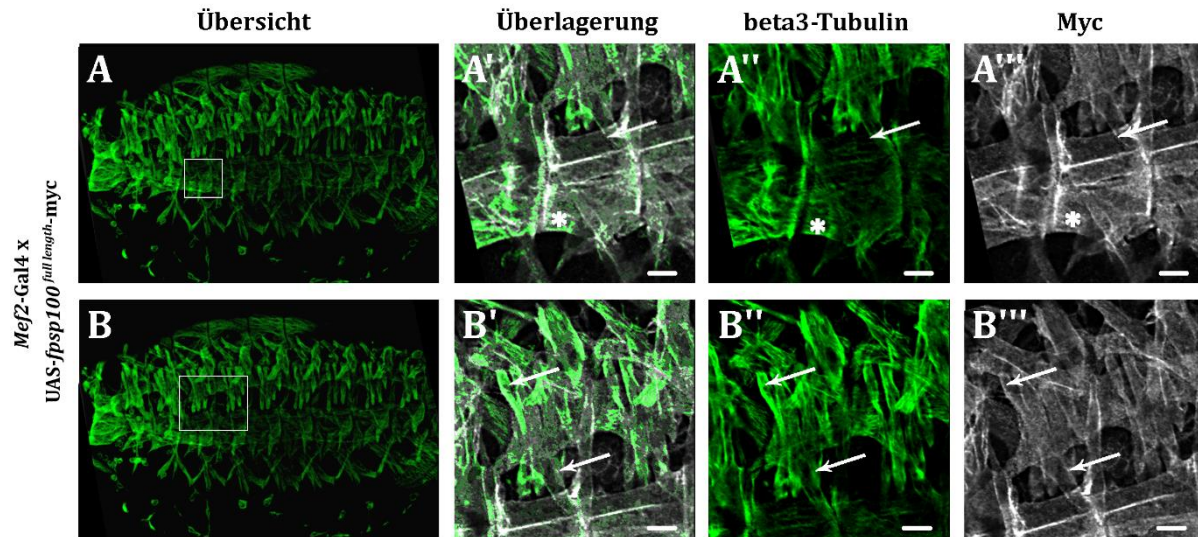


**Abb. 5.16: Analyse der Lokalisation des myrFps85Dp100-mCherry Fusionsproteins im Embryo.** Das Konstrukt wurde mithilfe der *Mef2*-Gal4 Treiberlinie in allen Myoblasten exprimiert. Die Muskeln sowie

unfusionierte Myoblasten wurden durch einen Antikörpernachweis des muskelspezifischen  $\beta$ 3-Tubulins sichtbar gemacht, das myrFps85Dp100-mCherry Fusionsprotein mittels Antikörpernachweis des mCherry-Anhangs. Eine Lokalisation des Fusionsproteins an den Anheftungsstellen der Myotuben ist in der Überlagerung (A) sowie in den Vergrößerungen gezeigt (A'-A''', Pfeile). myrFps85Dp100-mCherry lokalisierte zudem auch an den Membranen der Myotuben (B-B''', Pfeile und C'-C''', Pfeil). Weiterhin war eine Akkumulation des Fusionsproteins in einigen Myotuben zu erkennen (C-C''', Sternchen). In einem Embryo war eine Anreicherung des myrFps85Dp100-mCherry Fusionsproteins möglicherweise an der Kontaktstelle zwischen einer FCM und einer Myotube sichtbar (D-D''', Pfeil). Auch im visceralen Mesoderm war ein Signal detektierbar. Dort schien myrFps85Dp100-mCherry sowohl an den Membranen zu lokalisieren (E-E''', Pfeil) als auch in manchen Bereichen zu akkumulieren (E-E''', Sternchen). Anterior ist links, posterior rechts, gezeigt sind Embryonen in Stadium 16, sowie ein Embryo in Stadium 12/13. Maßstabsbalken: A und C: 20  $\mu$ m; B und E: 10  $\mu$ m; D: 5  $\mu$ m; grün:  $\beta$ 3-Tubulin, rot: mCherry.

#### 5.4.2.2 Fps85Dp100-Myc lokalisierte an den Membranen der Muskeln sowie an deren Anheftungsstellen

Auch die unmyristoylierte Variante der Isoform p100 wurde auf die Ausbildung eines Fusionsdefektes, verursacht durch Überexpression, hin untersucht. In der Übersicht der Embryonen war zu erkennen, dass die Myoblastenfusion durch die Expression des *fps85Dp100-myc* Konstruktes nicht gestört zu sein schien (Abb. 5.17 A und B). Die Vergrößerung zeigt die Antikörpernachweise des muskelspezifischen  $\beta$ 3-Tubulins und des Myc-Anhangs sowie deren Überlagerung. Das Fps85Dp100-Myc Fusionsprotein lokalisierte an den Anheftungsstellen der Muskeln an die Epidermis (Abb. 5.17 A'-A''', Sternchen). Zudem war eine etwas schwächere Anreicherung des Fusionsproteins an den Membranen der Muskeln zu sehen (Abb. 5.17 A'-A''', Pfeil sowie B'-B''', Pfeile).



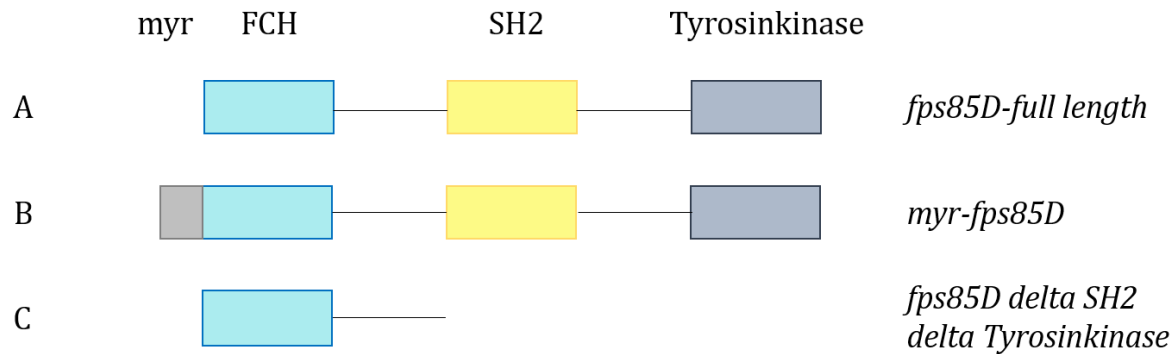
**Abb. 5.17: Fps85Dp100-Myc lokalisierte an den Anheftungsstellen sowie an den Membranen der Myoblasten.** In der Übersicht des Embryos in Stadium 16 waren keine Fusionsdefekte erkennbar (A und B). Die Vergrößerungen zeigen die  $\beta$ 3-Tubulin- (A'' und B'') und Myc-Antikörpernachweise (A''' und B''') sowie deren Überlagerungen (A' und B'). An den Anheftungsstellen der Myotuben war eine Akkumulation des Fps85Dp100-Myc Fusionsproteins zu detektieren (A'-A''', Sternchen). Weiterhin war wahrscheinlich eine Lokalisation an den Membranen der Myotuben zu sehen (A'-A''', Pfeil sowie B'-B''', Pfeile). Anterior ist links, posterior rechts. Maßstabsbalken: 10  $\mu$ m; grün:  $\beta$ 3-Tubulin, grau: Myc.

Sowohl die myristoylierte als auch die unmyristoylierte Variante der p100 Isoform von Fps85D zeigten eine Lokalisation an den Membranen der Myotuben sowie an deren Anheftungsstellen, was auf eine mögliche Rolle von Fps85D bei der Anheftung der Muskeln hindeuten könnte. Eine Überexpression der beiden Fusionsproteine im Mesoderm führte jedoch nicht zu einem Fusionsdefekt, wie er bei Überexpression der myristoylierten p92 Isoform gezeigt werden konnte.



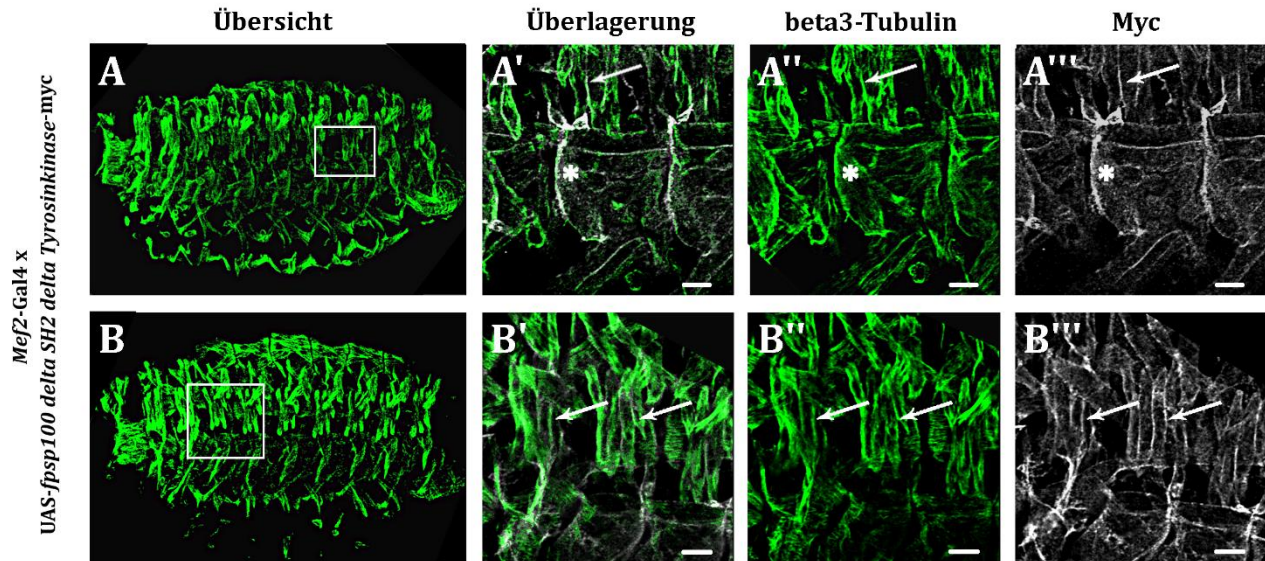
### 5.4.2.3 Fps85Dp100 mit deletierter SH2- und Tyrosinkinase-Domäne lokalisierte an den Anheftungsstellen der Myotuben sowie deren Membranen

Um zu analysieren, ob es durch eine Deletion der SH2- und Tyrosinkinase-Domäne zu einem Fusionsdefekt oder zu einer veränderten Lokalisation des Fusionsproteins im Vergleich zu der unmyristoylierten (Abb. 5.18 A) und myristoylierten Form (Abb. 5.18 B) kommt, wurden transgene Fliegenlinien generiert, welche eine verkürzte Proteinvariante (Abb. 5.18 C) tragen.



**Abb. 5.18: Schematischer Überblick der verwendeten *fps85D* Konstrukte.** Für Studien zur Überexpression sowie zur Lokalisation im Embryo wurden drei Konstrukte generiert. Das erste umfasst den gesamten offenen Leserahmen von *fps85D* (A), das zweite enthält zusätzlich ein N-terminales Myristoylierungssignal (B) und bei dem dritten handelt es sich um eine verkürzte Proteinvariante, bei der die SH2- sowie die Tyrosinkinase-Domäne deletiert wurden (C).

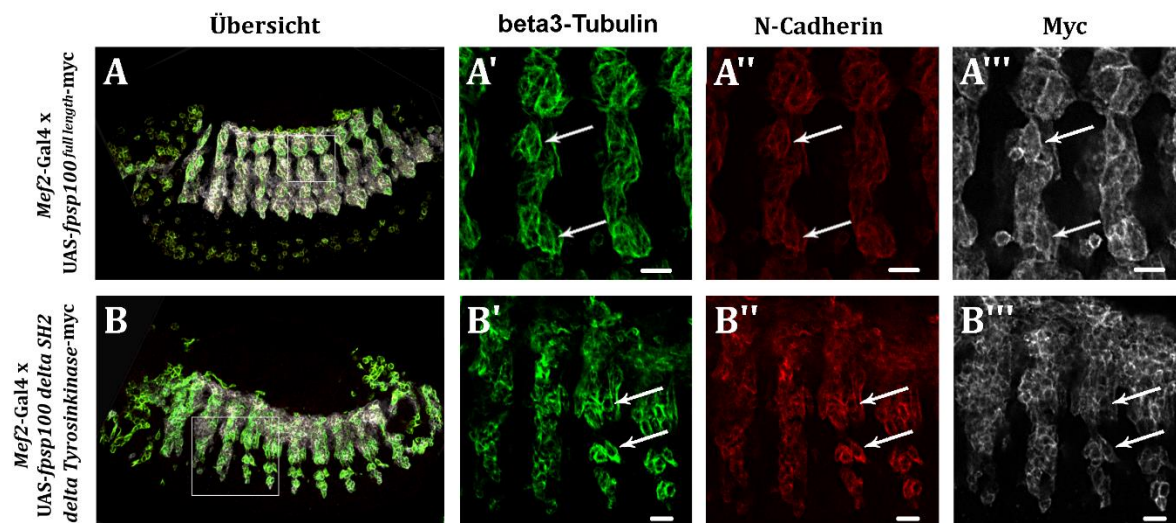
Die Muskulatur der Embryonen wurde durch einen Antikörpernachweis des muskelspezifischen  $\beta$ 3-Tubulins sichtbar gemacht, das Fusionsprotein Fps85Dp100 delta SH2 delta Tyrosinkinase-Myc wurde mithilfe eines Antikörpers gegen den Myc-Anhang detektiert. Die Übersichten der Embryonen zeigten, dass auch die Expression der verkürzten Variante nicht zu einem Fusionsdefekt führte (Abb. 5.19 A und B). Auch das verkürzte Fusionsprotein lokalisierte an den Anheftungsstellen der Myotuben (Abb. 5.19 A'-A'', Sternchen). Zudem war eine Lokalisation an deren Membranen zu beobachten (Abb. 5.19 A'-A'', Pfeil und B'-B'', Pfeile).



**Abb. 5.19: Das Fps85Dp100 delta SH2 delta Tyrosinkinase-Myc Fusionsprotein zeigte eine Lokalisation an den Membranen sowie den Anheftungsstellen der Myotuben.** Die Muskulatur der Embryonen in Stadium 16 wurde durch einen Antikörpernachweis des muskelspezifischen  $\beta$ 3-Tubulins sichtbar gemacht, das Fusionsprotein mithilfe eines Antikörpernachweises des Myc-Anhangs. In den Übersichten der beiden Embryonen konnten keine Fusionsdefekte beobachtet werden (A und B). Die Vergrößerungen zeigten eine Lokalisation des Fusionsproteins an den Anheftungsstellen der Myotuben (A'-A''', Sternchen). Auch an den Membranen der Myotuben war ein Myc-Signal zu erkennen (A'-A''', Pfeil sowie B'-B''', Pfeile). Anterior ist links, posterior rechts. Maßstabsbalken: 10  $\mu$ m; grün:  $\beta$ 3-Tubulin; grau; Myc.

#### 5.4.2.4 Fps85Dp100 sowie eine verkürzte Variante des Proteins co-lokalisierten mit N-Cadherin im somatischen Mesoderm

Die im Mesoderm der Embryonen exprimierten Konstrukte schienen an den Membranen der Myoblasten und Myotuben zu lokalisieren. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde an den Embryonen zusätzlich ein N-Cadherin Antikörpernachweis durchgeführt. Von N-Cadherin konnte bereits gezeigt werden, dass das Protein an den Membranen lokalisierte (Dottermusch-Heidel et al., 2012). Die beiden näher analysierten Embryonen der Stadien 13 und 12 sind in der Übersicht zu sehen (Abb. 5.20 A und B). In den Vergrößerungen sind jeweils die  $\beta$ 3-Tubulin- (Abb. 5.20 A' und B'), N-Cadherin- (Abb. 5.20 A'' und B'') sowie Myc- (Abb. 5.20 A''' und B''') Antikörpernachweise gezeigt. Fps85D-Myc (Abb. 5.20 A'-A''', Pfeile) und auch die verkürzte Variante des Fusionsproteins co-lokalisierten mit N-Cadherin an den Membranen der Myoblasten (Abb. 5.20 B'-B''', Pfeile).

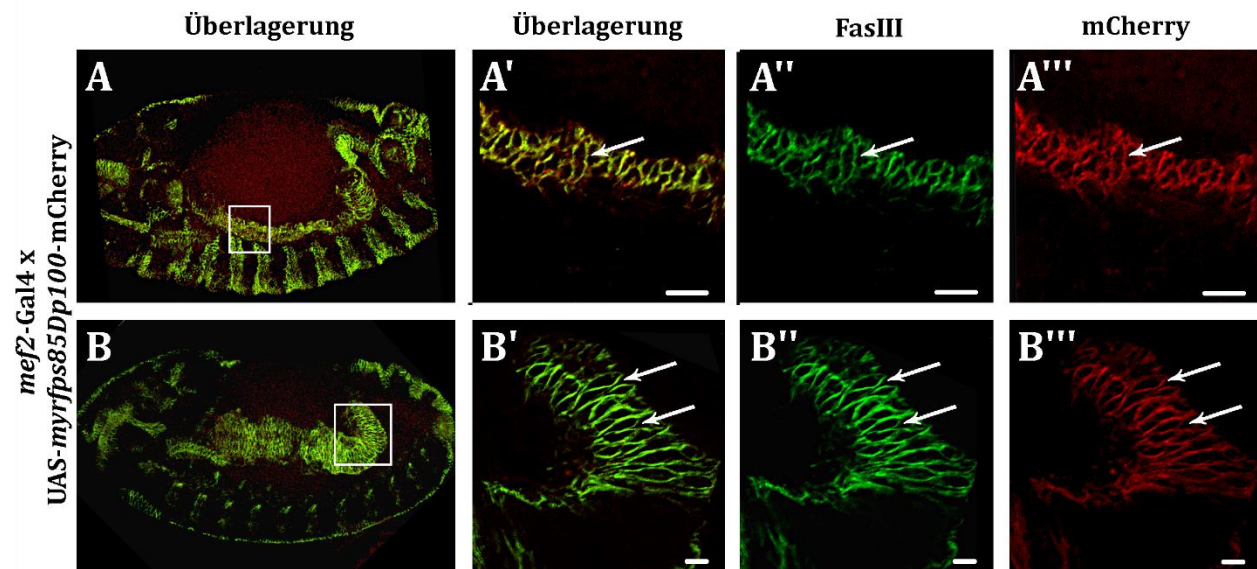


**Abb. 5.20: Das Fps85Dp100-Myc Fusionsprotein sowie die verkürzte Variante co-lokalisierten mit N-Cadherin an den Membranen der Myoblasten.** Die Myoblasten der Embryonen in Stadium 13 (A) und Stadium 12 (B) wurden durch einen Antikörpernachweis des muskelspezifischen  $\beta$ 3-Tubulins sichtbar gemacht. Auch N-Cadherin sowie der Myc-Anhang wurden mithilfe eines Antikörpers nachgewiesen. Die Übersichten zeigten eine partielle Co-Lokalisation der Proteine (A und B). An den Membranen der Myoblasten war eine Co-Lokalisation zwischen N-Cadherin und den Fps85Dp100 Fusionsproteinen zu erkennen (A'-A''', Pfeile sowie B'-B''', Pfeile). Anterior ist links, posterior rechts. Maßstabsbalken: 10  $\mu$ m; grün:  $\beta$ 3-Tubulin; rot: N-Cadherin; grau: Myc.

Die beobachtete Co-Lokalisation zwischen N-Cadherin und den Fps85D Fusionsproteinen lassen die Vermutung zu, dass Fps85D an der Regulation der N-Cadherin-vermittelten Adhäsion beteiligt sein könnte.

#### 5.4.2.5 myrFps85Dp100-mCherry co-lokalisierte im visceralen Mesoderm mit FasciclinIII an den Membranen

Das myrFps85Dp100-mCherry zeigte eine Lokalisation in der visceralen Muskulatur. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde ein Antikörpernachweis des an den Membranen des visceralen Mesoderms lokalisierenden FasciclinIII (FasIII) durchgeführt. Auch der mCherry-Anhang des myrFps85Dp100-Fusionsproteins wurde durch einen Antikörpernachweis detektiert. In den Embryonen zweier unterschiedlicher Stadien war eine Co-Lokalisation von myrFps85Dp100-mCherry und FasciclinIII zu erkennen (Abb. 5.21 A und B). Die Vergrößerungen zeigten, dass beide Proteine an den Membranen co-lokalisieren (Abb. 5.21 A'-A''', Pfeil sowie B'-B''', Pfeile). Die zuvor beobachteten Akkumulationen des Fusionsproteins waren in diesem Versuch nicht mehr sichtbar. Zudem waren keine Defekte bei der Ausbildung der visceralen Muskulatur zu erkennen.

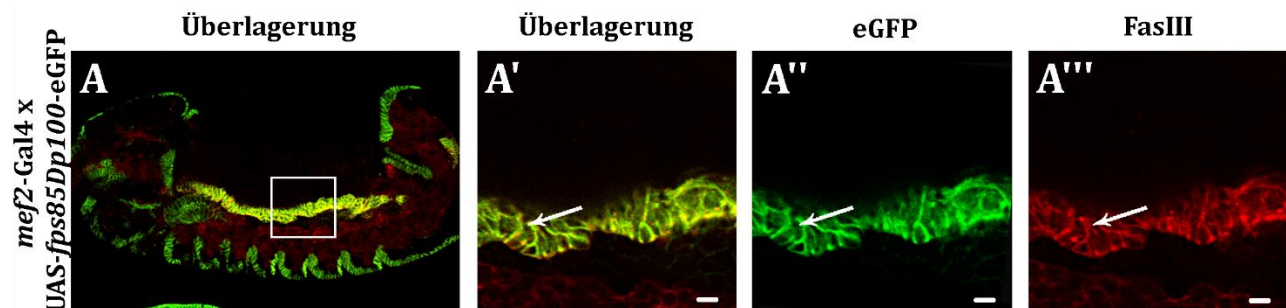


**Abb. 5.21: myrFps85Dp100-mCherry co-lokalisiert mit FasciclinIII.** In den Übersichten war eine Co-Lokalisation zwischen dem myrFps85Dp100-mCherry Fusionsprotein und FasciclinIII zu erkennen (A und B). Die Vergrößerungen zeigten, dass beide Proteine an den Membranen co-lokalisierten (A'-A''', Pfeil sowie B'-B''', Pfeile). Anterior ist links, posterior rechts, gezeigt sind Embryonen der Stadien 14 (A) und 15 (B). Maßstabsbalken: A-A''': 10  $\mu$ m; B-B''': 5  $\mu$ m; grün: FasciclinIII, rot: mCherry.



#### 5.4.2.6 Auch Fps85Dp100-eGFP co-lokalisierte im visceralen Mesoderm mit FasciclinIII an den Membranen

Da die myristoylierte Variante von Fps85Dp100 eine Lokalisation im visceralen Mesoderm zeigte, sollte überprüft werden, ob diese auch bei der unmyristoylierten Form vorliegt. Der eGFP-Anhang des Fps85Dp100 Fusionsproteins wurde durch einen Antikörpernachweis detektiert. Zudem wurden die Membranen des visceralen Mesoderms mithilfe eines FasciclinIII-Antikörpernachweises sichtbar gemacht. In der Überlagerung war zu erkennen, dass sowohl das Fps85Dp100-eGFP Fusionsprotein als auch FasIII im Stadium 14 Embryonalentwicklung im visceralen Mesoderm lokalisierten (Abb. 5.22 A). Eine Vergrößerung zeigte, dass beide Proteine an den Membranen co-lokaliserten (Abb. 5.22 A'-A''', Pfeile). Wie zuvor bei der myristoylierten Isoform p100 beobachtet, führte auch die Expression der unmyristoylierten Form von Fps85Dp100 nicht zu Defekten bei der Ausbildung der visceralen Muskulatur.



**Abb. 5.22: Im visceralen Mesoderm war eine Co-Lokalisation zwischen Fps85Dp100-eGFP und FasciclinIII zu beobachten.** Das Fps85Dp100-eGFP Fusionsprotein wurde durch einen Antikörpernachweis des eGFP-Anhangs detektiert. Zusätzlich wurde ein FasIII Antikörpernachweis durchgeführt, um die Membranen der visceralen Muskulatur sichtbar zu machen. Die Überlagerung zeigte eine Lokalisation der beiden nachgewiesenen Proteine im visceralen Mesoderm (A). Eine Co-Lokalisation zwischen beiden Proteinen an den Membranen war in der Vergrößerungen deutlich zu erkennen (A'-A'''). Anterior ist links, posterior rechts, gezeigt ist ein Embryo in Stadium 14 (A). Maßstabsbalken: 5  $\mu$ m; grün: eGFP, rot: FasciclinIII.

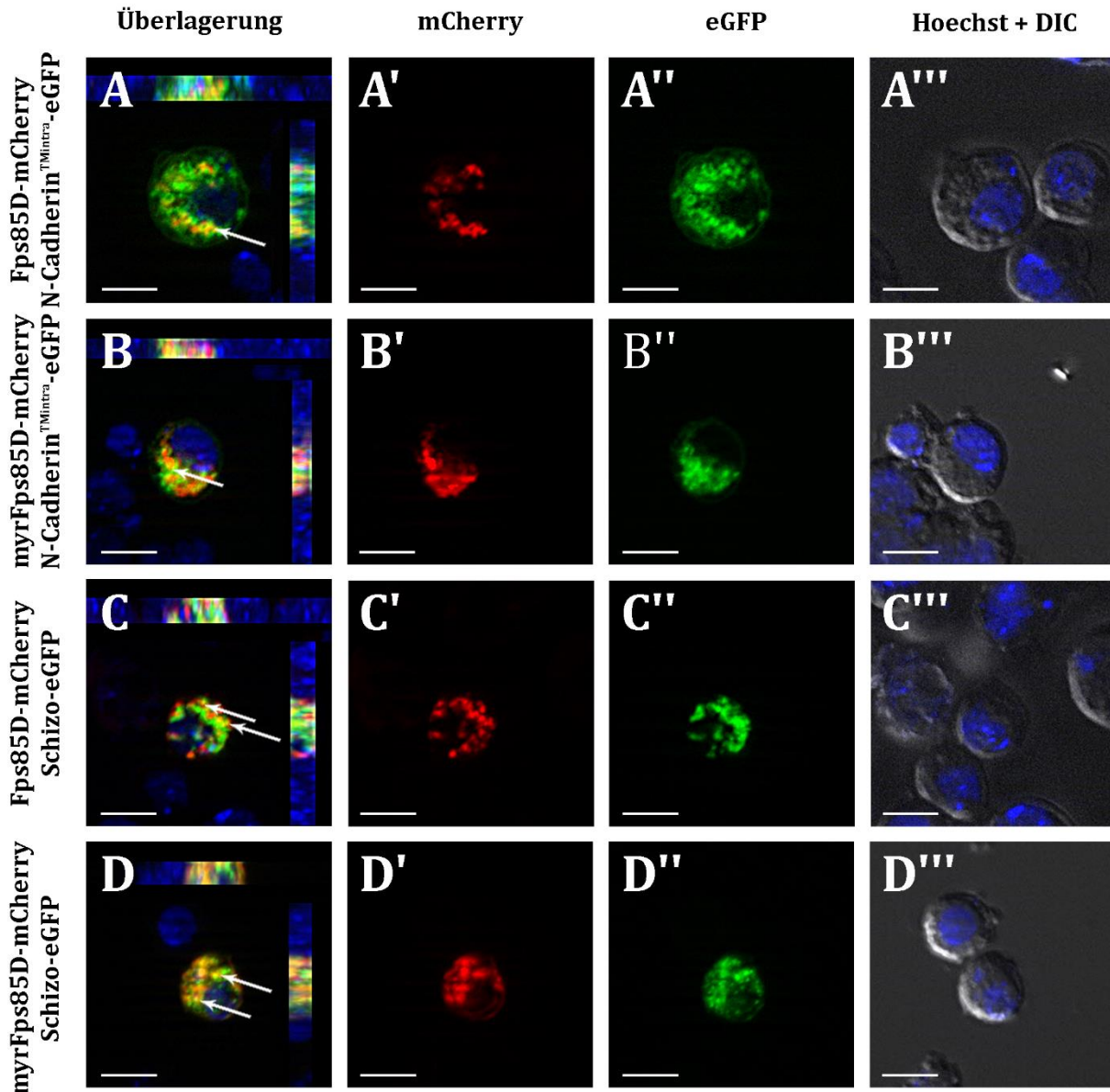
Sowohl myrFps85Dp100-mCherry als auch Fps85Dp100-eGFP lokalisierten während der Embryonalentwicklung im visceralen Mesoderm. Eine genauere Analyse zeigte eine deutliche Co-Lokalisation mit dem an den Membranen lokalisierenden FasciclinIII. Fusionsdefekte konnten in den bisher untersuchten Embryonen nicht beobachtet werden.

### 5.4.3 Zellkulturstudien zur Lokalisation von Fps85Dp100

#### 5.4.3.1 Fps85Dp100 co-lokalisiert partiell mit Schizo und N-Cadherin in S2 Zellen

Die in Embryonen gezeigten Co-Lokalisationen zwischen den Fps85D Fusionsproteinen und N-Cadherin sollten mittels Zellkulturstudien bestätigt werden. Außerdem sollten weitere an der Internalisierung von N-Cadherin beteiligte Proteine auf eine mögliche Co-Lokalisation mit Fps85D hin untersucht werden. Die *fps85Dp100*-mCherry und *myrfps85Dp100*-mCherry Konstrukte wurden jeweils mit *N-cadherin<sup>TMintra</sup>*-eGFP sowie mit *schizo*-eGFP und *aktin*-Gal4 in S2 Zellen co-transfiziert. Die Zellen wurden fixiert und die Auswertung erfolgte mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops. Gezeigt sind die Überlagerungen (Abb. 5.23 A-D) der mCherry-(Abb. 5.23 A'-D') und eGFP-Kanäle (Abb. 5.23 A''-D'') sowie der DNA-Nachweis mittels Hoechst (Abb. 5.23 A'''-D''').

Das Fps85Dp100-mCherry Fusionsprotein sowie auch dessen myristoylierte Form schienen im Cytoplasma der Zellen zu akkumulieren (Abb. 5.23 A'-D'). Auch *N-cadherin<sup>TMintra</sup>*-eGFP zeigte in den betrachteten Zellen wahrscheinlich eine intrazelluläre Akkumulation (Abb. 5.23 A'' und B''). Partiiell schien *N-cadherin<sup>TMintra</sup>*-eGFP mit Fps85Dp100-mCherry (Abb. 5.23 A, Pfeil) und *myrFps85Dp100*-mCherry (Abb. 5.23 B, Pfeil) zu co-lokalisieren. Auch mit dem *Schizo*-eGFP Fusionsprotein (Abb. 5.23 C'' und D'') war eine partielle Co-Lokalisation sowohl mit Fps85Dp100-mCherry (Abb. 5.23 C, Pfeile) als auch mit *myrFps85Dp100*-mCherry (Abb. 5.23 D, Pfeile) im Cytoplasma zu detektieren.



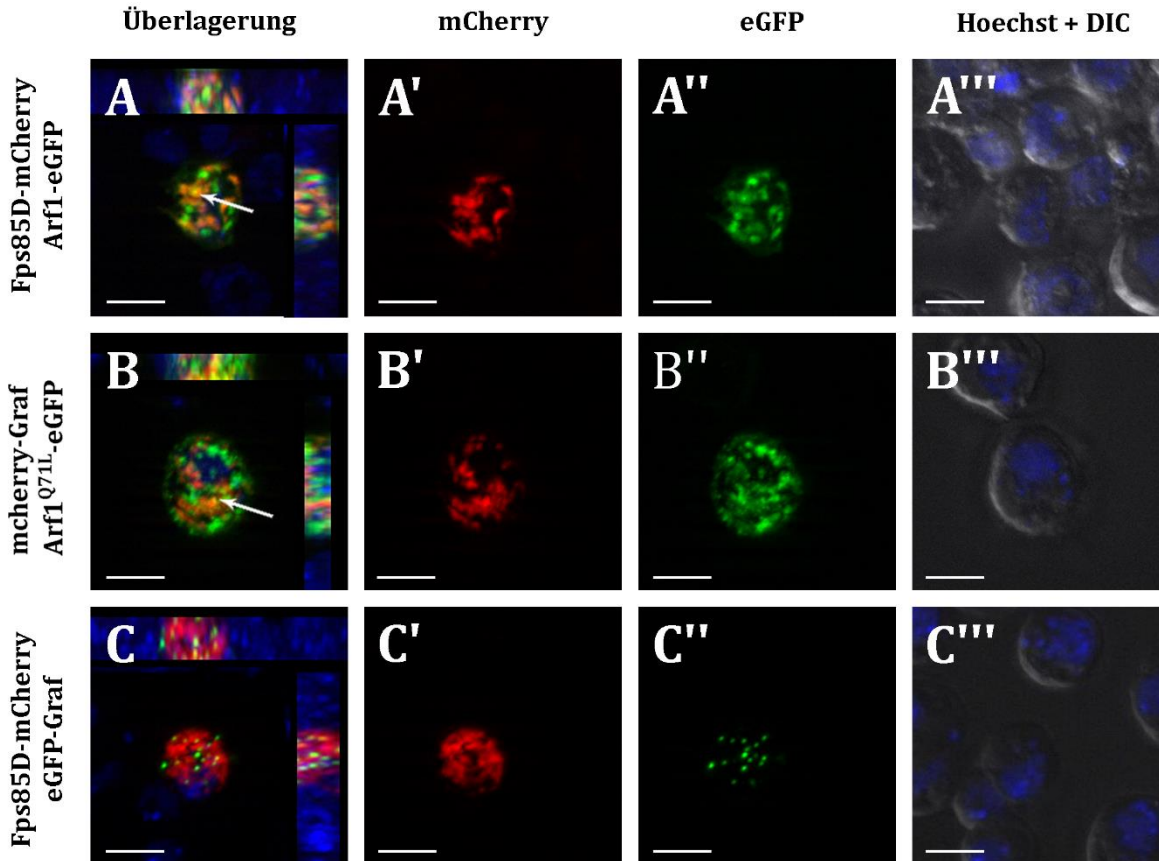
**Abb. 5.23: Fps85Dp100-mCherry und myrFps85D-mCherry co-lokalisierten partiell mit N-Cadherin<sup>TM</sup>intra-eGFP und Schizo-eGFP.** Die S2 Zellen wurden entweder mit *fps85Dp100*-mCherry oder *myrfps85Dp100*-mCherry zusammen mit *N-cadherin<sup>TM</sup>intra*-eGFP und *schizo*-eGFP co-transfiziert, fixiert und unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Fps85Dp100-mCherry und myrFps85Dp100-mCherry Fusionsproteine lokalisierten im cytoplasmatischen Bereich der Zellen (A'-D'). Auch N-Cadherin<sup>TM</sup>intra-eGFP (A'' und B'') und Schizo-eGFP (C'' und D'') zeigten eine Akkumulation im Cytoplasma. In diesen Bereichen war eine partielle Co-Lokalisation zwischen Fps85Dp100-mCherry und N-Cadherin<sup>TM</sup>intra-eGFP (A, Pfeil) und myrFps85Dp100-mCherry und N-Cadherin<sup>TM</sup>intra-eGFP (B, Pfeil) sowie zwischen Fps85Dp100-mCherry und Schizo-eGFP (C, Pfeile) und myr-Fps85Dp100-mCherry und Schizo-eGFP (D, Pfeile) zu sehen. Maßstabsbalken: 5 µm; grün: GFP; rot: mCherry; blau: Hoechst zur Markierung der DNA.

### 5.4.3.2 Fps85Dp100 co-lokalisierte partiell mit Arf1 und aktiviertem Arf1, jedoch nicht mit Graf

Um einen Hinweis zu bekommen, ob Fps85Dp100 eventuell auch mit Arf1 und Graf zusammen in einem Endocytoseweg wirken kann, wurden zunächst Co-Lokalisationsstudien in transfizierten S2 Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden dafür mit *fps85Dp100*-mCherry und *arf1*-eGFP, *fps85Dp100*-mCherry und *arf1<sup>Q71L</sup>*-eGFP oder *fps85Dp100*-mCherry und eGFP-*graf* co-transfiziert, fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Zu sehen sind die Überlagerungen (Abb. 5.24 A-C) der mCherry- (Abb. 5.24 A'-C') und eGFP-Kanäle (Abb. 5.24 A''-C'') sowie des DNA-Nachweises mittels Hoechst (Abb. 5.24 A'''-C''').

Sowohl das Fps85Dp100-mCherry Fusionsprotein als auch die Arf1-eGFP und Arf1<sup>Q71L</sup>-eGFP Fusionsproteine schienen entweder im Cytoplasma der Zellen oder an deren Membranen zu akkumulieren (Abb. 5.24 A' und A'' sowie B' und B'' und C'). Eine partielle Co-Lokalisation zwischen Fps85Dp100-mCherry und Arf1-eGFP und Fps85Dp100-mCherry und Arf1<sup>Q71L</sup>-eGFP könnte in einzelnen intrazellulären Bereichen der Zellen möglich gewesen sein (Abb. 5.24 A und B, Pfeile). eGFP-Graf lokalisierte wie zuvor beobachtet in vesikulären Strukturen (Abb. 5.24 C''), zeigte jedoch keine Co-Lokalisation mit Fps85Dp100-mCherry (Abb. 5.24 C).





**Abb. 5.24: Partielle Co-Lokalisationen waren zwischen dem Fps85Dp100-mCherry Fusionsprotein und Arf1-eGFP sowie Arf1<sup>Q71L</sup>-eGFP möglich, jedoch nicht zwischen Fps85Dp100-mCherry und eGFP-Graf.** S2 Zellen wurden mit den jeweiligen UAS-Konstrukten co-transfiziert, fixiert und unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. In den Überlagerungen ließen sich möglicherweise Co-Lokalisationen zwischen den Fps85Dp100-mCherry und Arf1-eGFP sowie Arf1<sup>Q71L</sup>-eGFP Fusionsproteinen erkennen (A und B, Pfeile). Die Konstrukte schienen entweder im Cytoplasma oder an der Zellmembran zu akkumulieren (A' und B' sowie A'' und B''). Das eGFP-Graf Fusionsprotein lokalisierte in vesikulären Strukturen (C''). Eine Co-Lokalisation mit Fps85Dp100-mCherry konnte nicht beobachtet werden (C). Maßstabsbalken: 5 µm; grün: GFP; rot: mCherry; blau: Hoechst zur Markierung der DNA.

#### 5.4.4 Bislang konnten noch keine direkten Interaktionspartner von Fps85Dp100 identifiziert werden

Eine Lokalisation von Fps85Dp100 an den Anheftungsstellen der Myotuben sowie eine Co-Lokalisation mit N-Cadherin an den Membranen konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden. Trotzdem ist noch unklar, welche Funktion das Protein während der Myoblastenfusion übernehmen

könnte. Um mögliche Interaktionspartner zu identifizieren, wurde der gesamte offene Leserahmen der Isoform p100 von *fps85D* in beide Hefe-Expressionsvektoren kloniert. Anschließend wurden Interaktionstests sowohl mit verschiedenen an der Internalisierung von N-Cadherin beteiligten Proteinen als auch mit weiteren Faktoren der Myoblastenfusion durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst. Es konnte keine direkte Interaktion auf Proteinebene zwischen Fps85Dp100 und N-Cadherin oder Schizo sowie Arf1 beziehungsweise Arf1<sup>Q71L</sup> gezeigt werden, welche eine Rolle bei der Internalisierung spielen. Auch mit den in die CLIC/GEEC-Endocytose involvierten Proteinen Graf und Cdc42 scheint Fps85Dp100 nicht zu interagieren. Weiterhin konnte keine Verbindung zu den Aktinregulatoren Kette, Abi sowie dem Formin Dia gezeigt werden. Auch mit dem IgSF-Protein Hbs und dem Adapterprotein Dock war keine Interaktion detektierbar.

**Tab. 5.2: Fps85Dp100-Interaktionstests im Hefe 2-Hybridsystem.** Getestet wurden Proteine, welche an der N-Cadherin Regulation, an Endocytoseprozessen im Allgemeinen, der Aktinregulation oder der Weiterleitung des Signals an das Aktincytoskelett beteiligt sind sowie das IgSF-Protein Hbs. (+) Interaktion; (-) keine Interaktion. Es wurden drei unabhängige Interaktionstests zur Bestätigung des Ergebnisses durchgeführt.

Protein	Ergebnis
beteiligt an der N-Cadherin Regulation	
N-Cadherin	-
Schizo	-
Arf1	-
Arf1 <sup>Q71L</sup>	-
beteiligt an Endocytoseprozessen	
Cdc42	-
Graf	-
beteiligt an der Aktinregulation	
Kette	-
Abi	-
Dia	-
IgSF/Weiterleitung an das Aktincytoskelett	
Hbs	-
Dock	-

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mithilfe des Hefe 2-Hybridsystems keine direkten Interaktionspartner von Fps85Dp100 identifiziert werden. Allerdings ist nicht klar, ob die Ergebnisse möglicherweise auf eine nicht erfolgte Expression des Fusionsproteins im Hefesystem zurückzuführen sind. Eine Beteiligung von Fps85D an der Regulation der Endocytose von N-Cadherin scheint aufgrund der zuvor gewonnenen Ergebnisse wahrscheinlich. Eine Einordnung des Proteins in einen Signalweg kann zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht erfolgen.

## 6. Diskussion

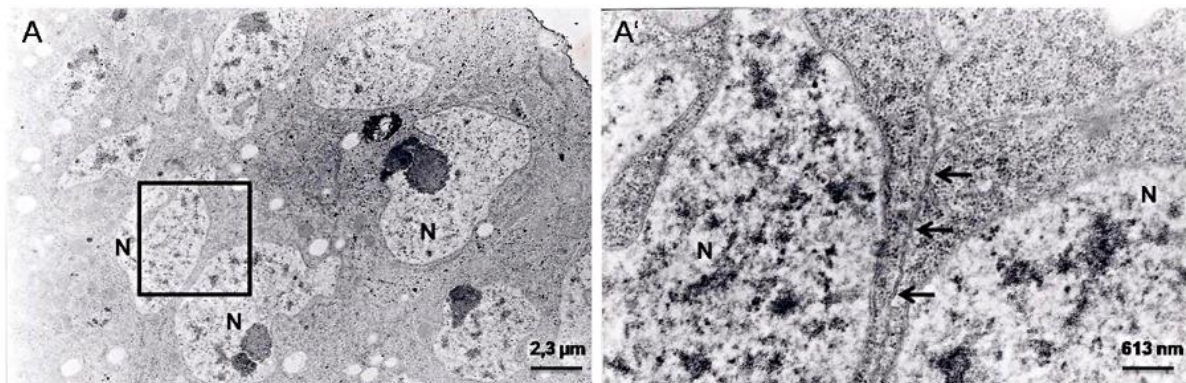
Während der Entwicklung der somatischen Muskulatur im Embryo von *D. melanogaster* fusionieren mehrere FCs mit einer FC/wachsenden Myotube und bilden dadurch die larvale Muskulatur. Die dafür essentielle Adhäsion der Myoblasten wird von Molekülen der Immunoglobulin-Superfamilie vermittelt (Önel und Renkawitz-Pohl, 2009). Auch das Zelladhäsionsprotein N-Cadherin scheint eine Rolle bei der Adhäsion der Myoblasten zu spielen (Dottermusch-Heidel et al., 2012). Auf ultrastruktureller Ebene wurden während der Myoblastenfusion elektronendichte Bereiche, sogenannte elektronendichte Plaques, an den Kontaktstellen beschrieben (Doberstein et al., 1997). Neueste Studien postulieren, dass es sich dabei um Myoblasten-spezifische zelluläre Junctions handelt, welche durch N-Cadherin gebildet werden (Hamp et al., revised version). Für eine erfolgreiche Fusion muss jedoch der Abstand zwischen den Membranen verringert werden, was eine nahezu vollständige Entfernung der Transmembranproteine von der Kontaktstelle voraussetzt (Martens und McMahon, 2008). Die Internalisierung von N-Cadherin scheint durch den Arf1-GEF Schizo/Loner reguliert zu werden (Dottermusch-Heidel et al., 2012). Der daran beteiligte Endocytoseweg konnte bislang jedoch noch nicht identifiziert werden. Durch einen Verlust von Schizo scheint die Endocytose von N-Cadherin gestört zu sein und der Abstand zwischen den Zellmembranen kann nicht reduziert werden (Dottermusch-Heidel et al., 2012), was zu einem starken Fusionsdefekt mit zahlreichen unfusionierten Myoblasten führt (Chen et al., 2003). Falls die Membranen sich nicht weit genug annähern, sollte eine Vesikulierung dieser und dadurch die Bildung von Fusionsporen nicht zu beobachten sein. Im ersten Teil der Arbeit sollte deshalb zunächst die Frage geklärt werden, ob der Fusionsprozess in den *schizo*-Mutanten vor der Vesikulierung der Membranen stoppt.

### 6.1 In *schizo*-Mutanten stoppt die Fusion überwiegend vor Ausbildung der Fusionsporen

Durch Cadherine-vermittelte zelluläre Junctions wie zum Beispiel in der excitatorischen Synapse im Gehirn der Maus oder in Epithelzellen von *D. melanogaster* zeichnen sich auf ultrastruktureller Ebene durch eine Akkumulation von elektronendichtem Material aus (Önel et al., 2014). Diese Anreicherungen ähneln den während der Myoblastenfusion beschriebenen elektronendichten Plaques (Doberstein et al., 1997). In *kette*-Mutanten sind die elektronendichten Plaques im Vergleich zum Wildtyp vergrößert (Schröter et al., 2004). Diese Beobachtung ist möglicherweise auf eine Akkumulation von N-Cadherin an den Kontaktstellen zurückzuführen, welches in der Mutante nicht abgebaut wird. Zudem wird durch diese Anreicherung vermutlich die Bildung von Fusionsporen verhindert (Hamp et al., revised version). Dhanyasi et al. (2015) konnten zeigen, dass bei der Bildung

der indirekten Flugmuskulatur von *D. melanogaster* mehrere Fusionsporen ausgebildet werden, bevor die FCM in die wachsende Myotube integriert wird. Überdies wurde beschrieben, dass der Abstand zwischen den Membranen an mehreren Stellen verringert wurde und dadurch multiple Kontaktstellen auf ultrastruktureller Ebene erkennbar waren (Dhanyasi et al., 2015). Inwiefern die elektronendichten Plaques jedoch zu der Myoblastenfusion beitragen und ob es sich dabei um die Kontaktstellen handelt, an denen im weiteren Verlauf die Fusionsporen entstehen, ist bislang nicht geklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst untersucht werden, ob es in *schizo*-Mutanten zu einer Vesikulierung der Membranen und dadurch zur Bildung von Fusionsporen kommt. Hierzu wurde ein GFP-Diffusionsversuch durchgeführt, bei welchem eGFP in FCs exprimiert wurde und nur nach Erreichen einer cytoplasmatischen Kontinuität in die FCMs diffundieren konnte. In diesem Versuch konnte in den meisten FCMs der *schizo*-Mutanten kein eGFP-Signal detektiert werden (siehe Abb. 5.2), demnach scheint kein eGFP von den FCs in die adhärierenden FCMs diffundiert zu sein. Die in seltenen Fällen beobachteten eGFP-positiven Myoblasten könnten auf wenige vereinzelt stattfindende Fusionsereignisse hindeuten. Trotzdem lässt das zumeist fehlende eGFP-Signal in den FCMs vermuten, dass in den Mutanten keine Vesikulierung der Membranen an der Kontaktstelle stattfindet und es daher nicht zur Bildung von Fusionsporen und zur cytoplasmatischen Kontinuität kommt. Das Ergebnis des durchgeführten GFP-Diffusionsversuches bestätigt auch vorherige transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen mittels chemischer Fixierung (Masterarbeit C. Braukmann, 2012). Die Übersicht zeigt zwei adhärierende Myoblasten sowie deren Nuklei (Abb. 6.1 A, N=Nukleus). In der Vergrößerung war zu erkennen, dass die Membranen zwischen den Myoblasten intakt waren und keine Vesikulierung stattfand (Abb. 6.1 A', Pfeile). Die Bildung einer Fusionspore und die dadurch entstehende cytoplasmatische Kontinuität schienen nicht erreicht zu werden. Auch die Ausbildung elektronendichter Plaques konnten in diesen Aufnahmen nicht beobachtet werden, ein möglicher Grund dafür könnte die Fixierungsmethode sein (Masterarbeit C. Braukmann, 2012).



**Abb. 6.1:** In der *schizo*-Mutante kommt es nicht zur Vesikulierung der Membranen. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen zweier adhärerender Myoblasten sind in der Übersicht zu sehen (A). Die Membranen zwischen den Myoblasten schienen intakt zu bleiben (A', Pfeile). Elektronendichte Plaques waren nicht zu sehen. Maßstabsbalken: 2,3 µm beziehungsweise 613 nm; N=Nukleus. (Masterarbeit C. Braukmann, 2012.).

Diese Ergebnisse sollten jedoch noch mithilfe weiterer transmissionselektronenmikroskopischer Analysen bestätigt werden. Aufgrund der besseren Konservierung der Membranen (McDonald und Auer, 2006) sollten die Versuche auf ultrastruktureller Ebene mittels HPF/FS wiederholt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits erste Experimente mit dieser Fixierungsmethode durchgeführt, jedoch führten diese bislang zu keinem Ergebnis, da sehr viele Embryonen während der Fixierung verloren gingen und zudem die Membranen der Embryonen nicht gut genug konserviert werden konnten. Eine Auswertung der Präparate war daher nicht möglich.

Immunhistochemische Studien in Embryonen (Dottermusch-Heidel et al., 2012) sowie S2 Zellen (siehe 5.2.2.3) zeigten, dass N-Cadherin an den Plasmamembranen lokalisiert. Bei erfolgreicher Fixierung der Embryonen könnte mittels immunelektronenmikroskopischer Untersuchungen die Lokalisation von N-Cadherin an den Membranen der Myoblasten (Dottermusch-Heidel et al., 2012) bestätigt werden. N-Cadherin könnte dabei entweder mithilfe des spezifischen Antikörpers (Iwai et al., 1997) oder nach Expression des N-Cadherin<sup>TM</sup><sub>intra</sub> eGFP-Fusionsproteins in den Myoblasten mittels Antikörpernachweis des GFP-Anhangs detektiert werden. Überdies könnte analysiert werden, ob N-Cadherin auch im Bereich der elektronendichten Strukturen an den Kontaktstellen der Myoblasten lokalisiert. Möglicherweise könnte auch eine verstärkte Akkumulation von N-Cadherin und dadurch eine vermehrte Bildung der elektronendichten Plaques in *schizo*-Mutanten detektiert werden. Falls die Bildung der elektronendichten Bereiche auf Cadherine zurückzuführen ist, sollten diese im Vergleich zum Wildtyp in *schizo*-Mutanten vermehrt auftreten, da N-Cadherin vermutlich

nicht internalisiert wird. Jedoch tragen wahrscheinlich nicht nur Cadherine sondern auch weitere Proteine zu der Ausbildung dieser Strukturen bei.

Die hier gezeigten Ergebnisse des GFP-Diffusionsversuches sowie die elektronenmikroskopischen Daten (Masterarbeit C. Braukmann, 2012) unterstützen die Vermutung, dass N-Cadherin in *schizo*-Mutanten nicht internalisiert wird und daher eine Annäherung der Membranen nicht möglich ist. Auch eine Messung des Abstandes zwischen den beiden Myoblasten könnte möglicherweise einen weiteren Hinweis darauf geben, ob es sich tatsächlich um den für Cadherine beschriebenen Abstand von 32 nm bis 44 nm (Sivasankar, 1999) handelt.

## 6.2 Analysen zur Beteiligung von Fps85D an der Myoblastenfusion

Durch eine verstärkte Stabilisierung von N-Cadherin an der Membran kann die Adhäsionsstärke in Adherens Junctions erhöht werden, wodurch möglicherweise eine Internalisierung von N-Cadherin verhindert wird. Im Zusammenhang mit einer Stabilisierung oder Destabilisierung der N-Cadherin-vermittelten Adherens Junctions wurden in Vertebraten die nicht-Rezeptor Tyrosinkinasen Fps/Fes/Fer beschrieben (El Sayegh et al., 2005). N-Cadherin induziert die Phosphorylierung von Fer, wodurch die Kinase aktiviert wird. Im aktivierten Zustand erfolgt die Phosphorylierung von Cortactin durch Fer, was zu einer Steigerung der Adhäsionsstärke zwischen den Zellen führt. Eine direkte Bindung von Cortactin an N-Cadherin ist jedoch auch ohne Phosphorylierung möglich (El Sayegh et al., 2005). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Fps85D während der Myoblastenfusion an einer Stabilisierung oder Destabilisierung von N-Cadherin an der Membran beteiligt ist. Mithilfe der durchgeführten Experimente konnten sowohl Hinweise auf eine Funktion von Fps85D bei der Internalisierung von N-Cadherin als auch bei dessen Stabilisierung an der Membran gewonnen werden.

### 6.2.1 Fps85D scheint eine Rolle während der Myoblastenfusion zu spielen und interagiert möglicherweise mit N-Cadherin auf genetischer Ebene

Bei Fps85D handelt es sich um das *D. melanogaster* Ortholog zu den Fes und Fer Kinasen in Vertebraten (Flybase). Frühere Studien zeigten, dass die nicht-Rezeptor Tyrosinkinase Fps85D mit Src42A bei der Ausbildung des Dorsalschlusses zusammen wirkt (Murray et al., 2006). In weiteren Untersuchungen wurde postuliert, dass durch den Verlust von Fps85D wahrscheinlich weniger  $\beta$ -Catenin phosphoryliert wird. Eine konstitutive Aktivierung der Kinasedomäne führt hingegen zu einer stärkeren Phosphorylierung, jedoch möglicherweise auch zum Verlust von  $\beta$ -Catenin in den

Adherens Junctions, wodurch es zu einer Destabilisierung kommt (Murray et al., 2006). Aktiviert wird Fer scheinbar entweder durch eine Autophosphorylierung oder durch eine andere Tyrosinkinase wie zum Beispiel die Fyn oder die Yes Kinase (El Sayegh et al., 2005). In der Epidermis konnte eine Lokalisation von Fps85D in den Embryonalstadien elf und zwölf mittels Antikörpernachweis an den Zell-Zellkontakten gezeigt werden. Im dorsalen Bereich war auch eine partielle Co-Lokalisation mit E-Cadherin zu sehen. Die Spezifität des verwendeten Antikörpers, welcher im N-terminalen Bereich des Proteins bindet, wurde anhand einer *fps85D*-mutanten Linie verifiziert (Murray et al., 2006). Mittels N-terminaler Myristoylierung wird vermutlich eine für die Autoregulation benötigte intramolekulare Interaktion verhindert, was zu einer konstitutiven Aktivierung führt (Greer et al., 1994). Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mittels N-terminalem Myristoylierungssignal ein konstitutiv-aktiviertes Fusionsprotein, welches demnach der phosphorylierten Variante entsprechen sollte, generiert. Dieses Fusionsprotein trägt zusätzlich einen mCherry Anhang. Durch einen Antikörpernachweis des Anhangs konnte die Lokalisation des Fusionsproteins zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung im Embryo von *D. melanogaster* detektiert werden (siehe 5.4.2.1). Der in den Studien von Murray et al., (2006) verwendete Antikörper (anti-DFer) sollte verwendet werden, um die Lokalisation der generierten Konstrukte mit dem endogenen Protein zu vergleichen. Leider ließ sich Fps85D im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht mit diesem Antikörper nachweisen. Daher war es nicht möglich zu überprüfen, ob die Fps85Dp100 Fusionsproteine ähnlich wie das endogene Protein lokalisierten. Im Vergleich zeigten die Fps85Dp100 Fusionsproteine mit verschiedenen Anhängen jedoch die gleiche Lokalisation, was darauf schließen lässt, dass die Proteinlokalisierung nicht durch den jeweiligen Anhang beeinflusst wird (siehe 5.4.2.1 sowie 5.4.2.2). Die Überexpression der generierten Fusionsproteine führte lediglich zu einem schwachen Fusionsdefekt (siehe 5.4.2.1). Die phänotypische Analyse der Embryonen ließ ein nahezu wildtypisches Muskelmuster mit vereinzelt unfusionierten Myoblasten erkennen. Auch durch die Expression einer verkürzten Proteinvariante mit deletierter SH2- und Tyrosinkinasedomäne kam es nicht zu einem Defekt bei der Ausbildung der somatischen Muskulatur (siehe 5.4.2.3). Das Konstrukt der kürzeren Proteinvariante scheint demnach nicht dominant-negativ zu wirken. Zudem war keine veränderte Lokalisation des Fusionsproteins zu sehen. Durch eine N-terminale Myristoylierung von Fps85D änderte sich weder Proteinlokalisierung noch der resultierende Phänotyp. Auch im visceralen Mesoderm zeigten sich keine Defekte durch die Expression der myristoylierten sowie unmyristoylierten Isoform p100 von Fps85D (siehe 5.4.2.5 und 5.4.2.6) Für die Generierung aller Konstrukte wurde die Isoform p100 verwendet, eine von insgesamt vier Isoformen, welche in *D. melanogaster* exprimiert sind (Katzen et al., 1991; Paulson et al., 1997; Murray et al., 2006). Diese Isoform war die einzige, welche zu Beginn der Experimente als cDNA zur



Verfügung stand. Die in früheren Studien gezeigten starken Fusionsdefekte wurden jedoch bei einer Expression der myristoylierten Form der Isoform p92 beobachtet. Eine Überexpression der Isoform p100 von Fps85D hingegen führte lediglich zu leichten Defekten bei der Ausbildung der somatischen Muskulatur (Masterarbeit C. Braukmann, 2012). Eventuell ist statt der Isoform p100 die Isoform p92 hauptsächlich an der Myoblastenfusion beteiligt, weshalb eine Expression der modifizierten Isoform p100 nicht zu einem Fusionsdefekt führte. Eine weitere Möglichkeit wäre eine redundante Wirkung der Isoformen untereinander. Die phänotypische Analyse einer Nullmutante, *fps85D<sup>X21</sup>*, zeigte keinen Fusionsdefekt (Masterarbeit C. Braukmann, 2012). Bei dieser Mutante wird die Expression sowohl der Isoform p100 als auch der Isoform p92 verhindert, die Linie ist jedoch vital. Das lässt die Vermutung zu, dass möglicherweise noch eine weitere Isoform oder aber ein weiteres Protein in Redundanz zu Fps85D wirken kann, welches bislang noch nicht identifiziert wurde. Eine Beteiligung der Isoform p100 von Fps85D an der Myoblastenfusion kann aufgrund dieser Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden und scheint angesichts der leichten Defekte mit vereinzelt auftretenden unfusionierten Myoblasten weiterhin denkbar.

### **6.2.2 Co-Lokalisationen in S2 Zellen deuten auf eine Beteiligung von Fps85D an der Regulation von N-Cadherin hin**

Für Studien zur Lokalisation und möglichen Co-Lokalisation von Fps85D mit verschiedenen an der Internalisierung von N-Cadherin beteiligten Proteinen, wurden zunächst *Drosophila* S2 Zellen verwendet. Fps85D-mCherry lokalisierte in Vesikel-artigen Strukturen im Cytoplasma der Zellen. Eine gleichmäßige cytoplasmatische Lokalisation wurde nicht detektiert (siehe 5.4.3.1). Auch eine Co-Lokalisation zwischen Fps85D und Rab5 konnte in S2 Zellen nicht gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Mögliche Co-Lokalisationen mit anderen Vesikelmakern wurden aufgrund fehlender funktioneller Antikörper in S2 Zellen nicht durchgeführt. Bisher ist demnach noch unklar, um welche Art von Vesikeln es sich bei den beobachteten Fps85D-positiven Strukturen handeln könnte. Entgegen früherer Beobachtungen, dass *fer* ubiquitär exprimiert ist und sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleus vorliegt (Rosato et al., 1998), zeigten spätere Untersuchungen, dass Fer und auch Fps in Cos-I Zellen nicht im Nukleus lokalisierten (Zirngibl et al., 2001). Die Fusionsproteine Fps-GFP und Fer-GFP lokalisierten cytoplasmatisch, wobei Fps-GFP zusätzlich in Vesikeln zu detektieren war. Fps schien in der perinukleären Region angereichert zu sein und co-lokalisierte in diesem Bereich mit dem trans-Golgi Marker TGN38. Außerdem wurde eine Co-Lokalisation zwischen Fps und Rab1A sowie Rab3A beschrieben (Zirngibl et al., 2001). Rab1A ist ein Marker für Vesikel, die vom Endoplasmatischen Retikulum abgeschnürt werden und mit dem cis-Golgi fusionieren. Bei Rab3A

handelt es sich um einen Marker auf Vesikeln, die vom Golgi abgeschnürt und an der Plasmamembran sekretiert werden. Eine partielle Co-Lokalisation wurde auch mit Rab5, einem Marker für frühe Endosomen und Rab7, einem Marker für späte Endosomen beziehungsweise Lysosomen, gezeigt (Zirngibl et al., 2001).

Für die vesikuläre Lokalisation von Fps scheint die Kinasedomäne notwendig zu sein (Zirngibl et al., 2001). In Cos-1 Zellen führte eine Mutation, welche die Funktion der Kinasedomäne inaktiviert (K588R), zum Verlust der Lokalisation des Proteins in vesikulären Strukturen (Zirngibl et al., 2001). Das Fps85Dp100 Fusionsprotein mit deletierter SH2- und Tyrosinkinasedomäne konnte zwar in Embryonen (siehe 5.4.2.3), jedoch nicht in S2 Zellen mittels Antikörpernachweis des Myc-Anhangs detektiert werden. Eine Aussage über eine veränderte Lokalisation durch den Verlust der SH2- und Kinasedomäne ist in S2 Zellen deshalb nicht möglich. Um dennoch zu analysieren, ob eine Deletion der beiden Domänen auch in *Drosophila* S2 Zellen zu einer veränderten intrazellulären Lokalisation führt, müsste das Konstrukt mit deletierter SH2- und Tyrosinkinasedomäne in einen Expressionsvektor mit mCherry- oder eGFP-Anhang eingebracht und in S2 Zellen exprimiert werden. N-Cadherin<sup>TM</sup><sub>intra</sub> schien bei einer Co-Transfektion mit Fps85D beziehungsweise myrFps85D eine veränderte Lokalisation zu zeigen. Statt der zuvor beobachteten Lokalisation an der Membran (siehe 5.2.2.3) akkumulierte das Fusionsprotein im Cytoplasma (siehe 5.4.3.1). Durch das Myristoylierungssignal sollte das Fps85D Fusionsprotein eigentlich eine Lokalisation an der Zellmembran zeigen und dort möglicherweise auch mit N-Cadherin co-lokalisieren. Das war in den Zellen jedoch nicht sichtbar. Eine Erklärung hierfür wäre, dass Fps85Dp100 durch das Myristoylierungssignal zwar aktiviert, jedoch an die Membranen der Vesikel gebunden werden könnte. Um eine Lokalisation an der Zellmembran entweder zu bestätigen oder auszuschließen, könnte die Zellmembran mithilfe eines Membranmarkers sichtbar gemacht werden. Zusätzlich könnte mittels Live-Imaging Studien in S2 Zellen analysiert werden, ob N-Cadherin und Fps85D möglicherweise transient an der Plasmamembran lokalisieren.

### **6.2.3 Co-Lokalisationsstudien im Embryo sowie Studien zur genetischen Interaktion deuten auf eine Beteiligung von Fps85D an der Regulation von N-Cadherin hin**

Im Embryo von *D. melanogaster* zeigte das Fps85D Fusionsprotein mit deletierter SH2- und Tyrosinkinasedomäne die gleiche Lokalisation (siehe 5.4.2.3) wie das komplette Fps85D Fusionsprotein (siehe 5.4.2.2). Hierbei konnte eine Lokalisation an den Membranen der Myoblasten sowie den Anheftungsstellen der Muskeln an die Epidermis detektiert werden. Eine vereinzelte punktuerte Verteilung konnte zudem bei dem N-terminal myristoylierten Fps85D Fusionsprotein

beobachtet werden (siehe 5.4.2.1). Eine durch diese Modifikation verursachte verstärkte Akkumulation des Proteins an der Membran war jedoch nicht zu erkennen. Eine Co-Lokalisation zwischen den Fps85D Fusionsproteinen und N-Cadherin konnte an den Membranen der Myoblasten gezeigt werden (siehe 5.4.2.4). Die Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass Fps85D an der Regulation der N-Cadherin-vermittelten Adhäsion beteiligt sein könnte. Im Wildtyp ist N-Cadherin bis Stadium 14 an den Membranen lokalisiert und kann danach nicht mehr detektiert werden (Dottermusch-Heidel et al., 2012). Wenn Fps85D zur Stabilisierung von N-Cadherin beiträgt und eine Myristoylierung von Fps85D den Abbau von N-Cadherin von der Membran verhindert, sollte das Protein auch in Stadium 15 und 16 an den Membranen nachweisbar sein. Auch eine eventuelle Co-Lokalisation zwischen der Isoform p100 und N-Cadherin an den Anheftungsstellen der Muskeln könnte dadurch überprüft werden.

Zur Untersuchung einer genetischen Interaktion zwischen N-Cadherin und Fps85D wurde eine rekombinante Fliegenlinie generiert, welche die myristoylierte Isoform p92 von Fps85D im *N-cadherin*-mutanten Hintergrund trägt. Die Expression der myristoylierten Isoform p92 im wildtypischen Hintergrund führte zu einem Fusionsdefekt mit zahlreichen unfusionierten Myoblasten (Masterarbeit C. Braukmann, 2012). Falls Fps85D eine stabilisierende Wirkung auf die N-Cadherin-vermittelten Junctions hat, sollte in der generierten rekombinanten Linie dieser starke Fusionsdefekt abgeschwächt sein. Da in der *N-cadherin* Mutante kein N-Cadherin an den Membranen vorhanden ist, kann dieses auch nicht stabilisiert werden und die Fusion sollte nahezu wildtypisch stattfinden. Die Expression des myristoylierten Fps85D im *N-cadherin*-mutanten Hintergrund mittels *Mef2*-Gal4 führte jedoch zu einem variablen Phänotyp, bei dem sowohl Abschwächungen als auch Verstärkungen der Fusionsdefekte zu erkennen waren (siehe 5.4.1). Zudem konnte aufgrund eines nicht nachweisbaren Balancers nicht eindeutig zwischen homo- und heterozygoten Tieren unterschieden werden. Die *N-cadherin*;*Mef2*-Gal4 Treiberlinie, in welcher der Balancer nicht nachweisbar war, wurde mittels Allelietest auf ihre Richtigkeit überprüft und verifiziert. Unklar bleibt jedoch, warum der Balancer nicht mithilfe eines Antikörperrnachweises detektiert werden konnte. Um den Versuch eindeutig auswerten zu können, sollte ein neuer Balancer in die Treiberlinie eingekreuzt und das Experiment mit der neu generierten Fliegenlinie wiederholt werden. Trotzdem deutet der veränderte Phänotyp auf eine genetische Interaktion zwischen *fps85D* und *N-cadherin* hin. Aussagen zu einer stabilisierenden oder destabilisierenden Wirkung auf die Adherens Junctions, ähnlich wie in Vertebraten, können jedoch nicht getroffen werden.

#### 6.2.4 Bislang konnten keine direkten Interaktionspartner von Fps85D in *D. melanogaster* identifiziert werden

Um die Funktion von Fps85D während der Myoblastenfusion weiter aufzuklären, ist es notwendig direkte Interaktionspartner zu identifizieren. Dafür wurden erste Interaktionstests mithilfe des Hefe 2-Hybridsystems durchgeführt. Weder mit Schizo noch mit der Transmembran- und intrazellulären Domäne von N-Cadherin konnte eine Interaktion mit Fps85D auf Proteinebene gezeigt werden (siehe 5.4.4). Aufgrund fehlender nachgewiesener Interaktionen ist nicht eindeutig, ob Fps85D in Hefe exprimiert und korrekt gefaltet wird. Mittels Western Blot Analysen an Extrakten aus Hefezellen könnte die Expression des Proteins gezeigt werden. Zur Identifizierung von Interaktionspartnern von Fps85D könnte ein globaler Hefe 2-Hybrid Screen durchgeführt werden. Jedoch müsste auch dafür eine korrekte Faltung und Expression des Fusionsproteins in Hefe gewährleistet sein.

Auch ein genetischer Modifier Screen im Auge von *D. melanogaster* ermöglicht die Identifikation von Interaktionspartnern (Barrett et al., 1997; St. Johnston, 2002). Mithilfe dieser Methode lassen sich auch Gene auf eine Interaktion hin untersuchen, welche eigentlich nicht im Auge exprimiert werden, sofern sie bei der ektopischen Expression einen sogenannten rauen Augenphänotyp verursachen. Eine genetische Interaktion zeigt sich in diesem Versuch entweder durch eine Verstärkung oder durch eine Abschwächung des rauen Augenphänotyps bei gleichzeitiger Expression der auf Interaktion zu testenden Gene (Barrett et al., 1997; St. Johnston, 2002). Frühere Analysen zeigten, dass die Expression der Isoform p100 von *fps85D* mittels *gmr*-Gal4 im Auge zu einer starken Ausprägung des rauen Augenphänotyps führte (Masterarbeit C. Braukmann, 2012). Das sonst regelmäßige Muster des wildtypischen Auges war deutlich zerstört. Fps85Dp100 eignet sich demnach für die Durchführung des genetischen Modifier Screens (Masterarbeit C. Braukmann, 2012). Für den Interaktionstest sollte eine Fliegenlinie generiert werden, welche sowohl das zur Expression im Auge benötigte *gmr*-Gal4 (Hay et al., 1994) als auch *fps85Dp100* unter UAS-Kontrolle trägt. Diese Linie wäre mit einer Mutante eines auf Interaktion zu testenden Gens verkreuzt und die Augen der F<sub>1</sub>-Generation wären mithilfe eines Rasterelektronenmikroskops analysiert worden. Da das bereits etablierte *fps85Dp100*-Konstrukt und auch *gmr*-Gal4 auf dem zweiten Chromosom liegen, musste eine rekombinante Fliegenlinie generiert werden. Allelietests zum Nachweis einer erfolgten Rekombination konnten nicht durchgeführt werden, weil keines der beiden Gene homozygot letal ist. Mittels PCR-Analysen mit DNA, welche aus einer einzelnen Fliege gewonnen wurde, sollte das *fps85D*-Konstrukt in der Linie nachgewiesen werden, was jedoch zu keinem eindeutigen Ergebnis führte. Das Vorhandensein sowohl des Treibers als auch des UAS-Konstrukts konnte deshalb nicht eindeutig nachgewiesen und die Linie nicht für weitere Versuche verwendet werden.

In Vertebraten wurde lediglich eine indirekte Beteiligung von Fes/Fer an der Regulation von N-Cadherin-vermittelten Adherens Junctions beschrieben. Diese erfolgt wahrscheinlich entweder über p120 Catenin (Greer, 2002),  $\beta$ -Catenin (El Sayegh et al., 2005) oder PTP1B (Xu et al., 2004). Das *D. melanogaster* Homolog von PTP1B, PTP61F, wurde bereits im Rahmen einer Bachelorarbeit näher untersucht. Bei der dabei analysierten Isoform handelte es sich jedoch um eine Form, welche im Nukleus lokalisierte und sich daher nicht für weitere Untersuchungen eignete (Bachelorarbeit C. Diehl, 2014). Im Rahmen weiterer Versuche bezüglich der Suche nach Interaktionspartnern von Fps85D sollte auch getestet werden, ob eine direkte Interaktion zwischen Fps85D und p120 Catenin oder  $\beta$ -Catenin nachweisbar ist. Da Fps85D aufgrund fehlender identifizierter Interaktionspartner jedoch bisher nicht in einen Signalweg eingeordnet werden konnte, kann lediglich vermutet werden, dass das Protein eine Funktion bei der Regulation der N-Cadherin-vermittelten Adhäsion übernimmt.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Fps85D in die Myoblastenfusion involviert ist. Dabei scheint es möglicherweise eine Funktion während der Anheftung der Muskeln an die Epidermis zu übernehmen. Die beobachteten Co-Lokalisationen zwischen Fps85D und Schizo, Arf1 und N-Cadherin in *Drosophila* S2 Zellen deuten auf eine Funktion während der Endocytose und damit auf eine destabilisierende Wirkung auf die N-Cadherin-vermittelten Adherens Junctions hin. Der durch die Expression der myristoylierten Isoform p92 verursachte Fusionsdefekt lässt hingegen auf eine Stabilisierung von N-Cadherin an den Membranen schließen. Eine direkte Interaktion zwischen N-Cadherin und Fps85D konnte zwar nicht beobachtet werden, in Embryonen konnte jedoch gezeigt werden, dass beide Proteine an den Membranen der Myoblasten co-lokalisieren. Es bleibt weiterhin unklar, welche Wirkung Fps85D auf die Stärke der N-Cadherin-vermittelten Adherens Junctions hat. Denkbar wäre auch, dass N-Cadherin zunächst von Fps85D an der Membran stabilisiert wird, die Kinase jedoch zudem eine Funktion bei der Endocytose übernimmt und dadurch auch destabilisierend wirkt.

### **6.3 Welcher Endocytoseprozess ist an der Internalisierung von N-Cadherin beteiligt?**

Die Myoblastenfusion scheint in der *schizo*-Mutante vor der Vesikulierung der Membranen zu stoppen (siehe 5.1). Aufgrund eines Überschusses von N-Cadherin an den Membranen könnte die Annäherung und dadurch auch die Fusion der Myoblasten verhindert werden. Neben der bereits diskutierten möglichen Stabilisierung von N-Cadherin an den Membranen führt wahrscheinlich auch eine nicht erfolgte Internalisierung des Proteins zu dem in *schizo*-Mutanten beobachteten Fusionsdefekt. Demnach scheint in der Mutante der am Abbau von N-Cadherin beteiligte

Endocytosemechanismus gestört zu sein (Dottermusch-Heidel et al., 2012). Deshalb sollte als nächstes untersucht werden, über welchen Endocytoseweg N-Cadherin internalisiert werden könnte.

### 6.3.1 Analysen zur Beteiligung von Graf und Cdc42 an der Regulation von N-Cadherin

In *D. melanogaster* wurde gezeigt, dass Schizo während der Myoblastenfusion mit Arf1 interagiert (Dottermusch-Heidel et al., 2012). In Vertebraten wurde ein Zusammenwirken von Graf1 und Cdc42 mit Arf1 bei der CLIC/GEEC Endocytose beschrieben (Lundmark et al., 2008). Aufgrund dieser Kenntnisse wurde zunächst eine Beteiligung von Graf sowie Cdc42 an der Schizo-vermittelten Endocytose von N-Cadherin in *D. melanogaster* analysiert.

#### 6.3.1.1 Graf könnte während der Myoblastenfusion mit N-Cadherin interagieren und bei dessen Internalisierung mitwirken

Im Hefe 2-Hybrid System konnte eine direkte Interaktion zwischen Graf und der intrazellulären Domäne von N-Cadherin auf Proteinebene gezeigt werden, welche wahrscheinlich durch die SH3-Domäne von Graf vermittelt wird (siehe 5.2.2.4). Die Tests wurden bei identischem Ergebnis dreimal durchgeführt. Zudem wurden für die Interaktionstests der zu testenden Proteine sowohl die pGADT7- als auch die pGBKT7-Konstrukte der jeweiligen Gene verwendet. Aufgrund der deutlichen Autoinduktion des DBD-N-Cadherin<sup>intra</sup> Fusionsproteins konnte für die Interaktionstests in diesem Fall nur AD-N-Cadherin<sup>intra</sup> verwendet werden. Auch eine Co-Transformation der Hefe mit DBD-Graf- delta PH delta RhoGAP und dem AD-Leervektor zeigte eine leichte Autoinduktion, in allen anderen Kontrollen war jedoch keine Autoinduktion zu sehen. Bei der Expression aller Graf Fusionsproteine ohne SH3-Domäne zusammen mit N-Cadherin<sup>intra</sup> konnte keine Interaktion detektiert werden. Wenn die SH3-Domäne von Graf vorhanden war, kam es hingegen zum Wachstum und zur Blaufärbung der Hefe, was auf eine Interaktion hindeutet. Auch bei Co-Expression der PH- und RhoGAP-Domäne von Graf mit N-Cadherin<sup>intra</sup> war keine Interaktion zu erkennen. Trotz der leichten Autoinduktion von DBD-Graf delta PH delta RhoGAP kann auf eine essentielle Funktion der SH3-Domäne bei der Vermittlung der Interaktion geschlossen werden. Dennoch sollte diese Interaktion und auch die Rolle der SH3-Domäne mithilfe eines zweiten Interaktionstests in einem weiteren System bestätigt werden. Von SH3-Domänen ist bekannt, dass diese bevorzugt an sogenannte Prolin-reiche Regionen (PxxP-Domänen) binden (Lim et al., 1994; Yu et al., 1994). Für N-Cadherin wurden die charakteristischen Cadherin-Repeats sowie die transmembran- und die konservierte intrazelluläre Domäne, jedoch keine Prolin-reiche Region beschrieben (Harris und

Tepass, 2010-b; Brasch et al., 2012; Dufour, 2013). Die Bindung von Graf an N-Cadherin muss also über ein anderes Motiv in der intrazellulären Domäne von N-Cadherin erfolgen. Mithilfe von verkürzten Konstrukten des intrazellulären Fragments könnte der interagierende Bereich in weiteren Tests eingeschränkt und das für die Interaktion essentielle Motiv von N-Cadherin identifiziert werden. Ein Motiv innerhalb dieser intrazellulären Domäne, zu dessen Funktion während der Myoblastenfusion von *D. melanogaster* es bereits erste Untersuchungen gibt, ist die juxtamembrane Domäne (JMD; Dissertation V. Groth, 2011). Diese Domäne wird vermutlich für die Bindung von p120 Catenin an N-Cadherin benötigt (Yonekura et al., 2007). Für die Interaktion mit Schizo scheint diese Domäne jedoch nicht essentiell zu sein (Dissertation V. Groth, 2011). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression einer verkürzten Proteinvariante der transmembran- und intrazellulären Domäne von N-Cadherin mit deletierter JMD Region nicht zu einem Fusionsdefekt führte (Dissertation V. Groth, 2011). In der intrazellulären Domäne liegen jedoch noch weitere Bereiche, welche als vorhergesagte Bindestellen für cytoplasmatische Proteine wie zum Beispiel  $\beta$ -Catenin dienen können. Hinweise auf deren Funktion während der Myoblastenfusion konnten bislang jedoch noch nicht gewonnen werden (Dissertation V. Groth, 2011).

Um die im Hefe 2-Hybridsystem gezeigten Ergebnisse zu überprüfen, wurde die Methode der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC) gewählt. Eine Expression der beiden Fusionsproteine konnte mittels Antikörpernachweis der Myc- (C-YFP) sowie HA- (N-YFP) Anhänge gezeigt werden. Bei den durchgeführten BiFC Versuchen konnte vermehrt auch ein YFP-Signal, welches Zeichen einer direkten Proteininteraktion ist, in den Kontrollen beobachtet werden. Dabei war das YFP-Signal meistens bei Proteinen mit einem C-YFP-Anhang detektierbar, welche mit dem N-YFP-Leervektor co-transfiziert wurden. Aufgrund dieser falsch-positiven Negativkontrollen kann eine Interaktion zwischen den getesteten Proteinen weder eindeutig nachgewiesen noch ausgeschlossen werden. Kodana und Hu (2012) diskutierten im Rahmen eines Reviews verschiedene Negativkontrollen im BiFC System. Untersuchungen zeigten, dass es durch ein zufälliges Aufeinandertreffen zweier nicht-interagierender Proteine zu einer Komplementation des YFP-Signals kommen kann. Deshalb sollten Leervektoren zusammen mit den zu testenden Kandidaten als Kontrolle vermieden werden. Besser eignet sich eine Mutation oder kurze Deletion im Bereich der interagierenden Region in einem der beiden Proteine. Alternativ könnte auch ein sogenannter BiFC Competition Assay durchgeführt werden. Bei dieser Methode werden die Zellen mit beiden an die YFP-Teilfragmente fusionierten Proteinen transfiziert. Zusätzlich wird jedoch noch eines der Proteine ohne Anhang in die Zellen eingebracht, welches mit dem Fusionsprotein um die

Bindung konkurriert. Bei einer echten Interaktion sollte die Anzahl der YFP-positiven Zellen dadurch sinken (Kodana und Hu, 2012).

### 6.3.1.2 Die Interaktion zwischen Graf und N-Cadherin auf Proteinebene sollte auf genetischer Ebene bestätigt werden

Nach der gezeigten Proteininteraktion zwischen Graf und N-Cadherin (siehe 5.2.2.4) sollte zusätzlich getestet werden, ob die beiden Proteine auch auf genetischer Ebene im Embryo von *D. melanogaster* interagieren. Dafür müsste zunächst eine *graf;N-cadherin* Doppelmutante generiert werden. Für das auf dem X-Chromosom liegende *graf* sind bislang allerdings keine Mutanten verfügbar. Eine Einkreuzung und anschließende Expression einer *graf*-RNAi-Linie im *N-cadherin*-mutanten Hintergrund könnte erste Hinweise auf eine mögliche genetische Interaktion liefern. Wenn Graf an der Endocytose von N-Cadherin beteiligt ist, sollte der Verlust von Graf einen *schizo*-ähnlichen Phänotyp induzieren, da der benötigte Endocytoseprozess gestört und dadurch zu viel N-Cadherin an den Membranen vorhanden ist. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein weiteres Protein die Funktion von Graf übernehmen und die Ausbildung eines mutanten Phänotyps verhindern könnte. Bei der Analyse von Embryonen, in denen mittels *graf*-spezifischer RNAi die Gesamtmenge von Graf reduziert wurde, konnte kein Fusionsdefekt beobachtet werden (Masterarbeit J. Hamp, 2012). Es konnten lediglich vereinzelte zu weit auf die Mittellinie zu wachsende ventrale Muskeln gezeigt werden. Durch eine Kreuzung der RNAi-Linie mit *UAS-Dcr2;;Mef2-Gal4* erfolgte eine Expression des RNAi-Konstrukts im gesamten Mesoderm und wurde sowohl bei 25 °C als auch bei 30 °C durchgeführt (Masterarbeit J. Hamp, 2012). Da *graf* auch eine maternale Komponente besitzt (Masterarbeit J. Hamp, 2012), kann jedoch nicht sichergestellt werden, dass eine Reduktion der Proteinmenge mittels RNAi-Expression zu einem vollständigen Verlust von Graf führt. Es könnte noch genug Protein vorhanden sein, um eine erfolgreiche Fusion der Myoblasten zu gewährleisten. Um auch die maternale sowie die zygotische Komponente von *graf* auszuschließen, müssten Keimbahnklone generiert werden.

Die Verwendung von *graf* Mutanten zur Herstellung einer Doppelmutante würde ein verlässlicheres Ergebnis liefern. Diese Mutante müsste dafür jedoch erst generiert werden. Eine Möglichkeit dafür wäre die Durchführung eines sogenannten „Jump Out“ (Bachmann und Knust, 2008). Hierzu wird eine Fliegenlinie verwendet, welche ein P-Element im Bereich oder in der Nähe des zu deletierenden Gens trägt. Dieses P-Element besitzt „inverted repeats“ an den Enden, welche den Angriffspunkt der Transposase bilden. Durch die Excision des P-Elementes mithilfe der Transposase können auch



angrenzende Fragmente der DNA aus dem Genom entfernt werden. Der Verlust des kompletten Zielgens oder eines Teilfragmentes kann dazu führen, dass kein funktionelles Protein mehr gebildet wird (Bachmann und Knust, 2008).

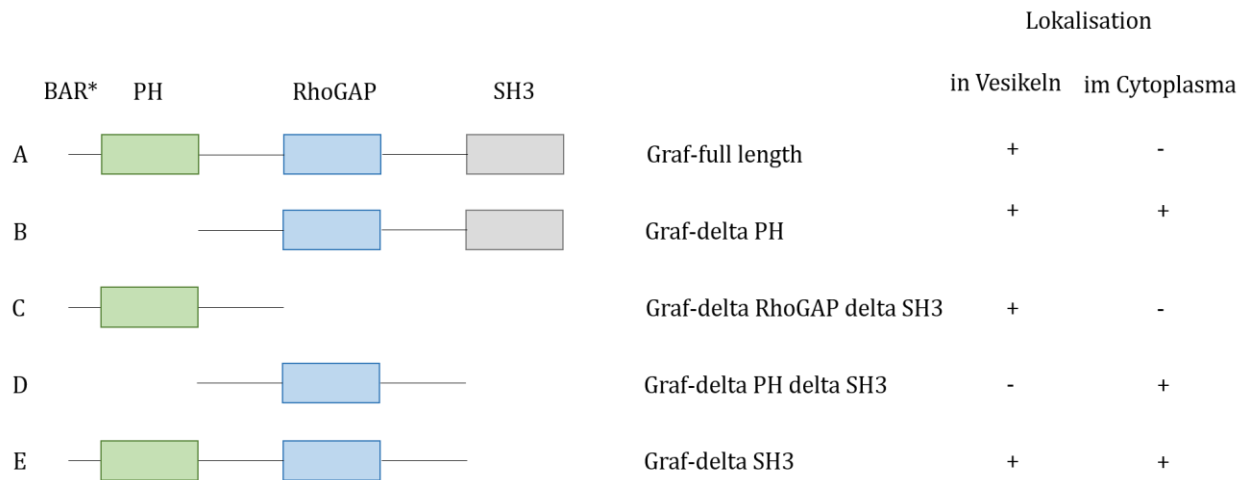
Eine weitere Methode, welche in den letzten Jahren entwickelt wurde und nun vermehrt zum Einsatz kommt, ist das sogenannte CRISPR/Cas9 System (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated) (Basset und Liu, 2014). Diese Methode ermöglicht ein gezieltes Ausschalten von Genen. Die Cas9 Endonuklease wird dabei durch eine komplementäre synthetische sogenannte „single guide RNA“ (sgRNA) zur Zielsequenz rekrutiert und schneidet diese spezifisch. Bei der Reparatur der dadurch entstehenden Doppelstrangbrüche kann es zur Insertion oder Deletion von kleinen oder auch größeren genomischen Regionen kommen (Basset und Liu, 2014).

Da aus Zeitgründen weder die Durchführung eines Jump Outs noch eine Mutation von Graf mittels CRISPR/Cas9 System noch möglich war, konnte bislang keine *graf;N-cadherin* Doppelmutante generiert und analysiert werden.

### **6.3.1.3 Die PH-Domäne von Graf scheint für die Lokalisation des Proteins benötigt zu werden, die SH3-Domäne interagiert mit N-Cadherin**

Die Ergebnisse aus früheren (Masterarbeit J. Hamp, 2012) sowie aus dieser Arbeit geben Hinweise auf die Funktionen der einzelnen Domänen von Graf. Diese Daten sollen nun mit denen aus Vertebraten verglichen werden. In Vertebraten vermitteln die BAR- und PH-Domänen von Graf<sup>1</sup> dessen Lokalisation an der Membran (Doherty und Lundmark, 2009). Für die Studien in *D. melanogaster* wurde die einzig verfügbare cDNA verwendet, welche jedoch nicht die gesamte BAR-Domäne umfasste. Analysen der Proteinsequenz zeigten, dass die ersten 158 Aminosäuren des gesamten offenen Leserahmens in der cDNA fehlten. Dadurch waren lediglich die letzten 84 Aminosäuren der BAR-Domäne enthalten. Die Ergebnisse der früheren Versuche (Masterarbeit J. Hamp, 2012) sind in Abbildung 6.2 zusammengefasst. Die Experimente zeigten, dass es durch den Verlust der PH- und SH3-Domänen sowie der PH-Domäne allein zu einer veränderten Lokalisation des Graf Fusionsproteins sowohl in S2 Zellen als auch in Embryonen von *D. melanogaster* kam. Statt in vesikulären Strukturen zu lokalisieren, war durch die Expression der RhoGAP-Domäne allein eine Lokalisation des Fusionsproteins im Cytoplasma zu erkennen (Masterarbeit J. Hamp, 2012). Auch in *D. melanogaster* scheint demnach die PH-Domäne für die korrekte Lokalisation des Proteins essentiell zu sein, eventuell zusammen mit der SH3-Domäne. Da die BAR-Domäne in keinem der Konstrukte komplett enthalten war, kann zu der Rolle dieser Domäne keine eindeutige Aussage gemacht werden. Eventuell reichen die enthaltenen 84 Aminosäuren aus, um die Funktion zu gewährleisten. Durch die

Generierung eines Konstruktes, welches mit der PH-Domäne beginnt, könnte diese Möglichkeit ausgeschlossen werden. Zudem sollte jedoch auch ein Konstrukt generiert werden, welches die BAR-Domäne vollständig umfasst.



**Abb. 6.2: Verkürzte Proteinvarianten von Graf zeigten eine veränderte Lokalisation bei Expression in S2 Zellen.** Graf-full length zeigte in S2 Zellen eine Lokalisation in vesikulären Strukturen (A). Das Graf-delta PH Fusionsprotein lokalisierte sowohl in Vesikeln als auch im Cytoplasma (B). Auch Graf-delta RhoGAP delta SH3 wurden in Vesikel-artigen Strukturen detektiert (C). Eine Deletion der PH- und der SH3-Domäne führte zu einem Verlust der Lokalisation in Vesikeln (D). Bei einem Verlust der SH3-Domäne konnte das Fusionsprotein wieder sowohl im Cytoplasma als auch in vesikulären Strukturen nachgewiesen werden (E). Bei den mit BAR\* gekennzeichneten Konstrukten sind noch die letzten 84 Aminosäuren der BAR-Domäne enthalten.

Doherty und Lundmark (2009) postulierten, dass eine verkürzte Proteinvariante, in welcher nur die BAR- und die PH-Domäne enthalten war, in Vertebraten eine dominant-negative Wirkung zu haben schien. Die in der wildtypischen Situation beobachteten dynamischen tubulären Strukturen waren bei einer Expression der verkürzten Proteinvariante eher statisch. Zudem kam es zu einer Inhibition der Aufnahme von GPI-gekoppelten Proteinen (Doherty und Lundmark, 2009). Bei der Expression einer verkürzten Proteinvariante von Graf, bei welcher die RhoGAP- und die SH3-Domäne deletiert wurde, war in *D. melanogaster* weiterhin eine Lokalisation des Fusionsproteins in vesikulären Strukturen zu beobachten (Masterarbeit J. Hamp, 2012). Mittels Live-Imaging Studien an S2 Zellen könnte überprüft werden, ob diese, wie in Vertebraten beschrieben, eher statisch sind.

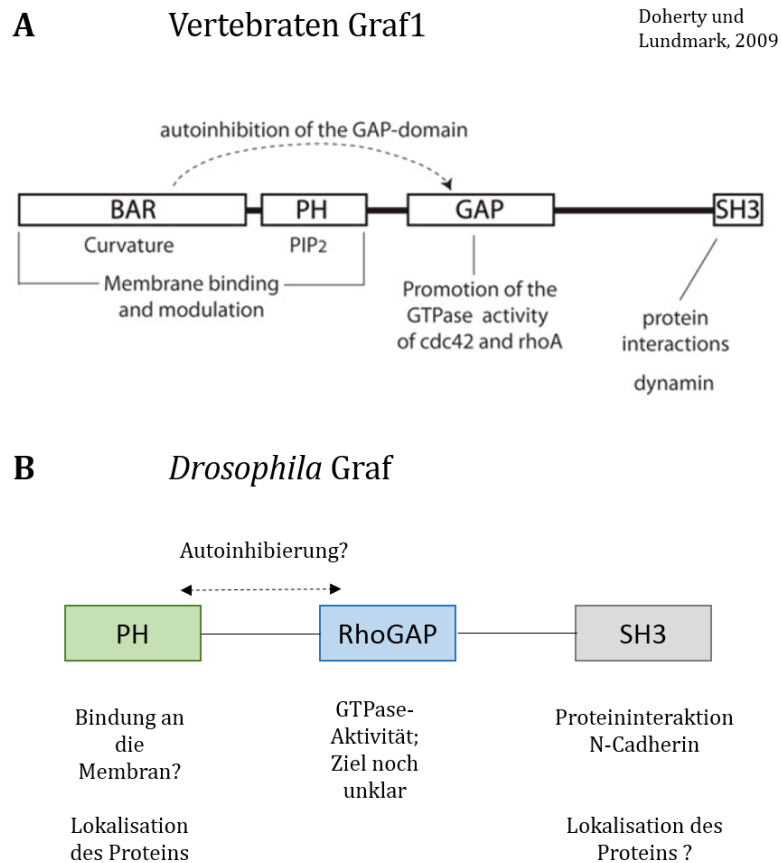
In Vertebraten wurde auch eine Autoinhibierung von Graf1, vermittelt durch die BAR- und PH-Domänen, beschrieben (Eberth et al., 2009). Erste Tests auf eine intramolekulare Interaktion im Hefe 2-Hybridsystem waren nicht eindeutig. Wachstum und eine sehr leichte Blaufärbung der

Kolonien war in zwei unabhängigen Versuchen zu erkennen, bei einem dritten Versuch nicht mehr (Daten nicht gezeigt). Eine intramolekulare Interaktion und damit auch eine mögliche Autoinhibierung von Graf kann demnach weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Aufgrund der nicht eindeutigen Ergebnisse aus dem Hefe 2-Hybridsystem scheint eine autoinhibierende Wirkung zwischen der PH- und RhoGAP-Domäne weiterhin denkbar zu sein. Diese sollte jedoch noch bestätigt werden. Ferner sollten die daran beteiligten Domänen identifiziert werden.

Die Funktionen der einzelnen Domänen von Graf1 in Vertebraten (Abb. 6.3 A, entnommen aus Doherty und Lundmark, 2009) im Vergleich zu Graf in *D. melanogaster* (Abb. 6.3 B) sind nachfolgend zusammengefasst. In Vertebraten sind sowohl die BAR- als auch die PH-Domäne an der Bindung des Proteins an die Membran beteiligt. Die BAR-Domäne ist dabei vermutlich für die Krümmung der Membran verantwortlich. Die GAP-Domäne vermittelt die GTPase Aktivität von Cdc42 und RhoA und die SH3-Domäne ist für die Interaktion mit Dynaminen essentiell. Zudem kann eine Bindung der BAR-Domäne an die GAP-Domäne zu einer Autoinhibierung führen (Abb. 6.3 A, Doherty und Lundmark, 2009). Die Lokalisation des Proteins in *D. melanogaster* und dementsprechend die Bindung an die Membran werden vermutlich durch die PH-Domäne vermittelt. Eine Beteiligung der SH3-Domäne an diesem Prozess kann nicht ausgeschlossen werden. Die RhoGAP-Domäne vermittelt höchstwahrscheinlich wie in Vertebraten die GTPase Aktivität eines Zielproteins. Allerdings konnte bisher nicht gezeigt werden, ob es sich dabei auch um Cdc42 oder RhoA handeln könnte. In Vertebraten konnte gezeigt werden, dass während der Bildung von N-Cadherin-vermittelten Adherens Junctions Rho-GTPasen aktiviert werden (El Sayegh et al., 2005). Untersuchungen in C2C12 Zellen weisen darauf hin, dass die Aktivität von RhoA durch Graf1 reguliert wird (Doherty et al., 2011). Während der Myoblastenfusion scheint Graf1 zwei Funktionen zu übernehmen. Die GAP-Domäne wird dabei sowohl für die Differenzierung als auch für die Fusion benötigt, die BAR-Domäne ist hingegen nur für die Fusion essentiell (Doherty et al., 2011). Überdies wurde eine Funktion von Graf1 auch bei der Entwicklung von *Xenopus laevis* beschrieben. Eine Depletion führt zu einer Degeneration von Muskelfasern und Somiten (Doherty et al., 2011). Das *D. melanogaster* Ortholog von RhoA ist Rho1 (Flybase). Während der Myoblastenfusion wurde beschrieben, dass Rho1 zusammen mit der Rho Kinase (Rok) die Aktivierung von MyoII fördert, für die Aktivierung jedoch nicht essentiell ist (Kim et al., 2015-a). Im Rahmen dieser Arbeit wurde nicht untersucht, ob Graf auch in *D. melanogaster* Rho1 aktivieren kann. Durch Interaktionstests mithilfe des Hefe 2-Hybridsystems könnte in weiteren Experimenten zumindest gezeigt werden, ob die beiden Proteine direkt interagieren.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zudem eine Interaktion zwischen Graf und N-Cadherin gezeigt werden, für welche die SH3-Domäne von Graf essentiell ist (siehe 5.2.2.4). Die für die Klonierung der

Konstrukte verwendete cDNA umfasste nicht die N-terminale BAR-Domäne, weshalb über die Funktion dieser Domäne in *D. melanogaster* bislang keine Aussage gemacht werden kann.



**Abb. 6.3: Vergleich der Funktionen der Domänen von Graf1 und Graf.** In Vertebraten vermittelt die BAR-Domäne von Graf1 zusammen mit der PH-Domäne die Bindung an die Membran. Zudem ist die BAR-Domäne an der Krümmung der Membran beteiligt und kann die Aktivität des Proteins mittels Bindung an die GAP-Domäne inhibieren. Die GAP-Domäne fördert die GTPase-Aktivität von Cdc42 und RhoA. Für die SH3-Domäne konnte eine Interaktion mit Dynaminen gezeigt werden (A, entnommen aus Doherty und Lundmark, 2009). Das *D. melanogaster* Graf ist in (B) gezeigt. Die korrekte Lokalisation des Proteins sowie die Bindung an die Membran sind abhängig von der PH- und eventuell auch der SH3-Domäne. Außerdem könnte die PH-Domäne eine Autoinhibierung vermitteln. Mögliche Zielproteine der RhoGAP-Domäne konnten bislang nicht identifiziert werden. Die SH3-Domäne hingegen interagiert mit der intrazellulären Domäne von N-Cadherin. Da die verwendete cDNA die BAR-Domäne nicht beinhaltete, bleibt die Funktion der Domäne noch unklar.

#### **6.3.1.4 Eine direkte Interaktion zwischen Cdc42 und Graf konnte mittels Hefe 2-Hybridsystem nicht gezeigt werden**

Abgesehen von einer Aktivierung der RhoA Kinase ist auch eine Aktivierung von Cdc42 durch Graf1 beschrieben worden (Cai et al., 2014). In Vertebraten ist Cdc42 auch in die Graf1-abhängige Endocytose involviert (Doherty und Lundmark, 2009). Im Hefe 2-Hybrid System konnte keine Interaktion zwischen Cdc42 und Graf detektiert werden. Da auch in weiteren Interaktionstests zwischen Cdc42 und anderen an der Myoblastenfusion beteiligten Proteinen nie eine Interaktion beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt), besteht die Möglichkeit, dass Cdc42 in Hefe nicht exprimiert oder falsch gefaltet wird. Dadurch könnten Interaktionen im Hefe 2-Hybridsystem nicht nachgewiesen werden. Durch die Herstellung von Proteinextrakten aus transformierter Hefe und anschließendem Western Blot könnte die Expression mittels Nachweis des Vektor-spezifischen Anhangs gezeigt werden.

Neueste Studien in HeLa Zellen zeigten, dass Graf1 während der Endocytose direkt mit Cdc42 interagiert (Francis et al., 2015). Zwischen den beiden Proteinen konnte zunächst eine Co-Lokalisation im Bereich der Zellmembran detektiert werden. Auch tubuläre Strukturen, welche teilweise mit der Membran verbunden waren, wurden beobachtet. Es handelte es sich dabei nur in sehr wenigen Fällen um Clathrin-umhüllte Vesikel, welche äußerlich sogenannten CLICs entsprachen (Francis et al., 2015). Weiterhin zeigte eine dominant wirkende konstitutiv-aktivierte Form von Cdc42 (Cdc42-Q61L) eine erhöhte Affinität zu Graf1, bei der die transiente Interaktion scheinbar von längerer Dauer war. Graf1 wird wahrscheinlich von Cdc42 an die Membran rekrutiert und vermittelt dort dessen Inaktivierung. Jedoch scheint Cdc42 nicht essentiell für die Lokalisation von Graf1 an der Membran zu sein, da diese durch eine Depletion von Cdc42 nicht gestört war. Es schien dabei allerdings vermehrt zur Bildung tubulärer Strukturen zu kommen (Francis et al., 2015).

Abgesehen von einer direkten Interaktion zwischen Graf und Cdc42 könnten die beiden Proteine auch zusammen mit anderen Proteinen in einem Komplex wirken, ohne direkt zu interagieren. Ein mögliches Vorkommen von Graf und Cdc42 in einem Komplex könnte mittels Co-Immunopräzipitationsstudien mit Proteinextrakten entweder aus transfizierten S2 Zellen oder aus Embryonen untersucht werden. Falls ein Zusammenwirken mithilfe dieser Methode gezeigt werden könnte, müsste jedoch noch nachgewiesen werden, dass diese auch im Zusammenhang mit der Internalisierung von N-Cadherin steht. Durch weitere Co-Immunopräzipitationsstudien könnte gezeigt werden, ob Schizo und N-Cadherin zusammen mit Cdc42 oder Graf in einem Komplex vorliegen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden bereits erste Western Blot Analysen zum Nachweis von Myc-, HA-, V5-, Flag- oder GFP-Anhängen des jeweiligen Schizo-Fusionsproteins in Proteinextrakten der transfizierten S2 Zellen durchgeführt. Gleichzeitig wurde versucht sowohl

N-Cadherin als auch Cdc42 mithilfe spezifischer Antikörper nachzuweisen. Ein Nachweis der Proteine mittels Western Blot blieb jedoch in allen Fällen erfolglos. Ein geeignetes Protokoll konnte aus Zeitgründen nicht mehr etabliert werden.

Zu bedenken ist allerdings, dass durch Co-Immunopräzipitationsstudien lediglich analysiert werden kann, ob die untersuchten Proteine in einem Komplex vorliegen. Eine direkte Interaktion ist demnach zwar denkbar, müsste aber mithilfe eines direkten Interaktionstests gezeigt werden. Weiterhin kann sowohl im Hefesystem als auch in der Zellkultur nur gezeigt werden, dass eine Interaktion prinzipiell möglich ist. Eine Aussage darüber in welchem Gewebe diese stattfindet, kann jedoch nicht getroffen werden.

### **6.3.1.5 Aussagen über eine Co-Lokalisation zwischen Cdc42 und Graf, Schizo und N-Cadherin in S2 Zellen können nicht getroffen werden**

Mithilfe von Co-Lokalisationsstudien in *Drosophila* S2 Zellen sollten weitere Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von Cdc42 an der Endocytose von N-Cadherin gewonnen werden. Das im Rahmen dieser Arbeit generierte Cdc42-mCherry Fusionsprotein zeigte jedoch entgegen den Erwartungen in S2 Zellen eine cytoplasmatische Lokalisation. Möglicherweise verhindert der mCherry-Anhang eine korrekte Faltung des Proteins und verursacht dadurch eine fehlerhafte Lokalisation. Für Co-Lokalisationsstudien mit Graf, N-Cadherin und Schizo in S2 Zellen konnte das Konstrukt nicht verwendet werden. Auch ein Cdc42-spezifischer Antikörper war in S2 Zellen nicht funktionell. Mittels Co-Lokalisationsstudien in der Zellkultur konnten demnach keine Hinweise auf eine Beteiligung von Cdc42 an der Internalisierung von N-Cadherin gewonnen werden. Auch in Embryonen konnten keine Co-Lokalisationsstudien durchgeführt werden, da die für die Nachweise der beiden Proteine benötigten Antikörper beide aus Ratten gewonnen wurden und eine Unterscheidung zwischen Cdc42 und N-Cadherin deshalb nicht möglich ist. Um die Studien durchzuführen, müsste eine transgene Fliegenlinie generiert werden, welche *cdc42*-eGFP oder *cdc42*-Myc trägt. Durch einen GFP- oder Myc- Anhang könnte bei einer Expression im Mesoderm das Cdc42 Fusionsprotein gleichzeitig mit N-Cadherin mittels Antikörpernachweis detektiert werden. Eventuell kann mithilfe dieser Konstrukte auch die Lokalisation von Cdc42 in S2 Zellen analysiert werden.

In HeLa Zellen konnte gezeigt werden, dass ein Cdc42-Fusionsprotein mit N-terminalem mCherry-Anhang in vesikulären Strukturen zu lokalisieren schien (Francis et al., 2015). Überdies wurde sowohl für Graf1 als auch für Cdc42 eine Co-Lokalisation mit Dextran-positiven Vesikeln beschrieben. Dextran wird mittels Endocytose in die Zelle aufgenommen und anschließend weiter zu

frühen Endosomen transportiert, welche unter anderem durch die spezifische Lokalisation von Rab5 gekennzeichnet sind. Eine Fusion der Graf1-Dextran-positiven Vesikel mit Rab5-positiven Vesikeln konnte dabei jedoch nicht beobachtet werden (Francis et al., 2015). Studien in C2C12 Zellen hingegen zeigten eine partielle Co-Lokalisation zwischen Graf1 und Rab5 sowie dem GPI-verankerten Protein Thy-1, welches von Endosomen über den Golgi zurück zur Plasmamembran transportiert wird (Lenhart et al., 2014). Außerdem schienen Graf1 und Graf2 in C2C12 Zellen die als Fusogene wirkenden Ferline an die Membran zu rekrutieren. Die Förderung der Myoblastenfusion durch Graf1 wird daher höchstwahrscheinlich durch einen Vesikeltransport-abhängigen Weg vermittelt (Lenhart et al., 2014). Für die Schizo und N-Cadherin<sup>TMintra</sup> Fusionsproteine konnte in S2 Zellen keine Co-Lokalisation mit Dextran gezeigt werden. Zudem schien Schizo auch nicht mit Rab5 zu co-lokalisieren (Dissertation V. Groth, 2011; Dottermusch-Heidel et al., 2012). Auch für Graf konnte bislang keine Co-Lokalisation mit Rab5 in S2 Zellen beobachtet werden (Masterarbeit J. Hamp, 2012). Graf co-lokalisierte mit Schizo in vesikulären Strukturen in S2 Zellen (siehe 5.2.2.2) und beide Proteine könnten zusammen an die Membran transportiert werden, der anschließende Rücktransport von der Membran könnte jedoch unabhängig voneinander erfolgen. Mithilfe eines Dextran-Aufnahmeversuches könnte überprüft werden, ob auch in *D. melanogaster* eine Co-Lokalisation zwischen Graf und Dextran-positiven Vesikeln detektiert werden kann. Gleichzeitig könnte eine derartige Co-Lokalisation auf einen getrennten Transport von Graf und Schizo von der Zellmembran zurück ins Zellinnere hindeuten.

#### 6.3.1.6 Die Rettungsexperimente der *schizo*-Mutanten lieferten kein zuverlässiges Ergebnis

Graf und Cdc42 könnten zusammen mit Schizo die Internalisierung von N-Cadherin vermitteln. Um zu analysieren, ob durch die Expression von Graf oder aktiviertem Cdc42 im *schizo*-mutanten Hintergrund der Verlust von Schizo kompensiert werden kann, wurden Rettungsexperimente durchgeführt (siehe 5.3.3). Eine Abschwächung des *schizo*-mutanten Phänotyps würde dabei auf ein Zusammenwirken der Proteine in einem Signalweg hindeuten. Für die Experimente wurden *graf* sowie eine aktivierte Form von *cdc42*, beide unter UAS-Kontrolle, mithilfe von *sg24-Gal4* im *schizo*-mutanten Hintergrund exprimiert. Bei beiden Rettungen war eine leichte Abschwächung des Fusionsdefekts sichtbar. Jedoch zeigte auch die verwendete *sg24-Gal4;schizo<sup>C1-28</sup>* Treiberlinie nicht den in *schizo*-Mutanten beobachteten starken Fusionsdefekt sondern eher den abgeschwächten Phänotyp, der auch bei den Embryonen des Rettungsexperiments zu sehen war. Die Treiberlinie sollte daher nochmal mittels Allelietest auf ihre Richtigkeit überprüft werden, bevor das Experiment wiederholt wird. Da das für die Rettungsexperimente verwendete *graf*-Konstrukt jedoch nicht die

vollständige N-terminale BAR-Domäne umfasst, muss zusätzlich bedacht werden, dass eine nicht erfolgte Rettung möglicherweise auch auf das Fehlen dieser Domäne zurückzuführen ist.

Abgesehen von einer möglichen Beteiligung an der Internalisierung von N-Cadherin könnte Cdc42 auch eine Verbindung zwischen N-Cadherin und den Aktinnukleatoren herstellen und damit die im Verlauf der Endocytose benötigte Aktinpolymerisation vermitteln. In Vertebraten wurde bereits beschrieben, dass Cdc42 den Aktinnukleator WASp aktivieren kann (Harris und Tepass, 2010-a). Untersuchungen bei der Entwicklung der Borsten in *D. melanogaster* zeigten zwar, dass Cdc42 direkt mit WASp interagieren kann, diese Interaktion scheint jedoch für die Funktion von WASp nicht essentiell zu sein (Tal et al., 2002). Die bisherigen Ergebnisse geben jedoch keine Hinweise darauf, dass Cdc42 zusammen mit Graf und Schizo an der Endocytose beteiligt ist oder eine Verbindung zwischen N-Cadherin und dem Aktincytoskelett vermittelt.

#### **6.4 Analysen zur möglichen Verbindung von N-Cadherin mit dem Aktincytoskelett**

Während der Endocytoseprozesse wird bei der Abschnürung von Vesikeln Aktin benötigt (McMahon und Boucrot, 2011). Die Umgestaltung des Aktincytosketts erfolgt durch den Arp2/3 Komplex, welcher durch WASp, Wip sowie den Scar/Wave-Komplex aktiviert werden kann (Pollard et al., 2007; Kurisu und Takenawa, 2009; Campellone und Welch, 2010). Während der Fusion könnte das Transmembranprotein N-Cadherin entweder direkt die Aktinnukleatoren regulieren oder deren Regulation über weitere Proteine vermitteln.

##### **6.4.1 Eine Interaktion zwischen N-Cadherin und den Aktinregulatoren Kette, Abi und Dia konnte nicht nachgewiesen werden**

Zunächst wurde untersucht, ob eine direkte Interaktion zwischen Kette, dem Nap1 Homolog, oder Abi, beides Komponenten des Scar/Wave-Komplexes, und N-Cadherin in *D. melanogaster* nachzuweisen ist. Weiterhin wurde auf eine direkte Proteininteraktion zwischen N-Cadherin und dem Formin Dia getestet. Sowohl Kette als auch Abi und Dia zeigten im Hefe 2-Hybridsystem keine direkte Interaktion mit N-Cadherin (Daten nicht gezeigt). Die Funktionalität der für die Transformation der Hefe verwendeten *kette* und *abi* Konstrukte konnte bereits in früheren Interaktionstests gezeigt werden. Das lässt darauf schließen, dass Kette, Abi und N-Cadherin im verwendeten Hefestamm exprimiert werden. Eine Interaktion zwischen N-Cadherin und Kette sowie



N-Cadherin und Abi konnte im Hefesystem demnach ausgeschlossen werden. Lediglich für Dia müsste die prinzipielle Expression noch mittels Western Blot Analysen nachgewiesen werden. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob N-Cadherin mit weiteren Komponenten des Scar/Wave-Komplexes oder mit WASp oder Wip interagieren kann. Aufgrund fehlender Konstrukte für die Interaktionstests mittels Hefe 2-Hybridsystem war das bislang nicht möglich.

In Vertebraten konnte zwischen dem Protocadherin PCDH10/OL-PC und Nap1/Wave1 eine direkte Interaktion gezeigt werden, durch welche sowohl der Aufbau von Aktin als auch die Zellmigration reguliert werden kann (Nakao et al., 2008). Ferner werden die Scar/Wave-Komplex Komponenten Sra1, Nap1 und Abi wahrscheinlich für die E-Cadherin-vermittelte Adhäsion benötigt (Ryu et al., 2009). Darüber hinaus scheint auch ein Komplex aus Abi und Dia für die Bildung und Stabilität der E-Cadherin-vermittelten Adherens Junctions wichtig zu sein. Ein Verlust dieser Komponenten führte zu einer Inhibierung der Akkumulation von  $\beta$ -Catenin sowie E-Cadherin an den Zell-Zellkontakten (Ryu et al., 2009). Eine genetische Interaktion zwischen *kette* und *N-cadherin* konnte auch während der Myoblastenfusion von *D. melanogaster* beobachtet werden (Hamp et al., revised version). Eine direkte Interaktion zwischen Kette und N-Cadherin auf Proteinebene konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht gezeigt werden. Weiterhin deuten die Ergebnisse nicht auf eine direkte Verbindung zwischen N-Cadherin und den Aktinnukleatoren hin, sondern eher auf eine indirekte Regulation, welche über weitere Proteine vermittelt wird.

#### **6.4.2 Dock könnte eine Funktion als Adapterprotein zwischen N-Cadherin und den Aktinregulatoren übernehmen**

In *D. melanogaster* interagiert Dock sowohl mit Scar als auch mit Wip und WASp und kann auf diese Weise die Aktivität des Arp2/3-Komplexes indirekt regulieren (Kaipa et al., 2013). Zudem konnte sowohl in Embryonen als auch in *Drosophila* S2 Zellen eine Bindung von Dock an die IgSF-Proteine Sns, Hbs und Duf gezeigt werden (Kaipa et al., 2013). Um zu analysieren, ob Dock, ähnlich wie bei den IgSF-Proteinen, eine Verbindung zwischen N-Cadherin und dem Aktincytoskelett vermitteln kann, wurden zunächst Interaktionstests im Hefe 2-Hybridsystem durchgeführt. Diese lieferten jedoch bei mehrmaliger Wiederholung unterschiedliche Ergebnisse. Aussagen über eine Interaktion auf Proteinebene zwischen Dock und N-Cadherin konnten deshalb nicht getroffen werden. Um dennoch einen Hinweis auf eine mögliche Interaktion zu erlangen, wurden Interaktionsstudien auf genetischer Ebene im Embryo durchgeführt. Die Analyse der *N-cadherin<sup>M19</sup>,dock<sup>04723</sup>*-Doppelmutante zeigte verschiedene unterschiedlich stark ausgeprägte Defekte während der Myoblastenfusion (siehe 5.3.5.2, 5.3.5.3. sowie 5.3.5.4). Vereinzelt traten Defekte wie fehlende Dorsalmuskeln,

Anheftungsdefekte der lateralen Muskeln an die Epidermis und Wegfindungsstörungen der ventralen Muskeln auf. Zudem war in einer Linie ein unvollständiger Dorsalschluss zu beobachten. Die meisten dieser Defekte traten jedoch auch in einer der Ausgangslinien auf. So zeigte die *dock*<sup>04723</sup>-mutante Fliegenlinie einen verzögerten Dorsalschluss sowie zu weit aufeinander zu wachsende ventrale Muskeln. In der *N-cadherin*<sup>M19</sup>-Mutante hingegen waren teilweise Defekte bei der Anheftung der lateralen Muskeln sichtbar (S. Önel, persönliche Mitteilung) und vereinzelt waren auch fehlende dorsale Muskeln zu erkennen. In den *N-cadherin*<sup>M19</sup>,*dock*<sup>04723</sup>-Doppelmutanten schienen die Defekte bei der Ausbildung der dorsalen Muskeln jedoch verstärkt zu sein. Im Vergleich zu der Einzelmutante fehlten mehrere Muskeln in diesem Bereich. Eine Verstärkung des Defektes der *N-cadherin*<sup>M19</sup>-Einzelmutante in der Doppelmutante würde auf eine genetische Interaktion zwischen *N-cadherin* und *dock* und damit auf eine Verbindung zum Aktincytoskelett hindeuten. Die mögliche Interaktion sollte jedoch noch in einem weiteren System überprüft und bestätigt werden. Die Anheftungsdefekte, welche in den Doppelmutanten verstärkt zu sein schienen, lassen darauf schließen, dass Dock und N-Cadherin zusätzlich eine Rolle bei der Anheftung der Muskeln an die Epidermis spielen. Interessanterweise zeigten Lokalisationsstudien, dass das Fps85D Fusionsprotein an den Anheftungsstellen der Muskeln lokalisierte. Aufgrund dieser Beobachtung sollte analysiert werden, ob Fps85D möglicherweise mit Dock und N-Cadherin für die korrekte Anheftung der Muskeln verantwortlich ist. Dafür sollte zunächst überprüft werden, ob auch Dock eine ähnliche Lokalisation wie Fps85D an den Anheftungsstellen zeigt.

#### **6.4.3 Wird durch Schizo oder Graf eine indirekte Verbindung zwischen N-Cadherin und dem Aktincytoskelett hergestellt?**

Neben der direkten Verbindung zwischen N-Cadherin und Proteinen, welche die Umgestaltung des Aktincytoskeletts regulieren, ist auch eine indirekte Verbindung möglich. In Vertebraten wird die Verknüpfung über  $\alpha$ -Catenin vermittelt, welches durch den Cadherin-Catenin-Komplex rekrutiert wird (Yonemura, 2011). Sowohl  *$\alpha$ -catenin* als auch *armadillo*, das *Drosophila* Homolog von  *$\beta$ -catenin*, sind zunächst ubiquitär im Embryo exprimiert, in späteren Stadien vermehrt im zentralen Nervensystem sowie im visceralen Mesoderm. Weiterhin konnte bei einer Überexpression einer dominant-negativ wirkenden Variante von *armadillo* kein Fusionsdefekt beobachtet werden (Dissertation V. Groth, 2011). Diese Ergebnisse weisen zunächst nicht auf eine Rolle der Catenine hin. Aufgrund einer möglichen redundanten Wirkung zwischen den Cateninen kann eine Beteiligung jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die früheren Interaktionsstudien (Dottermusch-Heidel et al.,

2012) und die Ergebnissen dieser Arbeit deuten jedoch eher auf eine Verbindung durch die mit N-Cadherin interagierenden Proteine Schizo und Graf hin.

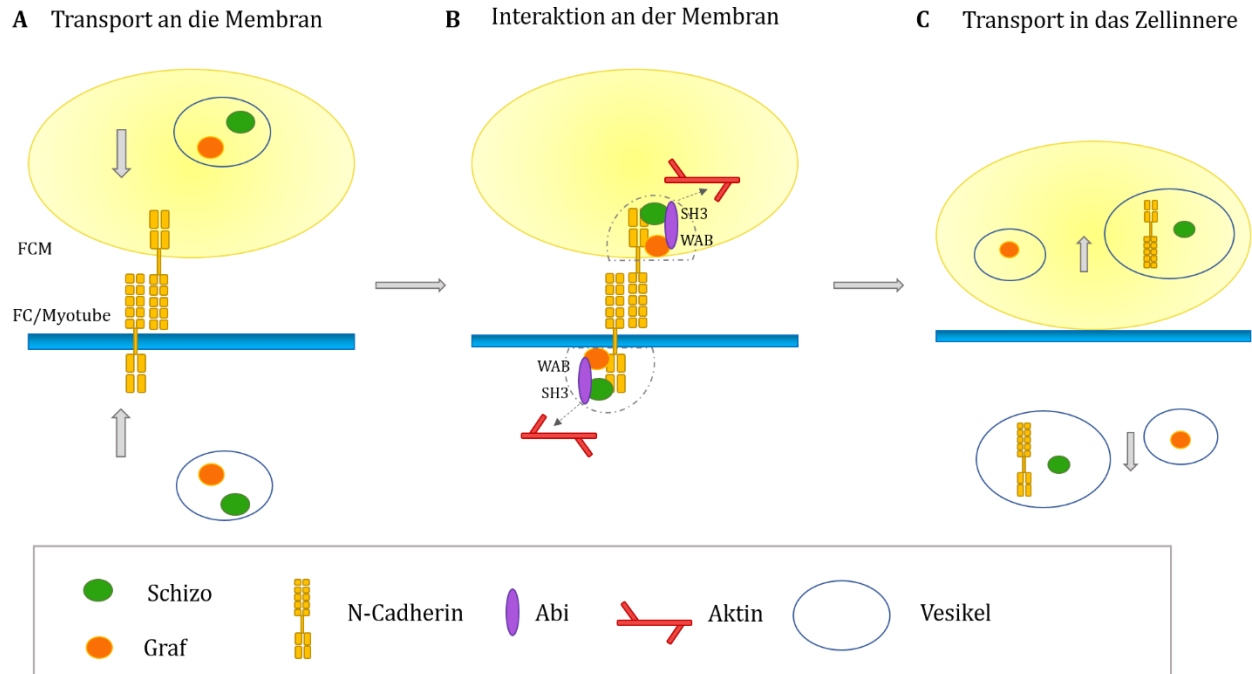
#### 6.4.3.1 Graf und Schizo interagieren mit Abi

Über WASp erfolgt sowohl in Vertebraten als auch in *D. melanogaster* die Aktivierung des Arp2/3 Komplexes (Pollard et al., 2007; Kurisu und Takenawa, 2009; Campellone und Welch, 2010; Sens et al., 2010). Eine Rekrutierung von WASp kann durch Proteine erfolgen, welche eine BAR- und eine SH3-Domäne enthalten (McMahon und Boucrot, 2011), was eine direkte Regulation ermöglicht. Zudem ist bekannt, dass WASp auch bei der Bildung von Clathrin-umhüllten Vesikeln/Pits (CCP) rekrutiert werden kann (Kurisu und Takenawa, 2009). Die Prolin-reiche Region von WASp kann SH3-Domänen von Proteinen binden, welche an der Krümmung der Membran beteiligt sind (Kurisu und Takenawa, 2009). Auch Graf1 besitzt eine SH3-Domäne und übernimmt eine Funktion bei der Krümmung der Membranen (Eberth et al., 2009; Doherty et al., 2011). Demnach wäre eine direkte Interaktion zwischen Graf und WASp, über welche eine Verbindung zum Aktincytoskelett hergestellt werden könnte, denkbar. Im Hefe 2-Hybrid System konnte jedoch keine Interaktion zwischen Graf und WASp auf Proteinebene beobachtet werden. Eine Verknüpfung mit dem Aktincytoskelett wird daher möglicherweise über eine indirekte Verbindung zwischen Graf und WASp oder eine Interaktion mit einem anderen Aktinnukleator vermittelt. Zwar konnte auch zwischen Graf und Kette sowie Graf und Dia keine Interaktion beobachtet werden, Graf interagierte jedoch mit der Scar/Wave-Komplex Komponente Abi, welches auch an WASp binden kann, im Hefe 2-Hybridsystem (siehe 5.3.4). Dabei ist wahrscheinlich die Wave-interagierende Domäne (WAB) von Abi essentiell. Unklar bleibt jedoch, warum die interagierende Domäne von Graf nicht identifiziert werden konnte. Die durchgeführten Interaktionstests mit dem Hefe 2-Hybridsystem lieferten trotz mehrfacher Wiederholung kein eindeutiges Ergebnis, weshalb sie zusätzlich in einem zweiten System getestet werden sollten. Möglicherweise kann dadurch auch die für die Interaktion verantwortliche Domäne von Graf identifiziert werden.

Mittels Hefe 2-Hybrid System konnte zudem eine Interaktion zwischen Schizo und Abi gezeigt werden (siehe 5.3.4). Weitere Tests mit verkürzten Proteinvarianten deuten darauf hin, dass die SH3-Domäne von Abi essentiell dafür ist. Ein *schizo*-Konstrukt, welches die ersten 2,3 Kilobasen von Schizo umfasst, interagiert im Hefesystem nicht mit Abi. Die interagierende Domäne von Schizo liegt also vermutlich im C-terminalen Bereich des Proteins und müsste mithilfe weiterer Tests identifiziert werden. Sowohl über die Interaktion zwischen Graf und Abi als auch über eine Bindung von Schizo an Abi

könnte ein Signal zur Regulation der Aktinnukleation weitergegeben werden, welches eventuell für die Abschnürung der Vesikel oder deren Transport in das Zellinnere benötigt wird.

Möglicherweise sorgt Graf in *D. melanogaster* durch die Interaktion mit N-Cadherin nur für die Initiierung von dessen Internalisierung und wird selbst durch einen alternativen Endocytoseweg von der Membran entfernt. Dafür würden auch die Co-Lokalisationsstudien in S2 Zellen sprechen, bei denen eine mögliche Co-Lokalisation zwischen den Graf- und N-Cadherin<sup>TM</sup>intra-Fusionsproteinen bisher nur im Bereich der Membran, aber nicht in vesikulären Strukturen im Cytoplasma der Zellen beobachtet werden konnte (siehe 5.2.2.3). Jedoch wurden sowohl zwischen Schizo und N-Cadherin (Dottermusch-Heidel et al., 2012) als auch zwischen Schizo und Graf Co-Lokalisationen in vesikulären Strukturen detektiert (siehe 5.2.2.2). Eine denkbare Erklärung dafür wäre zum Beispiel ein gemeinsamer anterograder Transport von Schizo und Graf an die Membran (Abb. 6.4 A), an der eine Interaktion der beiden Proteine mit N-Cadherin stattfindet (Abb. 6.4 B). An der Membran könnten sowohl Schizo als auch Graf mit Abi interagieren und dadurch eine Verbindung zum Aktincytoskelett herstellen (Abb. 6.4 B). N-Cadherin könnte danach internalisiert und zusammen mit Schizo transportiert werden, wohingegen Graf über einen anderen retrograden Endocytoseweg in das Zellinnere befördert werden könnte (Abb. 6.4 C). Co-Lokalisationsstudien in S2 Zellen könnten zeigen, ob Abi zusammen mit Graf oder Schizo und N-Cadherin transportiert wird. Dafür sollten S2 Zellen mit den jeweiligen Konstrukten transfiziert und auf eine Co-Lokalisation zwischen Abi und Graf, Abi und Schizo sowie Abi und N-Cadherin sowohl in fixierten Zellen als auch mittels Live-Imaging Studien hin analysiert werden.



**Abb. 6.4: Graf und Schizo interagieren möglicherweise mit N-Cadherin und Abi an der Membran.** Der anterograde Transport von Schizo und Graf an die Membran könnte zusammen erfolgen (A). An der Membran findet eine Interaktion zwischen N-Cadherin und Graf sowie Schizo statt. Möglicherweise interagieren beide Proteine direkt an der Membran auch mit Abi. Die Interaktion zu Schizo wird dabei durch die SH3-Domäne vermittelt, die zu Graf durch die WAB-Domäne (B). Vor dem Fusionsereignis wird N-Cadherin vermutlich internalisiert und zusammen mit Schizo von der Membran in das Zellinnere transportiert. Graf könnte über einen anderen retrograden Transportweg recycelt werden (C). Unklar bleibt, ob der Rücktransport von Abi zusammen mit Schizo und N-Cadherin oder mit Graf erfolgt.

### 6.5. Ist ein Dynamin-abhängiger Endocytoseweg involviert?

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass N-Cadherin über einen Graf-abhängigen Endocytoseweg internalisiert wird, für dessen Regulation Schizo essentiell ist. Unklar ist jedoch, ob Graf dabei lediglich für die Krümmung der Membran verantwortlich oder auch an der Abschnürung der Vesikel beteiligt ist. Deshalb wurde überprüft, ob auch Dynamine eine Rolle bei diesem Prozess spielen könnten. Die Funktion von Dynamin bei der Abschnürung von Vesikeln wurde bereits für verschiedene Endocytosemechanismen beschrieben (Praefcke und McMahon, 2004; Grant und Donaldson, 2009; Ferguson und De Camilli, 2012). Eine Interaktion zwischen Graf und Shibire, dem Dynamin Ortholog in *D. melanogaster* (Chen et al., 1991; van der Blik und Meyerowitz, 1991), konnte bislang noch nicht gezeigt werden.

### 6.5.1 Es gibt bisher keine Hinweise darauf, dass Shibire an der Endocytose von N-Cadherin beteiligt ist

In früheren Arbeiten wurden bereits erste Experimente durchgeführt, um eine Beteiligung von Shibire an der Internalisierung von N-Cadherin zu untersuchen. Erste Versuche, die Dynamin-abhängige Endocytose mittels Expression einer dominant-negativen Form des Dynamins Shibire zu inhibieren, führten zu einem Fusionsdefekt (Dottermusch-Heidel et al., 2012). Dieser war jedoch auf eine fehlerhafte Determination der Myoblasten zurückzuführen. Das dominant-negativ wirkende Shibire<sup>DN</sup> wurde mithilfe des *twist*-Gal4 Treibers exprimiert, durch welchen die Expression noch vor der Spezifikation der FCs und FCMs erfolgt (Dottermusch-Heidel et al., 2012). Shibire spielt auch eine Rolle bei der Spezifikation der FCs mittels Notch-vermittelter lateraler Inhibition (Seugnet et al., 1997). Untersuchungen zeigten, dass bei Expression von Shibire<sup>DN</sup> die Anzahl der FCs im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist, was auch der Grund für den beobachteten Fusionsdefekt zu sein scheint (Dottermusch-Heidel et al., 2012). Die Verwendung der FC-spezifischen Treiberlinie *rp298*-Gal4 sowie der FCM-spezifischen Treiberlinie *sns pro3*-Gal4 ermöglichte eine Expression von Shibire<sup>DN</sup> nach abgeschlossener Spezifikation der Myoblasten. Jedoch konnten bei der phänotypischen Auswertung der Embryonen keine Fusionsdefekte beobachtet werden (Dottermusch-Heidel et al., 2012), was möglicherweise auf eine Redundanz zwischen den Dynaminen hindeuten könnte. Für den Abbau von E-Cadherin an Adherens Junctions während der Wundheilung von *D. melanogaster* wurde bereits die Beteiligung eines Clathrin- und Dynamin-abhängigen Endocytoseweges beschrieben (Hunter et al., 2015). Wird die Dynamin-anhängige Endocytose mittels Behandlung mit Dynasore inhibiert, ist die Wundheilung im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich verzögert. Eine Überexpression von E-Cadherin führt zu einem ähnlichen Phänotyp. Für die Umgestaltung der Adherens Junctions an den Wundrändern ist demnach eine Dynamin-anhängige Endocytose von E-Cadherin essentiell (Hunter et al., 2015).

### 6.5.2 Drp1 könnte in *D. melanogaster* an der Abschnürung der Vesikel beteiligt sein

Die Abschnürung Clathrin-umhüllter Vesikel ist abhängig von Dynaminen (McMahon und Boucrot, 2011). Diese werden durch Proteine rekrutiert, welche eine BAR-Domäne enthalten und mit ihrer SH3 Domäne an die Prolin-reichen Regionen der Dynamine binden (De Camilli et al., 1995; McMahon und Boucrot, 2011; Meinecke et al., 2013). Mithilfe von Studien an einer humanen Zelllinie konnte gezeigt werden, dass Amphiphysin und Endophilin die Rekrutierung von Dynamin an die Membran und dadurch die GTP-abhängige Abschnürung von Vesikeln fördern können (Meinecke et al., 2013). Beide Proteine besitzen sowohl eine BAR- als auch eine SH3-Domäne, mithilfe derer die Bindungen

an die Membran und an Dynamin vermittelt werden. Zudem wirken beide Proteine wahrscheinlich in Redundanz zueinander (Meinecke et al., 2013). Die tatsächliche Funktion von BAR-Proteinen bei der Regulation von Dynaminen ist jedoch noch umstritten (Daumke et al., 2014). Abhängig von den Versuchsbedingungen wurde teilweise eine Reduktion der GTPase-Aktivität von Dynaminen postuliert, teilweise eine Erhöhung der Aktivität (Daumke et al., 2014). In Vertebraten enthält Graf1 sowohl eine BAR- als auch eine SH3-Domäne (Eberth et al., 2009; Doherty et al., 2011). Auch in *D. melanogaster* sind BAR- und SH3-Domäne bei Graf vorhergesagt. Weiterhin besitzt Fps85D eine FCH-Domäne, welche eine ähnliche Funktion übernehmen kann. Eine Interaktion zwischen Dynaminen und Graf sowie Dynaminen und Fps85D konnte während der Myoblastenfusion bislang jedoch noch nicht beobachtet werden. In der Ratte konnte hingegen mittels Co-Immunopräzipitation gezeigt werden, dass Dynamin1 zusammen mit Graf1 in einem Komplex vorliegt (Lundmark et al., 2008). Mithilfe weiterer Experimente wurde auch eine direkte Interaktion der beiden Proteine nachgewiesen. Die Bindung erfolgt dabei zwischen der SH3-Domäne von Graf1 und der Prolin-reichen Region des Dynamins (Lundmark et al., 2008). Dynamin könnte zusammen mit Graf1 für die Abschnürung sowie die Stabilität der während des Endocytoseprozesses beobachteten tubulären Strukturen verantwortlich sein. Innerhalb dieser tubulären Strukturen konnte jedoch kein Clathrin detektiert werden. Es scheint sich in diesem Fall also nicht um eine Clathrin-vermittelte Endocytose zu handeln (Lundmark et al., 2008). Im Gegensatz zu der in Vertebraten gezeigten tubulären Endocytose konnten in *D. melanogaster* bislang nur Graf-positive Vesikel beobachtet werden. Mithilfe weiterer mikroskopischer Untersuchungen könnte überprüft werden, ob es sich dabei tatsächlich um vesikuläre oder eventuell doch um tubuläre Strukturen handelt. Zudem könnten durch Interaktionstest Hinweise darauf gewonnen werden, ob Graf oder auch Fps85D in *D. melanogaster* mit Dynaminen interagieren können.

### **6.5.3 Eine Rolle des Dynamin-ähnlichen Proteins 1 (Drp1) bei der Endocytose von N-Cadherin während der Myoblastenfusion ist möglich**

Erste Studien in S2 Zellen zeigen, dass eine partielle Co-Lokalisation zwischen Drp1 und N-Cadherin sowie Drp1 und Schizo möglich ist (siehe 5.2.1). Bei der Endocytose von N-Cadherin könnte es sich demnach um einen Dynamin-abhängigen Weg handeln. Mittels Live-Imaging Studien sollte überprüft werden, ob es zu einer Co-Lokalisation von N-Cadherin und Drp1 in S2 Zellen kommt. Bei einer Beteiligung der Dynamine sollte eine partielle Co-Lokalisation entweder in vesikulären Strukturen innerhalb der Zellen oder an der Plasmamembran zu erkennen sein.

Um ein Zusammenwirken von Drp1 oder Shibire zusammen mit Graf in einem Endocytoseprozess zu analysieren, sollten sowohl weitere Co-Lokalisationsstudien in S2 Zellen als auch Interaktionsstudien auf Proteinebene zwischen den beiden Dynaminen und Graf durchgeführt werden. Diese Studien geben jedoch nur Hinweise darauf, ob zwei Proteine prinzipiell in einem Gewebe miteinander interagieren können. Deshalb sollte bei einem positiven Ergebnis zusätzlich auf eine genetische Interaktion im Embryo und speziell im somatischen Mesoderm getestet werden. Dabei muss jedoch im Fall von Shibire beachtet werden, dass das Protein auch für die Determination der Myoblasten essentiell ist. Eine Inhibierung der Dynamamin-abhängigen Endocytose, zum Beispiel durch die Expression von dominant-negativ wirkendem Shibire, sollte deshalb erst zu einem späteren Zeitpunkt der Embryonalentwicklung erfolgen.

## 6.6 Einordnung der Ergebnisse

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die durch Schizo regulierte Internalisierung von N-Cadherin während der Myoblastenfusion in *D. melanogaster* über einen Graf-abhängigen Endocytosemechanismus erfolgt. Eine Beteiligung der Dynamine kann dabei bislang nicht ausgeschlossen werden. Sowohl Schizo als auch Graf interagieren mit dem Scar/WAVE Komplex Protein Abi und vermitteln dadurch möglicherweise die Aktivierung der für die Aktinpolymerisation benötigten Aktinnukleatoren. Demnach scheint der Arp2/3 Komplex über Abi und den Scar/WAVE Komplex aktiviert zu werden. Hinweise auf eine Regulation über Cdc42, welches WASp und dadurch den Arp2/3 Komplex aktivieren könnte, wurden nicht gewonnen.

Studien im Embryo weisen auf eine genetische Interaktion zwischen Dock und N-Cadherin hin. Die beiden Proteine wirken möglicherweise zusammen bei der Anheftung der Muskeln an die Epidermis. Ein weiteres Protein, welches bei diesem Prozess eine Rolle spielen könnte, ist Fps85D. Zudem könnte Fps85D auch für eine Stabilisierung oder Destabilisierung von N-Cadherin an den Membranen der Myoblasten sorgen. Um weitere Aussagen zu einer Funktion dieses Proteins zu treffen, müssten jedoch noch weitere Experimente durchgeführt werden.



## 7. Literaturverzeichnis

**Aberle, H., Schwartz, H. und Kemler, R. (1996).** Cadherin-Catenin Complex: Protein Interactions and Their Implications for Cadherin Function. *Journal of Cellular Biochemistry* 61:514-523.

**Abmayr, S.M. und Pavlath, G.K. (2012).** Myoblast fusion: lessons from flies and mice. *Development* 139, 641-656.

**Adam, A.P. (2015).** Regulation of Endothelial Adherens Junctions by Tyrosine Phosphorylation. *Mediators of Inflammation* Volume 2015 Article ID 272858.

**Aguilar, P.S., Baylies, M.K., Fleissner, A., Helming, L., Inoue, N., Podbilewicz, B., Wang, H. und Wong, M. (2013).** Genetic basis of cell-cell fusion mechanisms. *Trends Genet.* 29(7): 427-437.

**Artero, R.D., Castanon, I. und Baylies, M.K. (2001).** The immunoglobulin-like protein Hibris functions as a dose-dependent regulator of myoblast fusion and is differentially controlled by Ras and Notch signaling. *Development* 128, 4251-4264.

**Bachmann, A. und Knust, E. (2008).** The Use of P-Element Transposons to Generate Transgenic Flies. *Methods Mol Biol.* 420:61-77.

**Barrett, K., Leptin, M. und Settleman, J. (1997).** The Rho GTPase and a Putative RhoGEF Mediate a Signaling Pathway for the Cell Shape Changes in *D. melanogaster* Gastrulation. *Cell*, Vol. 91, 905-915.

**Bassett und Liu, (2014).** CRISPR/Cas9 and Genome Editing in *D. melanogaster*. *Journal of Genetics and Genomics* 41, 7-19.

**Bate, M. (1990).** The embryonic development of larval muscles in *D. melanogaster*. *Development* 110, 791-804.

**Baylies, M.K. und Bate (1996).** *twist*: a myogenic switch in *Drosophila*. *Science* 272(5267): 1481-4.

**Bischof, J., Maeda, R.K., Hediger, M., Karch, F. und Basler, K. (2007).** An optimized transgenesis system for *D. melanogaster* using germ-line-specific  $\Phi$ C31 integrases. *PNAS* vol. 104, no.9, 3312-3317.

**Bogdan, S. und Klämbt, C. (2003).** Kette regulates actin dynamics and genetically interacts with Wave and Wasp. *Development* 130, 4427-4437.

**Bogdan, S., Stephan, R., Löbke, C., Mertens, A. und Klämbt, C. (2005).** Abi activates WASP to promote sensory organ development. *Nature Cell Biology* 7, 977-984.

**Bogdan, S., Schultz, J. und Grosshans, J. (2013).** Formin' cellular structures: Physiological roles of Diaphanous (Dia) in actin dynamics. *Communicative & Integrative Biology* 6:e27634.

**Bour, B.A., Chakravarti, M., West, J.M. und Abmayr, S.M. (2000).** *D. melanogaster* SNS, a member of the immunoglobulin superfamily that is essential for myoblast fusion. *GENES & DEVELOPMENT* 14:1498-1511.

**Brand, A., H. und Perrimon, N. (1993).** Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.

**Brasch, J., Harrison, O.J., Honig, B. und Shapiro, L. (2012).** Thinking outside the cell: how cadherins drive adhesion. *Trends in Cell Biology*, Vol. 22, No. 6, 299-310.

**Braukmann, C. (2012).** Die Rolle der *D. melanogaster* Fes/Fer non-Rezeptor-Tyrosin-Kinase bei der Regulation der Zelladhäsion während der Myoblastenfusion.

**Buttgereit, D., Paululat, A. und Renkawitz-Pohl, R. (1996).** Muscle development and attachment to the epidermis is accompanied by expression of  $\beta 3$  and  $\beta 1$  tubulin isotypes, respectively. *Int. J. Dev. Biol.* 40: 189-196.

**Cai, B., Xie, S., Caplan, S. und Naslavsky, N. (2014).** GRAF1 forms a complex with MICAL-L1 and EHD1 to cooperate in tubular recycling endosome vesiculation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* Volume 2, Article 22, 1-14.

**Campellone, K.G. und Welch, M.D. (2010).** A Nucleator Arms Race: Cellular Control of Actin Assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11(4): 237-251.

**Carmena, A., Bate, M. und Jiménez, F. (1995).** *lethal of scute*, a proneural gene, participates in the specification of muscle progenitors during *D. melanogaster* embryogenesis. *GENES & DEVELOPMENT* 9:2372-2383.

**Chen, M.S., Obar, R.A., Schroeder, C.C., Austin, T.W., Poodry, C.A., Wadsworth, S.C. und Vallee, R.B. (1991).** Multiple forms of dynamin are encoded by *shibire*, a *D. melanogaster* gene involved in endocytosis. *Nature* Vol 35,1 583-586.

**Chen, E.H., Pryce, B.A., Tzeng, J.A., Gonzalez, G.A. und Olson, E.N. (2003).** Control of Myoblast Fusion by a Guanine Nucleotide Exchange Factor, Loner, and Its Effector ARF6. *Cell*, Vol. 114, 751-762.

**Chen, E.H. und Olson, E.N. (2001).** Antisocial, an Intracellular Adaptor Protein, Is Required for Myoblast Fusion in *Drosophila*. *Developmental Cell*, Vol. 1, 705-715.

**Chen, E.H. und Olson, E.N. (2004).** Towards a molecular pathway for myoblast fusion in *D. melanogaster*. *TRENDS in Cell Biology* Vol. 14 No. 8, 452-460.

**Chi, X., Wang, S., Huang, Y., Stamnes, M. und Chen, J.L. (2013).** Roles of Rho GTPases in Intracellular Transport and Cellular Transformation. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 7089-7108.

**Daumke, O., Roux, A. und Haucke, V. (2014).** BAR Domain Scaffolds in Dynamin-Mediated Membrane Fission. *Cell* 156, 882-892.

**Deng, S., Bothe, I. und Baylies, M.K. (2015).** The Formin Diaphanous Regulates Myoblast Fusion through Actin Polymerization and Arp2/3 Regulation. *PLoS Genet* 11(8): e1005381.

**Dhanyasi, N., Segal, D., Shimoni, E., Shinder, V., Shilo, B.Z., VijayRaghavan, K. und Schejter, E.D. (2015).** Surface apposition and multiple cell contacts promote myoblast fusion in *D. melanogaster* flight muscles. *J. Cell Biol.* Vol. 211 No. 1, 191-203.

**Diehl, C. (2014).** Die Rolle des *Drosophila* PTP1B-Homologs PTP61F in der Myoblastenfusion.

**Doberstein, S.K., Fetter, R.D., Mehta, A.Y. und Goodman, C.S. (1997).** Genetic Analysis of Myoblast Fusion: *blown fuse* Is Required for Progression Beyond the Prefusion Complex. *The Journal of Cell Biology*, Volume 136, Number 6, 1249-1261.

**Doherty, G.J. und Lundmark, R. (2009).** Graf1-dependent endocytosis. *The Dynamic Cell. Biochem. Soc. Trans.* 37, 1061-1065.

**Doherty, G.J. und McMahon, H.T. (2009).** Mechanisms of Endocytosis. *The Annual Review of Biochemistry* 78:857-902.

**Doherty, J.T., Lenhart, K.C., Cameron, M.V., Mack, C.P., Conlon, F.L. und Taylor, J.M. (2011).** Skeletal Muscle Differentiation and Fusion Are Regulated by the BAR-containing Rho-GTPase-activating Protein (Rho-GAP), GRAF1. *J. Biol. Chem.* VOL, NO. 29, pp. 25903-25921.

**Dottermusch, C. (2010).** Der Arf-GEF Schizo fördert die Fusion der Myoblasten über die Aktivierung der D-Arf1-GTPase während der frühen Myogenese von *D. melanogaster*, während der Arf-GAP D-Git in Kooperation mit D-Arf6 die Wegfindung der Muskeln in der späten Myogenese beeinflusst.

**Dottermusch-Heidel, C., Groth, V., Beck, L. und Önel, S.F. (2012).** The Arf-GEF Schizo/Loner regulates N-cadherin to induce fusion competence of *D. melanogaster* myoblasts. *Developmental Biology* 368, 18-27.

**Duan, H., Skeath, J.B. und Nguyen, H.T. (2001).** *D. melanogaster* Lame duck, a novel member of the Gli superfamily, acts as a key regulator of myogenesis by controlling fusion-competent myoblast development. *Development* 128, 4489-4500.

**Dufour, S., Mège, R.M. und Thiery, J.P. (2013).**  $\alpha$ -catenin, vinculin, and F-actin in strengthening E-cadherin cell-cell adhesions and mechanosensing. *Cell Adhesion & Migration* 7:4, 345-350.

**Dumont, N.A., Wang, Y.X. und Rudnicki, M.A. (2015).** Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell fusion. *Development* 142, 1572-1581.

**Dworak, H.A., Charles, M.A., Pellerano, L.B. und Sink, H. (2001).** Characterization of *D. melanogaster hibris*, a gene related to human nephrin. *Development* 128, 4265-4276.

**Eberth, A., Lundmark, R., Gremer, L., Dvorsky, R., Koessmeier, K.T., McMahon, H.T. und Ahmadian, M.R. (2009).** A BAR domain-mediated autoinhibitory mechanism for RhoGAPs of the GRAF family. *Biochem. J.* 417, 371-377.

**El Sayegh, T.Y., Arora, P.D., Fan, L., Laschinger, C.A., Greer, P.A., McCulloch, C.A. und Kapus, A. (2005).** Phosphorylation of N-Cadherin-associated Cortactin by Fer Kinase Regulates N-Cadherin Mobility and Intercellular Adhesion Strength. *Molecular Biology of the Cell* Vol. 16, 5514-5527.

**El-Sayed, A. und Harashima, H. (2013).** Endocytosis of Gene Delivery Vectors: From Clathrin-dependent to Lipid Raft-mediated Endocytosis. *Molecular Therapy* vol. 21 no. 6, 1118-1130.

**Estrada, B., Choe, S.E., Gisselbrecht, S.S., Michaud, S., Raj, L., Busser, B.W., Halfon, M.S., Church, G.M. und Michelson, A.M. (2006).** An Integrated Strategy for Analyzing the Unique Developmental Programs of Different Myoblast Subtypes. *PLoS Genet* 2(2): e16.

**Ferguson, S.M. und De Camilli, P. (2012).** Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Volume 13, 75-88.

**Fields, S. und Song, O. (1989).** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* Vol. 340, 245-246.

**Fiúza, U.M. und Arias, A.M. (2007).** Cell and molecular biology of Notch. *Journal of Endocrinology* 194, 459-474.

**Francis, M.K., Holst, M.R., Vidal-Quadras, M., Henriksson, S., Santarella-Mellwig, R., Sandblad, L. und Lundmark, R. (2015).** Endocytic membrane turnover at the leading edge is driven by a transient interaction between Cdc42 and GRAF1. *Journal of Cell Science* 128, 4183-4195.

**Galletta, B.J., Chakravarti, M., Banerjee, R. und Abmayr, S.M. (2004).** SNS: adhesive properties, localization requirements and ectodomain dependence in S2 cells and embryonic myoblasts. *Mechanisms of Development* 121, 1455-1468.

**Gerbaud, P. und Pidoux, G. (2015).** Review: An overview of molecular events occurring in human trophoblast fusion. *Placenta* 36, Supplement 1, Trophoblast Research, Vol. 29, S35-S42.

**Gildor, B., Massarwa, R., Shilo, B.Z. und Schejter, E. (2009).** The SCAR and WASp nucleation-promoting factors act sequentially to mediate *D. melanogaster* myoblast fusion. *EMBO reports* 10, 1043-1050.

**Goldenberg, G. und Harris, T.J.C. (2013).** Adherens Junction Distribution Mechanisms during Cell-Cell Contact Elongation in *Drosophila*. *PLoS ONE* 8(11): e79613.

**Goley, E.D. und Welch, M.D. (2006).** The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nature Reviews*, Volume 7, 713-726.

**Grant, B.D. und Donaldson, J.G. (2009).** Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Volume 10, 597-608.

**Greer, P., Haigh, J., Mbamalu, G., Khoo, W., Bernstein, A. und Pawson, T. (1994).** The Fps/Fes Protein-Tyrosin Kinase Promotes Angiogenesis in Transgenic Mice. *Molecular and Cellular Biology* Vol. 14, No. 10, p. 6755-6763.

**Greer, P. (2002).** Closing in on the Biological Functions of FPS/FES and FER. *Nature reviews* vol. 3, 278-289.

**Groth, V. (2011).** Genetische und biochemischen Analysen zur Regulation von N-Cadherin durch den Arf-GEF Schizo und zur Arp2/3-Komplex vermittelten F-Aktin Bildung während der Myoblastenfusion von *D. melanogaster*.

**Hamp, J. (2012).** Zelladhäsion und Aktin-Regulation: Die Funktion von Graf während der Myoblastenfusion und die Myoblasten-spezifische Aktivierung des Arp2/3-Komplexes durch Kette.

**Hamp, J., Löwer, A., Dottermusch-Heidel, C., Beck, L., Moussian, B., Flötenmeyer, M. und Önel, S.F. (revised version).** *Drosophila* Kette/Nap1/Hem-2 coordinates myoblast junction dissolution and the Scar-WASp ration during myoblast fusion. *Journal of Cell Science*.

**Haralalka, S., Shelton, C., Cartwright, H.N., Katzfey, E., Janzen, E. und Abmayr, S.M. (2011).** Asymmetric Mbc, active Rac1 and F-actin foci in the fusion-competent myoblasts during myoblast fusion in *Drosophila*. *Development* 138, 1551-1562.

- Harris, K.P. und Tepass, U. (2010-a).** Cdc42 and Vesicle Trafficking in Polarized Cells. *Traffic* 11: 1272-1279.
- Harris, T.J.C. und Tepass, U. (2010-b).** Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nature reviews*, vol. 11, 502-514.
- Harrison, S.C. (2015).** Viral membrane fusion. *Virology* 479-480, 498-507.
- Hay, B.A., Wolff, T. und Rubin, G.M. (1994).** Expression of baculovirus P35 prevents cell death in *D. melanogaster*. *Development* 120, 2121-2129.
- Helming, L. und Gordon, S. (2009).** Molecular mediators of macrophage fusion. *Trends in Cell Biology* Vol. 19 No. 10, 514-522.
- Hu, C.D., Chinenov, Y. und Kerppola, T.K. (2002).** Visualization of Interactions among bZIP and Rel Family Proteins in Lining Cells Using Bimolecular Fluorescence Complementation. *Molecular Cell*, Vol. 9, 789-798.
- Hunter, M.V., Lee, D.M., Harris, T.J.C. und Fernandez-Gonzalez, R. (2015).** Polarized E-cadherin endocytosis directs actomyosin remodeling during embryonic wound repair. *J. Cell Biol.* Vol. 210 No. 5, 801-816.
- Iwai, Y., Usui, T., Hirano, S., Steward, R., Takeichi, M. und Uemura, T. (1997).** Axon Patterning Requires *DN-cadherin* a Novel Neuronal Adhesion Receptor, in the *D. melanogaster* Embryonic CNS. *Neuron*, Vol. 19, 77-89.
- Jaffe, A.B. und Hall, A. (2005).** Rho GTPases: Biochemistry and Biology. *The Annual Review of Cell and Development Biology* 21:247-69.
- James, P., Halladay, J. und Craig, E.A. (1996).** Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144(4): 1425-36.
- Janning, W. und Knust, E. (2004).** *Genetik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 2. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage (2008).
- Jin, P., Duan, R., Luo, F., Zhang, G., Hong, S.N. und Chen, E.H. (2011).** Competition between Blown Fuse and WASP for WIP Binding Regulates the Dynamics of WASP-Dependent Actin Polymerization In Vivo. *Developmental Cell*, 20, 623-638.

**Jones, N., Blasutig, I.M., Eremina, V., Ruston, J.M., Blatt, F., Li, H., Huang, H., Larose, L., Li, S.S.C., Takano, T., Quaggin, S.E. und Pawson, T. (2006).** Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes. *Nature* Vol. 440, 818-823.

**Kaipa, B.R., (2011).** Linking IgSF-mediates cell adhesion with Arp2/3-based actin polymerization during *D. melanogaster* myoblast fusion.

**Kaipa, B.R., Shao, H., Schäfer, G., Trinkewitz, T., Groth, V., Liu, J., Beck, L., Bogdan, S., Abmayr, S. und Önel, S.F. (2013).** Dock mediates Scar- and WASp-dependent actin polymerization through interaction with cell adhesion molecules in founder cells and fusion-competent myoblasts. *Journal of Cell Science* 126, 360-372.

**Katzen, A.L., Montarras, D., Jackson, J., Paulson, R.F., Kornberg, T. und Bishop, J.M. (1991).** A Gene Related to the Proto-Oncogene *fps/fes* Is Expressed at Diverse Times during the Life Cycle of *D. melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 11, No.1, p. 226-239.

**Kesper, D.A., Stute, C., Buttgereit, D., Kreishöther, N., Vishnu, S., Fischbach, K.F. und Renkawitz-Pohl, R. (2007).** Myoblast Fusion in *D. melanogaster* Is Mediated Through a Fusion-Restricted Myogenic-Adhesive Structure (FuRMAS). *Developmental Dynamics* 236:404-415.

**Kim, S., Shilagardi, K., Zhang, S., Hong, S.N., Sens, K.L., Bo, J., Gonzalez, G.A. und Chen, E.H. (2007).** A Critical Function for the Actin Cytoskeleton in Targeted Exocytosis of Prefusion Vesicles during Myoblast Fusion. *Developmental Cell* 12, 571-586.

**Kim, S.Y., Yasuda, S., Tanaka, H., Yamagata, K. und Kim, H. (2011).** Non-clustered protocadherin. *Cell Adhesion & Migration* 5:2, 97-105.

**Kim, J.H., Ren, Y., Ng, W.P., Li, S., Son, S., Kee, Y.S., Zhang, S., Zhang, G., Fletcher, D.A., Robinson, D.N. und Chen, E.H. (2015-a).** Mechanical Tension Drives Cell Membrane Fusion. *Developmental Cell* 32, 561-573.

**Kim, J.H., Jin, P., Duan, R. und Chen, E.H. (2015-b).** Mechanisms of myoblast fusion during muscle development. *Current Opinion in Genetics & Development* 32:162-170.

**Knöfler, M. und Pollheimer, J. (2013).** Human placental trophoblast invasion and differentiation: a particular focus on Wnt signaling. *Frontiers in Genetics* Volume 4, Article 190.

**Kodana, Y. und Hu, C.D. (2012).** Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): A 5-year update and future perspectives. *BioTechniques* 53:285-298.

**Kumari, S. und Mayor, S. (2008).** ARF1 is directly involved in dynamin-independent endocytosis. *Nature Cell Biology* Volume 10, Number 1, 30-41.

**Kurusu, S. und Takenawa, T. (2009).** The WASP and WAVE family proteins. *Genome Biology* 10:226.

**Lenhart, K.C., Becherer, A.L., Li, J., Xiao, X., McNally, E.M., Mack, C.P. and Taylor, J.M. (2014).** GRAF1 promotes ferlin-dependent myoblast fusion. *Developmental Biology* 393, 298-311.

**Lim, W.A., Richards, F.M. und Fox, R.O. (1994).** Structural determinants of peptide-binding orientation and of sequence specificity in SH3 domains. *Nature* Vol 372, 375-379.

**Lundmark, R., Doherty, G.J., Howes, M.T., Cortese, K., Vallis, Y., Parton, R.G. und McMahon, H.T. (2008).** The GTPase-Activating Proteins GRAF1 Regulates the CLIC/GEEC Endocytic Pathway. *Current Biology* 18, 1802-1808.

**Maitre, J.L. und Heisenberg, C.P. (2013).** Three Functions of Cadherins in Cell Adhesion. *Current Biology* 23, R626-R633.

**Manavski, Y., Carmona, G., Bennewitz, K., Tang, Z., Zhang, F., Sakurai, A., Zeiher, A.M., Gutkind, J.S., Li, X., Kroll, J., Dimmeler, S. und Chavakis, E. (2014).** Brag2 differentially regulates  $\beta$ 1- and  $\beta$ 3-integrin-dependent adhesion in endothelial cells and is involved in developmental and pathological angiogenesis. *Basic Res Cardiol* 109:404.

**Maqbool, T. und Jagla, K. (2007).** Genetic control of muscle development: learning from *D. melanogaster*. *J Muscle Res Cell Motil* 28:397-407.

**Martens, S. und McMahon, H.T. (2008).** Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Volume 9, 543-556.

**Massarwa, R., Carmon, S., Shilo, B.Z. und Schejter, E.D. (2007).** WIP/WASp-Based Actin-Polymerization Machinery Is Essential for Myoblast Fusion in *D. melanogaster*. *Developmental Cell* 12, 557-569.

**McDonald, K.L. und Auer, M. (2006).** High-Pressure Freezing, Cellular Tomography, and Structural Cell Biolgy. *BioTechniques* Vol. 41 No. 2, 137-143.

**McMahon, H.T. und Boucrot, E. (2011).** Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Volume 2, 517-533.

**Meinecke, M., Boucrot, E., Camdere, G., Hon, W.C., Mittal, R. und McMahon, H.T. (2013).** Cooperative Recruitment of Dynamin and BIN7AMphiphysin/Rvs (BAR) Domain-containing Proteins



Leads to GTP-dependent Membrane Scission. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 288, No. 9, pp. 6651-6661.

**Menke, A. und Giehl, K. (2012).** Regulation of adherens junctions by Rho GTPases and p120-catenin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 524, 48-55.

**Menon, S.D. und Chia, W. (2001).** *Drosophila* rolling pebbles: a multidomain protein required for myoblast fusion that recruits D-Titin in response to the myoblast attractant Dumbfounded. *Dev Cell* 1(5): 691-703.

**Mercer, J. und Greber, U.F. (2013).** Virus interactions with endocytic pathways in macrophages and dendritic cells. *Trends in Microbiology*, Vol 21, No. 8.

**Miyamoto, T. (2013).** STATs and macrophage fusion. *JAK-STAT* 2:e24777.

**Moresi, V., Marroncelli, N. und Adamo, S. (2015).** New insights into the epigenetic control of satellite cells. *World Journal of Stem Cells*. 7(6): 945-955.

**Mulcahy, L.A., Pink, R.C. und Carter, D.R.F. (2014).** Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of Extracellular Vesicles* 3: 24641.

**Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Ehrlich, H. (1986).** Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Volume LI, 263-273.

**Murray, M.J., Davidson, C.M., Hayward, N.M. und Brand, A.H. (2006).** The Fes/Fer non-receptor tyrosine kinase cooperates with Src42A to regulate dorsal closure in *D. melanogaster*. *Development* 133, 3063-3073.

**Nakao, S., Platek, A., Hirano, S. und Takeichi, M. (2008).** Contact-dependent promotion of cell migration by the OL-protocadherin-Nap1 interaction. *J. Cell Biol.* Vol. 182 No. 2, 395-410.

**Önel, S.F., Bolke, L. und Klämbt (2004).** The *D. melanogaster* ARF6-GEF Schizo controls commissure formation by regulating Slit. *Development* 131, 2587-2594.

**Önel, S.F. und Renkawitz-Pohl, R. (2009).** FuRMAS: Triggering Myoblast Fusion. *Developmental Dynamics* 238:1513-1525.

**Önel, S.F., Rust, M.B., Jacob, R. und Renkawitz-Pohl, R. (2014).** Tethering Membrane Fusion: Common and Different Players in Myoblasts and at the Synapse. *Journal of Neurogenetics*, 28:3-4, 302-315.

- Paulson, R., Jackson, J., Immergluck, K. und Bishop, J.M. (1997).** The *DFer* gene of *D. melanogaster* encodes two membrane-associated proteins that can both transform vertebrate cells. *Oncogene* 14, 641-652.
- Paululat, A., Breuer, S. und Renkawitz-Pohl, R. (1999).** Determination and development of the larval muscle pattern in *D. melanogaster*. *Cell Tissue Res* 296:151-160.
- Perrimon, N., Pitsouli, C. und Shilo, B.Z. (2012).** Signaling Mechanisms Controlling Cell Fate and Embryonic Patterning. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:a005975.
- Podbilewicz, B. (2014).** Virus and Cell Fusion Mechanisms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30:111-39.
- Pollard, T.D. (2007).** Regulation of Actin Filament Assembly by Arp2/3 Complex and Formins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 36:451-77.
- Portin, P. (2002).** General outlines of the molecular genetics of the Notch signalling pathway in *D. melanogaster*: a review. *Hereditas* 136: 89-96.
- Praefcke, G.J.K. und McMahon, H.T. (2004).** The Dynamin Superfamily: Universal Membrane Tubulation and Fission Molecules. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Volume 5, 133-147.
- Prakash, S., Caldwell, J.C., Eberl, D.F. und Clandinin, T.R. (2005).** *Drosophila* N-Cadherin mediates an attractive interaction between photoreceptor axons and their targets. *Nat Neurosci* 8(4): 443-50.
- Ranganayakulu, G., Schulz, R.A. und Olson, E.N. (1996).** Wingless signaling induces nautilus expression in the ventral mesoderm of the *Drosophila* embryo. *Dev Biol* 176(1): 143-8.
- Ratushny, V. und Golemis, E.A. (2008).** Resolving the network of cell signaling pathways using the evolving yeast two-hybrid system. *BioTechniques* 44:655-662.
- Richardson, B.E., Beckett, K., Nowak, S.J. und Baylies, M.K. (2007).** SCAR/WAVE and Arp2/3 are crucial for cytoskeletal remodeling at the site of myoblast fusion. *Development* 134, 4357-4367.
- Rochlin, K., Yu, S., Roy, S. und Baylies, M.K. (2010).** Myoblast fusion: When it takes more to make one. *Developmental Biology* 341, 66-83.
- Rosato, R., Veltmaat, J.M., Groffen, J. und Heisterkamp, N. (1998).** Involvement of the Tyrosine Kinase Fer in Cell Adhesion. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 18, No. 10, p. 5762-5770.
- Ruiz-Gómez, M., Coutts, N., Price, A., Taylor, M.V. und Bate, M. (2000).** *D. melanogaster* Dumbfounded: A Myoblast Attractant Essential for Fusion. *Cell*, Vol. 102, 189-198.

**Ryu, J.R., Echarri, A., Li, R. und Pendergast, A.M. (2009).** Regulation of Cell-Cell Adhesion by Abi/Diaphanous Complexes. *Molecular and Cellular Biology*, Vol 29, No. 7, p. 1735-1748.

**Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989).** *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

**Schäfer, G., Weber, S., Holz, A., Bogdan, S., Schumacher, S., Müller, A., Renkawitz-Pohl, R. und Önel, S.F. (2007).** The Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) is essential for myoblast fusion in *D. melanogaster*. *Developmental Biology* 304, 664-674.

**Schneider, I. (1972).** Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol* 27(2): 353-65.

**Schröter, R.H., Lier, S., Holz, A., Bogdan, S., Klämbt, C., Beck, L. und Renkawitz-Pohl, R. (2004).** *kette* and *blown fuse* interact genetically during the second fusion step of myogenesis in *Drosophila*. *Development*, 131, 4501-4509.

**Schröter, R.H., Buttgereit, D., Beck, L., Holz, A. und Renkawitz-Pohl, R. (2006).** Blown fuse regulates stretching and outgrowth but not myoblast fusion of the circular visceral muscles in *D. melanogaster*. *Differentiation* 74: 608-621.

**Schulman, V.K., Dobi, K.C. und Baylies, M.K. (2015).** Morphogenesis of the somatic musculature in *Drosophila melanogaster*. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 4(4):313-334.

**Sens, K.L., Zhang, S., Jin, P., Duan, R., Zhang, G., Luo, F., Parachini, L. and Chen, E.H. (2010).** An invasive podosome-like structure promotes fusion pore formation during myoblast fusion. *Journal of Cell Biology* 191, 1013-1027.

**Sesaki, H., Adachi, Y., Kageyama, Y., Itoh, K. und Iijima, M. (2014).** *In vivo* functions of Drp1: Lessons learned from yeast genetics and mouse knockouts. *Biochim Biophys Acta* 1842(8): 1179-1185.

**Setyawati, M.I., Tay, C.Y., Chia, S.L., Goh, S.L., Fang, W., Neo, M.J., Chong, H.C., Tan, S.M., Loo, S.C.J., Ng, K.W., Xie, J.P., Ong, C.N., Tan, N.S. und Leong, D.T. (2013).** Titanium dioxide nanomaterials cause endothelial cell leakiness by disrupting the hemophilic interaction of VE-cadherin. *Nature Communications* 4:1673

**Seugnet, L., Simpson, P. und Haenlin, M. (1997).** Requirement for Dynamin during Notch Signaling in *Drosophila* Neurogenesis. *Developmental Biology* 192, 585-598.

**Shelton, C., Kocherlakota, K.S., Zhuang, S. und Abmayr, S.M. (2009).** The immunoglobulin superfamily members Hbs functions redundantly with Sns in interactions between founder and fusion-competent myoblasts. *Development* 136, 1159-1168.

**Sivasankar, S., Briehner, W., Lavrik, N., Gumbiner, B. und Leckband, D. (1999).** Direct molecular force measurement of multiple adhesive interactions between cadherin ectodomains. *PNAS*, vol. 96, no.21, 11820-11824.

**St. Johnston, D. (2002).** The art and design of genetic screens: *D. melanogaster*. *Nature Reviews* Vol. 3, 176-188.

**Strünkelnberg, M., Bonengel, B., Moda, L.M., Hertenstein, A., de Couet, H.G., Ramos, R.G.P. und Fischbach, K.F. (2001).** *rst* and its paralogue *kirre* act redundantly during embryonic muscle development in *D. melanogaster*. *Development* 128, 4229-4239.

**Suetsugu, S. (2013).** Activation of nucleation promoting factors for directional actin filament elongation: Allosteric regulation and multimerization on the membrane. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 24, 267-271.

**Tal, T., Vaizel-Ohayon, D. und Schejter, E.D. (2002).** Conserved Interactions with Cytoskeletal but Not Signaling Elements Are an Essential Aspect of *Drosophila Wasp* Function. *Developmental Biology* 243, 260-271.

**Tixier, V., Bataillé, L. und Jagla, K. (2010).** Diversification of muscle types: Recent insights from *D. melanogaster*. *Experimental Cell Research* 316, 3019-3027.

**Torii, K.U. (2012).** Two-dimensional spatial patterning in developmental systems. *Trends in Cell Biology*, Vol. 22, No. 8.

**Trinkewitz, T. (2013).** Genetische und biochemische Analysen zur Regulation des Arp2/3-Komplex vermittelten F-Aktin-Plaue Bildung und Auflösung während der Myoblastenfusion von *D. melanogaster*.

**Tryggvason, K. (1999).** Unraveling the Mechanisms of Glomerular Ultrafiltration: Nephrin, a Key Component of the Slit Diaphragm. *Journal of the American Society of Nephrology* 10: 2440-2445.

**van der Blik, A.M., und Meyerowitz, E.M. (1991).** Dynamin-like protein encoded by the *D. melanogaster shibire* gene associated with vesicular traffic. *Nature* Vol 351, 411-414.

**Verma, R., Kovari, I., Soofi, A., Nihalani, D., Patrie, K. und Holzman, L.B. (2006).** Nephrin ectodomain engagement results in Src kinase activation, nephrin phosphorylation, Nck recruitment, and actin polymerization. *J. Clin. Invest.* 116:1346-1359.

**Weitkunat, M und Schnorrer, F. (2014).** A guide to study *D. melanogaster* muscle biology. *Methods* 68, 2-14.

**Xu, G., Craig, A.W.B., Greer, P., Miller, M., Anastasiadis, P.Z., Lilien, J. und Balsamo, J. (2004).** Continuous association of cadherin with  $\beta$ -catenin requires the non-receptor tyrosine-kinase Fer. *Journal of Cell Science* 117, 3207-3219.

**Yonekura, S., Xu, L., Ting, C.Y. und Lee, C.H. (2007).** Adhesive but not Signaling Activity of *Drosophila* N-cadherin is Essential for Target Selection of Photoreceptor Afferents. *Dev Biol.* 304(2): 759-770.

**Yonemura, S. (2011).** Cadherin-actin interactions at adherens junctions. *Current Opinion in Cell Biology* 23:515-522.

**Yu, H., Chen, J.K., Feng, S., Dalgarno, D.C., Brauer, A.W. und Schreiber, S.L. (1994).** Structural Basis for the Binding of Proline-Rich Peptides to SH3 Domains. *Cell*, Vol. 76, 933-945.

**Zhang, S. und Chen, E.H. (2008).** Ultrastructural Analysis of Myoblast Fusion in *D. melanogaster*. *Methods Mol Biol.* 475: 275-297.

**Zirngibl, R., Schulze, D., Mirski, S.E.L., Cole, S.P.C. und Greer, P. (2001).** Subcellular Localization Analysis of the Closely Related Fps/Fes and Fer Protein-Tyrosine Kinases Suggests a Distinct Role for Fps/Fes in Vesicular Trafficking. *Experimental Cell Research* 266, 87-94.

## 8.1 Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäuren
Abi	Abelson-interacting protein
AD	Aktivierungsdomäne
Arf	ADP-Ribosylierungsfaktor
Arp2/3 Komplex	actin-related protein 2/3 complex
BiFC	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
Cdc42	Cell division cycle 42
CLIC/GEEC	Clathrin-independent carriers/GPI-anchored protein-enriched Early Endosomal Compartments
DNA-BD	DNA-Bindedomäne
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
Drp1	Dynamamin-related Protein1
ER	endoplasmatisches Retikulum
F-Aktin	filamentöses Aktin
FC	Founder Zelle (Founder Cell)
FCH	Fps/Fes/Fer/CIP4 Homologie
FCM	fusionskompetente Myoblaste (fusion-competent myoblast)
Fes/Fps	Feline sarcoma/Fujinami poultry sarcoma
FuRMAS	Fusion-Restricted Myogenic Adhesive Structure
G-Aktin	globuläres Aktin
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GEF	Guanin-Nukleotidaustauschfaktor (guanine nucleotide-exchange factor)
GPI	Glykosylphosphatidylinositol

Graf	GTPase regulatr associated with focal adhesion kinase
HPF/FS	High Pressure Freezing/Freeze Substitution
IgSF	Immunoglobulin-Superfamilie
JMD	juxtamembrane Domäne
kb	Kilobasenpaare
Nap1	Nck-associated protein 1
NPF	kernbildungsfördernder Faktor (nucleation promoting factor)
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PH	Pleckstrin-Homologie
Rac	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
Scar	suppressor of cyclic AMP repressor
SH2/3	Src-homology 2/3
Sltr	Solitary
Sra-1	specifically Rac-associated-1
TM	transmembrane Domäne
UAS	Upstream Activating Sequence
UpM	Umdrehungen pro Minute
Vrp1	Verprolin1
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WASp	Wiskott-Aldrich Syndrome protein
WAVE	WASp-family verprolin-homologous protein
Wip	WASp-interacting partner

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

**Abb. 2.1:** Aufbau der Körperwandmuskulatur von *D. melanogaster* sowie schematischer Überblick der einzelnen Muskeln pro Hemisegment.

**Abb. 2.2:** Sns und Duf bilden eine ringförmige Struktur an der Kontaktstelle zwischen FCM und FC/wachsender Myotube.

**Abb. 2.3:** Überblick der verschiedenen Möglichkeiten zur Aktinpolymerisation.

**Abb. 2.4:** Signalweiterleitung in den Zellen.

**Abb. 2.5:** Ultrastrukturelle Veränderungen während der beiden Phasen der Myoblastenfusion.

**Abb. 2.6:** Aufbau von Adherens Junctions.

**Abb. 2.7:** Übersicht der in *D. melanogaster* beschriebenen Isoformen von Fps85D/DFer.

**Abb. 2.8:** Überblick der unterschiedlichen Endocytosewege und der daran beteiligten Proteine.

**Abb. 2.9:** Proteinstruktur von Graf1.

**Abb. 4.1:** Kreuzungsschema für eine Umbalancierung.

**Abb. 4.2:** Kreuzungsschema für die Mehrfachmarkierung einer Fliegenlinie.

**Abb. 4.3:** Kreuzungsschema für die Generierung einer Doppelmutante.

**Abb. 4.4:** Kreuzungsschema für die Generierung einer rekombinanten Fliegenlinie.

**Abb. 4.5:** Schematische Darstellung des UAS-Gal4 Systems.

**Abb. 4.6:** Schematische Darstellung des Hefe 2-Hybrid Systems.

**Abb. 4.7:** Schematische Darstellung der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation.

**Abb. 5.1:** Im wildtypischen Hintergrund diffundierte eGFP in die FCMs.

**Abb. 5.2:** In der *schizo*-Mutante diffundierte eGFP in den meisten Fällen nicht in die FCMs.

**Abb. 5.3:** Drp1-mCherry könnte partiell mit N-Cadherin<sup>TMintra</sup>-eGFP co-lokalisieren, jedoch nicht mit Schizo-eGFP.

**Abb. 5.4:** mCherry-Graf co-lokalisierte transient mit Arf1-eGFP und Arf1<sup>Q71L</sup>-eGFP.



**Abb. 5.5:** Transiente Co-Lokalisationen konnten in S2 Zellen zwischen mCherry-Graf und Schizo-eGFP beobachtet werden, jedoch nicht zwischen mCherry-Graf und N-Cadherin<sup>TM</sup><sub>intra</sub>-eGFP.

**Abb. 5.6:** Live-Imaging Einzelbilder von *N-cadherin*<sup>TM</sup><sub>intra</sub>-eGFP und mCherry-*graf* co-transfizierten S2 Zellen zeigten eine transiente Co-Lokalisation.

**Abb. 5.7:** Die SH3-Domäne von Graf interagiert mit der intrazellulären Domäne von N-Cadherin.

**Abb. 5.8:** Die Interaktionstests zwischen Graf und N-Cadherin mittels BiFC-Versuch in S2 Zellen waren nicht auswertbar.

**Abb. 5.9:** Cdc42-mCherry schien zunächst an den Membranen der Muskeln zu lokalisieren, später im Cytoplasma.

**Abb. 5.10:** Die Rettungen von *schizo* mit *graf*<sup>full length</sup> und *cdc42*<sup>V12</sup> zeigten wie die *sg24;schizo*<sup>C1-28</sup> Treiberlinie eine vereinzelt Ausbildung ventro-lateraler Muskeln.

**Abb. 5.11:** Für die Interaktion zwischen Abi und Schizo ist die SH3-Domäne von Abi essentiell, während die N-terminale WAVE-interagierende Domäne von Abi für die Interaktion mit Graf benötigt wird.

**Abb. 5.12:** Die *N-cadherin*<sup>M19</sup>,*dock*<sup>04723</sup>-Doppelmutanten sowie die *N-cadherin*<sup>M19</sup>-Einzelmutante zeigten Defekte in der dorsalen Muskulatur.

**Abb. 5.13:** In den *N-cadherin*<sup>M19</sup>,*dock*<sup>04723</sup>-Doppelmutanten waren leichte Anheftungsdefekte sichtbar.

**Abb. 5.14:** In den doppelmutanten Linien sowie in der *dock*<sup>04723</sup>-Einzelmutante wuchsen die ventralen Muskeln teilweise zu weit auf die Mittellinie zu.

**Abb. 5.15:** Eine genetische Interaktion zwischen *N-cadherin* und *myrfps85Dp92* konnte nicht ausgeschlossen werden.

**Abb. 5.16:** Analyse der Lokalisation des myrFps85Dp100-mCherry Fusionsproteins im Embryo.

**Abb. 5.17:** Fps85Dp100-Myc lokalisierte an den Anheftungsstellen sowie an den Membranen der Myoblasten.

**Abb. 5.18:** Schematischer Überblick der verwendeten *fps85D* Konstrukte.

**Abb. 5.19:** Das Fps85Dp100 delta SH2 delta Tyrosinkinase-Myc Fusionsprotein zeigte eine Lokalisation an den Membranen sowie den Anheftungsstellen der Myotuben.

**Abb. 5.20:** Das Fps85Dp100-Myc Fusionsprotein sowie die verkürzte Variante co-lokalisieren mit N-Cadherin an den Membranen der Myoblasten.

**Abb. 5.21:** myrFps85Dp100-mCherry co-lokalisiert mit FasciclinIII.

**Abb. 5.22:** Im visceralen Mesoderm war eine Co-Lokalisation zwischen Fps85Dp100-eGFP und FasciclinIII zu beobachten.

**Abb. 5.23:** Fps85Dp100-mCherry und myrFps85D-mCherry co-lokalisieren partiell mit N-Cadherin<sup>TMintra</sup>-eGFP und Schizo-eGFP.

**Abb. 5.24:** Partielle Co-Lokalisationen waren zwischen dem Fps85Dp100-mCherry Fusionsprotein und Arf1-eGFP sowie Arf1<sup>Q71L</sup>-eGFP möglich, jedoch nicht zwischen Fps85Dp100-mCherry und eGFP-Graf.

**Abb. 6.1:** In der *schizo*-Mutante kommt es nicht zur Vesikulierung der Membranen.

**Abb. 6.2:** Verkürzte Proteinvarianten von Graf zeigten eine veränderte Lokalisation bei Expression in S2 Zellen.

**Abb. 6.3:** Vergleich der Funktionen der Domänen von Graf1 und Graf.

**Abb. 6.4:** Graf und Schizo interagieren möglicherweise mit N-Cadherin und Abi an der Membran.

### 8.3 Tabellenverzeichnis

**Tabelle 3.1:** Verwendete primäre und sekundäre Antikörper.

**Tabelle 3.2:** Übersicht der verwendeten cDNAs und Matrizen.

**Tabelle 3.3:** Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Vektoren.

**Tabelle 3.4:** Verwendete Konstrukte, die im Rahmen anderer Arbeiten generiert wurden.

**Tabelle 3.5:** Verwendete Konstrukte, die in dieser Arbeit generiert wurden.

**Tabelle 3.6:** Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten und generierten Fliegenstämme.

**Tabelle 5.1:** Schizo interagiert im Hefe 2-Hybridsystem mit N-Cadherin, jedoch nicht mit Graf und Cdc42.

**Tab. 5.2:** Fps85Dp100-Interaktionstests im Hefe 2-Hybridsystem.

## 8.4 Danksagungen

Als erstes möchte ich Prof. Dr. Susanne Önel danken, dass ich meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe anfertigen durfte. Danke für die Bereitstellung von Laborräumen und Materialien. Vielen Dank auch für zahlreiche Ratschläge und die Hilfe bei Fragen und Problemen im Labor und natürlich für das Korrekturlesen von Abstracts, Postern und dieser Arbeit. Susanne, du hast mir die Möglichkeit geboten während dieser Zeit zahlreiche Tagungen und Workshops zu besuchen. Ich habe mich dadurch weiterentwickelt und viel dazu gelernt. Herzlichen Dank dafür!

Bei Frau Prof. Dr. Renkawitz-Pohl möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie für die wertvollen Tipps und Ratschläge bedanken. Vielen Dank für die interessanten Vorlesungen, die Sie mit so viel Begeisterung gehalten haben. Auch für die gemeinschaftliche Nutzung von Laborräumen und Materialien möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Dem DFG-Graduiertenkolleg GRK1216 danke ich für die Finanzierung von Tagungen, Workshops und natürlich auch dieser Arbeit. Auch den Mitgliedern meines Advisory Boards möchte ich an dieser Stelle danken.

Zunächst möchte ich mich bei meinen fleißigen Korrekturlesern bedanken, ihr habt großartige Arbeit geleistet!

Auch bei allen alten und neuen Kollegen möchte ich mich für die Tipps und vor allem für die schöne Zeit bedanken.

Inge, Angela und Isolde danke ich für die vielen Arbeiten „im Hintergrund“. Auch bei Ruth möchte ich mich für die Injektionen und die Tipps zum Umgang mit den Fliegen bedanken.

Bei unserem gesamten Labor, Andreas, Michaela, Steffi, Claudia und Sabina möchte ich mich für die immer unterhaltsame Zeit im Labor und im Büro bedanken. Langweilig war es mit euch nie. Danke für die vielen Kleinigkeiten, die den Laboralltag noch spannender gemacht haben. Michaela und Andreas, danke für die Motivation, die hilfreichen Gespräche und dafür, dass ihr mir immer mit Leervektoren und PBT ausgeholfen habt, wenn ich mal wieder nicht genug davon hatte!

Sabina, vielen Dank für die Injektionen, die Hilfe und Tipps bei der Fliegenarbeit und im Labor. Du hast einen großen Teil dazu beigetragen, dass ich mich hier wohl gefühlt habe. Danke für die aufmunternden Worte in den passenden Momenten!

Herrn Dr. Buttgerit, Kathi, Silke und Ljubinka möchte ich für die liebe Aufnahme im Labor danken. Kathi, Silke und Ljubinka, danke für die Unterstützung, die Gespräche und die Motivation! Ljubinka, vielen herzlichen Dank für die gute Zellkulturarbeit und deine unermüdliche Hilfsbereitschaft! Silke und Kathi, lieben Dank für die leckeren Kuchen, die vielen gemeinsamen Mittagspausen und die tollen Unternehmungen.

Ina und Tim, bei euch möchte ich mich für die vielen Tipps bezüglich Hefe und Western bedanken. Tim, du hast die nervige Suche nach Kits oder Chemikalien beim Bestellen erträglicher gemacht. Ina, danke für die tolle Zeit in Amerika (ohne dich hätte ich nur halb so viel gesehen!) und für die immer hilfreichen Gespräche auf dem gemeinsamen Teil des Wegs nach Hause!

Katja, ich danke dir für die großartige Unterstützung bei jeder Art von Problemen und dafür, dass du immer eine Lösung parat hattest. Vielen Dank für die Motivation bei den letzten Zeilen und für die tollen gemeinsamen Geburtstage.

Christina, ich danke dir für die wertvollen Ratschläge, die guten Vorlesungen und Kurse.

Julia, vielen Dank für die Vorarbeiten, für die schöne Zeit während der Masterarbeit und dafür, dass ich dein Projekt übernehmen durfte!

Flo und Vanessa, lieben Dank für die unzähligen Fotos und Videos von Katzen, Bären und Pandas. Flo, ich weiß nicht, wie du das machst, aber du erwischst immer den richtigen Moment.

Daniel, vielen Dank für den Ausgleich durch das großartige Training, für die Ratschläge und Gespräche!

Ich möchte mich auch bei meiner gesamten Trainingsgruppe bedanken, mit euch macht alles gleich doppelt so viel Freude! Ein Samstagmorgen ohne euch ist echt komisch. Simone, du machst das klasse!

Meinen Mädels vom Tanzen, Julia, Birte, Maren, Ronja, Emma, Mone, Jenny und Michi danke ich für viele anstrengende, aber auch schöne Stunden! Auch bei allen anderen „Aktiven“ vom Verein möchte ich mich für tolle Sitzungen und Feiern bedanken und dafür, dass ich trotz der Entfernung immer noch mitmachen kann und darf.

Paul und Lydia, René und Mone, Nicole und Andre und besonders Marcel und Caro möchte ich für viele schöne Stunden danken, die sie an den Wochenenden mit mir verbracht haben. Danke, dass ihr es mir nicht übel genommen habt, wenn ich mich mal wieder lange nicht gemeldet habe.

Danke auch an meine Konzertgruppe, Sven, Mark, Sarah und Dean.

Ein besonderer Dank gilt dem weltbesten Geburtstagspartner!

Jessica, lieben Dank für die tolle Zeit im Büro, die vielen Tipps und Ratschläge in jeglicher Hinsicht, für die Motivation und Unterstützung! Danke für den Ausgleich und die Gespräche. Du weißt, dass wir das jetzt auch noch so beenden müssen, wie es im Kleinwalsertal begonnen hat.

Bettina, vielen lieben Dank für deine Unterstützung, deine Begeisterung und die zahlreichen erholsamen Nachmittage und Abende! Du hast mir viel beigebracht und dadurch sehr zu meiner Weiterentwicklung beigetragen! Danke für das Gefühl, dass ich bei euch immer willkommen bin.

Ein großer Dank gilt meiner Oma und meiner Familie, vor allem Anne und Otto, Regina, Irene und Heinze. Danke, für eure Unterstützung, für das Interesse an meiner Arbeit und für die vielen Fragen zu den Fliegen.

Julia und Colja, danke für die schönen gemeinsamen Unternehmungen in den letzten Jahren. Julia, vielen lieben Dank für dein Verständnis, deine Hilfe, die Schichten in der Fischbude, das „abenteuerliche Wellnesswochenende“, die guten Unterhaltungen und positiven Worte und noch so viel mehr!

Meinen Eltern danke ich für alles, was sie mir ermöglicht haben und noch immer ermöglichen. Dafür, dass sie immer für mich da und zu jeder Zeit erreichbar waren. Vielen Dank, dass ihr Verständnis hattet, wenn ich mal schlechte Laune oder wenig Zeit hatte. Ohne eure Hilfe hätte ich diese Arbeit nie schreiben können.

## 8.5 Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Die Rolle von *Drosophila* Dynamin, Graf und der nicht-Rezeptor Tyrosinkinase Fes/Fer bei der Internalisierung von N-Cadherin in adhärierenden Founderzellen und fusionskompetenten Myoblasten“

unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Susanne Önel am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich angegebenen Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den

---

(Carina Braukmann)