

INAUGURAL - DISSERTATION

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

vorgelegt von
Diplom - Biologe Christian Wenzel
aus Neustrelitz
Tag der mündlichen Prüfung:

Molekulare und genetische Analyse der
Furchungskanalbildung während der Zellularisierung in
Drosophila melanogaster

Gutachter:

PD Dr. Jörg Grosshans
Prof. Dr. Bernhard Dobberstein

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Grosshans, J.*, Wenzl, C*, Herz, H.M., Bartoszewski, S., Schnorrer, F., Vogt, N., Schwarz, H. and Muller, H.A. (2005). "RhoGEF2 and the formin Dia control the formation of the furrow canal by directed actin assembly during *Drosophila* cellularisation" *Development* 132(5): 1009-20.

* Arbeit wurde von Dr. J.Grosshans initiiert und von beiden Autoren zu gleichen Teilen bearbeitet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Zusammenfassung	7
Summary	8
Abkürzungsverzeichnis	9
1. Einleitung	10
1.1 Embryonalentwicklung in <i>Drosophila</i>	10
1.2 Zellularisierung und Bildung des Furchungskanals	11
1.3 Bedeutung des Zytoskeletts für die Zellularisierung	14
1.4 Genetische Kontrolle der Zellularisierung	15
1.4.1 zygotische Faktoren	15
1.4.2 maternale Faktoren	17
1.4.2.1 Membrantransport	17
1.4.2.2 <i>RhoGEF2</i> , <i>Rho1</i> und <i>Diaphanous</i>	20
1.4.2.3 <i>Abelson</i> und <i>Enabled</i>	23
1.5 Zellularisierung und Zytokinese	24
1.6 Lokale Rho-Aktivierung durch subzelluläre Kompartimentierung regulatorischer Faktoren	26
1.7 Ziel dieser Arbeit	28
2. Materialien	29
2.1 Chemikalien	29
2.2 Enzyme	29
2.3 Radioaktive Substanzen	29
2.4 Oligonukleotide	29
2.5 Verwendete Vektoren	31
2.6 Antikörper und Farbstoffe	31
2.7 Bakterienstämme	32
2.8 Hefestämme	32
2.9 Zelllinien	32
2.10 Fliegenstämme	33
2.11 Kultur- und Nährmedien, Fliegenfutter	34
2.12 Puffer und Lösungen	35
2.13 Chromatographie	40
2.14 Reagenziensätze	40
2.15 sonstige Materialien	41
2.16 Software	42

2.17	Mikroskope	42
2.18	Geräte	42
3.	Methoden	43
3.1	Fliegenarbeiten	43
3.1.1	Fliegenhaltung	43
3.1.2	Erzeugung von Keimbahnklonen	43
3.1.3	Dechorionieren und Fixieren von Embryonen	43
3.1.4	Mikroinjektion in Embryonen	44
3.1.5	Herstellung transgener Fliegen	45
3.1.6	Antikörperfärbungen	45
3.1.7	Live Imaging mit Embryonen	46
3.2	DNA-Arbeiten	46
3.2.1	Restriktionsanalyse	46
3.2.2	Agarose-Gelelektrophorese	47
3.2.3	DNA-Aufreinigung aus dem Gel	47
3.2.4	Ligation von DNA Fragmenten	47
3.2.5	Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden	47
3.2.6	Transformation von Plasmiden in <i>E.coli</i>	48
3.2.7	PCR	49
3.2.8	Plasmid-Mini-Präparation	50
3.2.9	Plasmid-Midi-Präparation	51
3.2.10	Sequenzierung	51
3.2.11	Konstrukte	51
3.3	RNA-Arbeiten	56
3.3.1	<i>in vitro</i> Transkription	56
3.3.2	denaturierende Gelelektrophorese	57
3.4	Proteinarbeiten	57
3.4.1	SDS-PAGE und Coomassie-Färbung	57
3.4.2	Silberfärbung	58
3.4.3	Colloidal Coomassie Färbung und Massenspektrometrie	58
3.4.4	<i>in vitro</i> Translation im Retikulozytenlysate	59
3.4.5	Western Blot	59
3.4.6	Autoradiographie	60
3.4.7	Nickelaffinitätsreinigung	60
3.4.8	Dot-Blot und Amidoschwarzfärbung	60
3.4.9	Herstellung von embryonalen Proteinextrakten	61
3.4.10	GST-Pull Down Assay aus Embryonalextrakten	61

3.5 Zellkulturarbeiten	61
3.5.1 Kultur von <i>Drosophila</i> S2-Zellen	61
3.5.2 Transfektion von S2-Zellen	61
3.5.3 Live Cell Imaging mit S2-Zellen	63
3.5.4 Concanavalin A Behandlung	63
3.6 Arbeiten mit Hefe	63
3.6.1 <i>Yeast Two Hybrid Screen</i>	63
3.6.2 Transformation von Hefe	65
3.6.3 Replikatests	65
3.6.4 Isolierung der Plasmid-DNA aus Hefe	66
3.6.5 Amplifikation der Inserts durch PCR und anschließende Sequenzierung	66
4. Ergebnisse	67
4.1 Die Rolle von RhoGEF2 für die Morphogenese des Furchungskanals	67
4.1.1 Der Zellularisierungs-Phänotyp von <i>RhoGEF2</i> Keimbahnklonen	67
4.1.2 Charakterisierung der Mutante <i>RhoGEF2</i> ^{l(2)04291}	69
4.1.3 Kartierung der Lokalisationsdomäne von RhoGEF2	70
4.1.4 Die PDZ Domäne ist notwendig um RhoGEF2 am Furchungskanal zu lokalisieren	73
4.1.5 Dynamik der Lokalisation von 4xPDZ _{RG2} -RFP	75
4.1.6 Rettung des Zellularisierungsphänotyps mit myc-RhoGEF2	77
4.1.7. Expression von <i>RhoGEF2</i> in <i>Drosophila</i> -S2-Zellen	79
4.1.8 Suche nach physikalischen Interaktoren für die PDZ-Domäne von RhoGEF2	80
4.1.8.1 <i>Yeast-Two-Hybrid Screen</i>	80
4.1.8.2 <i>GST pull down Assay</i> mit Embryonalextrakten	82
4.1.9 Untersuchung ausgewählter möglicher Bindepartner	86
4.2 <i>in vivo</i> Analyse der Furchungskanalbildung mit Hilfe ver- schiedener fluoreszenzmarkierter Markerproteine	91
4.2.1 <i>in vivo</i> Marker	91
4.2.2 E-cadherin-GFP als früher Marker für die Musterbildung in der Membran	92
4.2.3 Membrandynamik in verschiedenen Zellularisierungsmutanten	95
4.2.4 Membrandynamik in <i>RhoGEF2/nullo</i> und <i>abl/nullo</i> Doppel- mutanten	97
4.2.5 Einfluß von f-Aktin auf die Stabilität der invaginierenden Membran	99

4.2.6	Rolle der Pseudocleavagesfurche für die Furchungskanalbildung	100
4.2.7	Einfluß von freien Zentrosomen auf die Furchungskanalbildung	103
4.2.8	Rolle der Mikrotubuli bei der Entstehung des Furchungskanals	105
5.	Diskussion	108
5.1	RhoGEF2, Rho1 und Dia regulieren die lokale Polymerisation von f-Aktin am Furchungskanal	108
5.2	Die Rolle von Aktin bei der Furchungskanalbildung	110
5.3	Die Furchungskanallokalisierung von RhoGEF2 wird durch die PDZ-Domäne vermittelt	111
5.4	Wie kommt RhoGEF an den Furchungskanal?	113
5.5	Bedeutung der neu identifizierten PDZ_{RG2}-Interaktionspartner für die Lokalisation von RhoGEF2 im Embryo	116
5.6	Die Rolle von Zentrosomen, Mikrotubuli und Pseudocleavagesfurche bei der Initiation der Zellularisierung	118
5.7	Die Bildung des Furchungskanals verläuft in zwei Phasen	119
5.8	Modell für die genetische Kontrolle der Zellularisierung	121
6.	Literaturverzeichnis	124
	Danksagung	131

Zusammenfassung

Die Embryonalentwicklung in *Drosophila* beginnt wie die der meisten Insekten mit einer Serie von schnellen syncytialen Zellkernteilungen, den sogenannten Furchungsteilungen, die ohne Zytokinese im embryonalen Zytoplasma stattfinden. Im Ergebnis dieser Teilungen ordnen sich etwa 6000 Zellkerne regelmäßig in einer Schicht direkt unterhalb der embryonalen Plasmamembran an und bilden so das syncytiale Blastoderm. Nach dem Ende der 13. Teilung beginnt in dem etwa einstündigen Prozess der Zellularisierung die Membran an den Stellen zwischen den Zellkernen einem hexagonalen Muster folgend zu invaginieren. Dabei bilden sich zunächst kleine haarnadelförmige Membranschleifen, die sogenannten Furchungskanäle, die dann ins Innere des Embryos wandern. So werden alle peripheren Zellkerne von Membran umschlossen und es entsteht ein einschichtiges polarisiertes Epithelium, das zelluläre Blastoderm. Die Initiation der Zellularisierung nach dem Austritt aus Mitose 13 wird sowohl von zygotischen als auch von maternalen Genen kontrolliert. Dabei spielen insbesondere Faktoren des Zytoskeletts wie f-Aktin und Mikrotubuli sowie endo- und exozytotische Prozesse eine zentrale Rolle.

Mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Markerproteinen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß die Bildung des Furchungskanals in zwei Phasen abläuft. Zunächst beginnt die Membran nur wenige Minuten nach dem Austritt aus der Telophase von Mitose 13 kleine lokale Einstülpungen zu bilden, die durch die Anreicherung des Transmembranproteins E-cadherin-GFP im Bereich zwischen benachbarten Zellkernen sichtbar werden. In Phase 2 werden schließlich Faktoren wie RhoGEF2 und f-Aktin rekrutiert, die die eingewanderten Membranstrukturen stabilisieren. Dabei wird Phase 1 durch die Aktivität von Komponenten des Recycling Endosoms wie Rab11 und Nuf beeinflusst, während Mutationen in *RhoGEF2*, *dia*, *nullo*, *dah* und *abl* eher Phase 2 betreffen. Die Analyse von Doppelmutanten ergab, daß *RhoGEF2* und *nullo* ähnlich wie *abl* und *nullo* in jeweils redundanter Weise an der Bildung des Furchungskanals beteiligt sind. Es wird zudem nachgewiesen, daß die Positionen in der Membran, an denen sich Furchungskanäle bilden, vermutlich nicht durch die Lage der mitotischen Pseudocleavagefurchen sondern vielmehr durch eine organisierende Aktivität der Zentrosomen unter Beteiligung der von ihnen ausgehenden Mikrotubuli bestimmt werden. RhoGEF2 ist ein GTP-Austauschfaktor der am Furchungskanal lokalisiert, wo er in Abhängigkeit von Rho1 die Aktivität des Formins Dia und somit die Organisation von f-Aktin kontrolliert. Um die Mechanismen dieser lokalen Rho-Aktivierung besser zu verstehen, wurde die PDZ-Domäne als der Teil des Proteins identifiziert, der die Lokalisation des Proteins vermittelt. So war es möglich physikalische Interaktionspartner zu isolieren, von denen einige auf eine mögliche Rolle bei der Lokalisation von RhoGEF2 untersucht wurden.

Summary

Embryonic development in *Drosophila* starts with a series of 13 rapid nuclear divisions also called cleavage divisions that take place without cytokinesis in a common cytoplasm. This results in the regular arrangement of about 6000 somatic nuclei in a layer beneath the embryonic plasma membrane where they form the syncytial blastoderm. By forming small hairpinloop like structures the so called furrow canals the plasma membrane starts to invaginate in a hexagonal pattern between cortical nuclei in a process called cellularization shortly after exit from the last cleavage division. During the invagination process all cortical nuclei are enclosed by plasma membrane giving rise to a monolayered polarized epithelium, the cellular blastoderm. Initiation of membrane invagination is controlled by zygotic as well as by maternal genes and depends mainly on regulators of cytoskeletal elements and on components of the membrane traffic machinery.

This work reports the *in vivo* analysis of the dynamics of furrow canal formation as well as the molecular characterization of RhoGEF2, a GTP exchange factor that functions in cellularization. By using fluorescently labeled *in vivo* markers and high resolution timelapse microscopy it is shown that furrow canal formation is a two step process. First membrane starts to form small invaginations only minutes after exit from telophase of cycle 13. This becomes visible by enrichment of the transmembrane protein E-cadherin-GFP between adjacent cortical nuclei. 3-5 minutes later stabilizing factors like RhoGEF2 and f-actin are recruited in step 2. Step 1 is controlled by components of the recycling endosome like Rab11 and Nuf whereas mutations in *RhoGEF2*, *dia*, *nullo*, *dah* und *abl* mainly affect the stabilization of the invaginated membrane in step 2. Analysis of double mutants revealed that *RhoGEF2* and *nullo* as well as *nullo* and *abl* control furrow canal formation in redundant pathways. It was found that the mitotic pseudocleavage furrows do not contribute in determining the positions of the cleavage furrows at the onset of cellularization. Instead a microtubule-dependent organizing role of the centrosomes in the formation of the furrow canals was discovered, leading to a model that favours a centrosome mediated determination of the cleavage position rather than an intrinsic self organization of the plasma membrane.

RhoGEF2 controls the organization of f-actin at the furrow canal by local activation of Rho1 and its effector Dia. The PDZ domain of RhoGEF2 was found to be sufficient and required for mediating the furrow canal localization of the protein. The isolated PDZ-domain was used to find physical interactors that might function upstream of RhoGEF2. Among those factors that were found to bind PDZ_{RG2} a few were selected and analyzed for a potential role in mediating the RhoGEF2 dependent local Rho-activation during furrow canal formation.

Abkürzungen

APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	<i>base pair</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Ci	Curie
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FCS	<i>fetale calf serum</i>
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDI	Guanine-Nukleotid-Dissoziations-Inhibitor
GDP	Guanindiphosphat
GEF	<i>guanidyl nucleotide exchange factor</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanintriphosphat
HA	Hämagglutinin
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethanesulfonsäure)
kb	<i>kilo base pair</i>
kDa	kilo Dalton
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
PAA	Acrylamid/Bisacrylamid (19:1) Mix
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDZ	benannt nach PSD95, ZO1 und Dlg
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
mRFP	<i>monomeric red fluorescent protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
TEMED	N,N,N,N -Tetramethyl-Ethylendiamin
TRIS	(Hydroxymethyl)-Aminomethanhydrochlorid
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-Indolyl-beta-D-Galactopyranosid

1. Einleitung

1.1 Embryonalentwicklung in *Drosophila*

Am Beginn der Embryonalentwicklung der meisten sich geschlechtlich fortpflanzenden Tiere steht die Befruchtung der Oocyte durch das männliche Spermium. Aus der befruchteten Eizelle entsteht in den sogenannten Furchungsteilungen zunächst eine Vielzahl von Zellen, die schließlich die Blastula bilden. Diese wiederum gliedert sich häufig in eine einschichtige, epithelartige Zellhülle, das Blastoderm, das einen dottergefüllten Innenraum, das Blastocoel, umschließt. Während der dann folgenden Gastrulation werden die drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm angelegt, aus denen während der anschließenden Organogenese alle inneren und äußeren Organe und Gewebe des vollständig entwickelten Tieres hervorgehen.

Dieses Entwicklungsmodell findet sich im gesamten Tierreich von den Schwämmen bis zu den Wirbeltieren. Auch die Embryogenese von *Drosophila melanogaster* folgt diesem Prinzip (Abb.1.1). Nach Befruchtung und Verschmelzung von männlichem und weiblichem Vorkern beginnen im Inneren des Embryos die Furchungsteilungen (beschrieben in Foe et al., 1993). Eine Besonderheit in *Drosophila* und anderen Insekten ist, daß sich dabei nur die Zellkerne teilen. Es findet keine Zytokinese statt, so daß alle Kernteilungen synchron in einem gemeinsamen Zytoplasma ablaufen. Man spricht deshalb auch von syncytialen Kernteilungen. Nach der 7. Kernteilung beginnt die Mehrzahl der Zellkerne an die Peripherie des Embryos zu wandern (1.1 C), wo sie ab der Interphase von Zyklus 10 das syncytiale Blastoderm bilden (1.1 D). Hier folgen vier weitere Teilungen. Nach Beendigung der letzten der insgesamt 13 Furchungsteilungen pausiert der Zellzyklus und es kommt zur Zellbildung. Dabei werden in einem etwa einstündigen Prozess gleichzeitig etwa 6000 Zellen gebildet. Dieser Vorgang wird auch als Zellularisierung bezeichnet. An seinem Ende steht ein einschichtiges Epithel, das zelluläre Blastoderm (1.1 E). In der anschließenden Gastrulation kommt es zur Invagination von Mesoderm und Endoderm (1.1 F). Daraus bilden sich die inneren Organe der Larve, wie bspw. Darm, Nervensystem und Muskeln. Aus dem Ektoderm gehen z.B. Kutikula, Tracheensystem, Speicheldrüsen u.a. Organe hervor. Die gesamte Embryonalentwicklung dauert ca. 24h und ist mit dem Schlüpfen der Larve abgeschlossen.

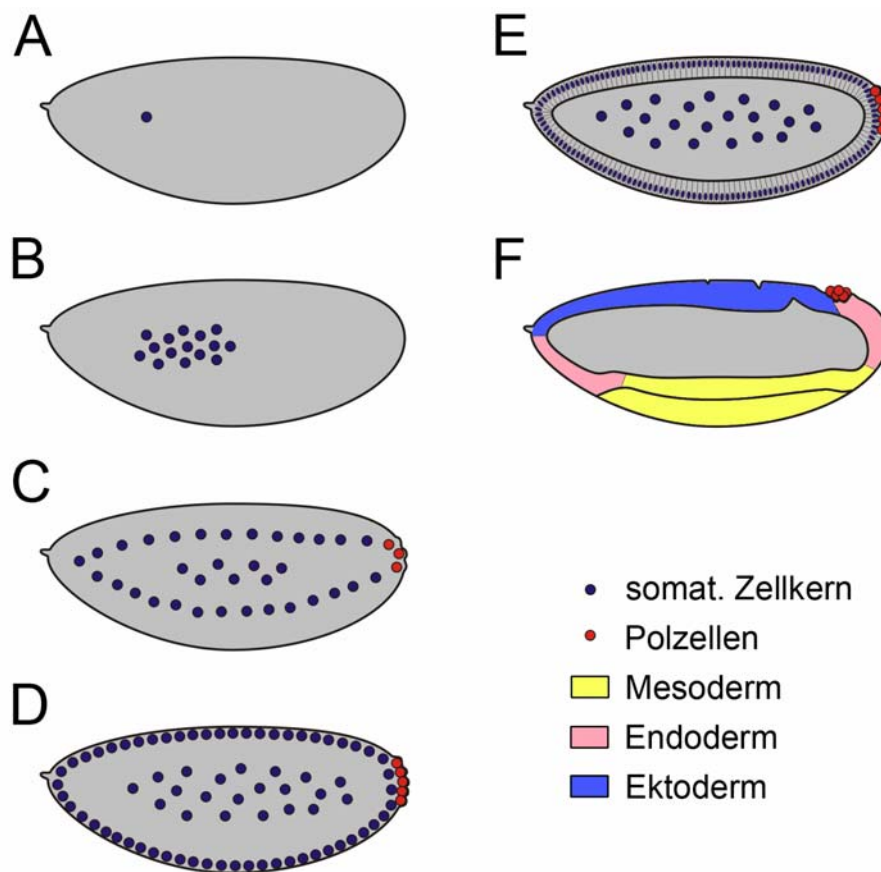


Abbildung 1.1

Schematische Darstellung der frühen Embryonalentwicklung in *Drosophila melanogaster*

A: Fliegenembryo nach der Befruchtung, B: die Kernteilungen 1-6 finden im Inneren des Embryos statt, C: ab Zyklus 7 beginnen die Zellkerne nach außen zu wandern, am posterioren Ende bilden sich die Polzellen (rot) D: syncytiales Blastoderm, E: zelluläres Blastoderm F: Gastrulation

1.2 Zellularisierung und Bildung des Furchungskanals

Im syncytialen Blastoderm sind die meisten Zellkerne in einer Schicht kurz unterhalb der Plasmamembran an der Peripherie des Embryos angeordnet. Über jedem Zellkern befindet sich ein Zentrosomenpaar. Von diesem gehen Mikrotubuli aus, die den darunterliegenden Zellkern in einer korbähnlichen Struktur umschließen und bis in den Dotter reichen (Abb.1.2 A,C). Während der Teilungen 10 bis 13 werden die mitotischen Spindeln durch kurze ca 5 µm in den Embryo ragende temporäre Einstülpungen der äußeren Plasmamembran, den sogenannten Pseudocleavagesfurchen, voneinander getrennt (Foe et al., 1993). Durch diese Membranstrukturen werden benachbarte Spindeln voneinander separiert, so daß sie nicht kollidieren

können (Abb.1.2 B,G). Die Ausbildung der Pseudocleavagefurchen ist mit dem Zellzyklus korreliert. Sie erreichen ihre größte Ausdehnung in der Metaphase und bilden sich während Anaphase und Telophase zurück. Während der syncytialen Teilungen kommt es auch zu einer periodischen Reorganisation des kortikalen Aktinzytoskeletts. In der Interphase ist filamentöses Aktin in Form einer apikalen Kappe organisiert (1.2 A,C und H). Diese Kappen befinden sich apikal zwischen den Kernen und der Plasmamembran. Während der Mitosen lösen sie sich sukzessive auf und es kommt zu einer Anreicherung von f-Aktin an den Pseudocleavagefurchen (B). Nach Austritt aus der Telophase bildet sich über jedem Zellkern eine neue Aktinkappe. Der ganze Prozess wiederholt sich in jeder der vier Teilungen.

Nach Beendigung von Zyklus 13 beginnt in der Interphase von Zyklus 14 die Zellularisierung. Dazu stülpt sich die äußere Plasmamembran unmittelbar nach dem Austritt aus der Telophase in der Mitte zwischen benachbarten Zellkernen ein (Fullilove & Jacobson, 1971; Foe & Alberts, 1983). Die Spitze der invaginierenden Membran bildet eine schleifenförmige Membranstruktur, den sogenannten Furchungskanal (D und E). Filamentöses Aktin und Myosin lokalisieren hier und bilden ein hexagonales Netzwerk, von dem man annimmt, daß es in Analogie zum kontraktile Actomyosin-Ring der Zytokinese durch Kontraktion zur Invagination der Furchungskanäle führt. In einem mikrotubuliabhängigen Prozess wandern diese Kanäle dann in etwa einer Stunde in vier verschiedenen Phasen ca 35 µm ins Innere des Embryos (Lecuit et al, 2002). Dabei kommt es zu einer etwa 20-fachen Zunahme der Membranoberfläche und zur Ausbildung unterschiedlicher Membrandomänen (Abb.1.2 J). Phase I dauert etwa 10 Minuten. Hier bildet sich der Furchungskanal, ohne das eine nennenswerte Invagination der Plasmamembran zu beobachten ist. Darüber hinaus beginnen sich die Zellkerne entlang ihrer apiko-basalen Achsen zu verlängern. Die nächsten drei Phasen dauern jeweils ca. 20 Minuten. In ihnen wandern die Furchungskanäle mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten ins Innere des Embryos. In Phase II verläuft der Invaginationsprozess sehr langsam. Die Elongation der Zellkerne stoppt. In Phase III wandert die Membranfront bis zu den basalen Enden der verlängerten Zellkerne, um dann in Phase IV den Einwanderungsprozess mit doppelter Geschwindigkeit abzuschließen (Lecuit et al, 2002). Die Phasen I-III werden oft zusammengefaßt und auch als langsame Phase

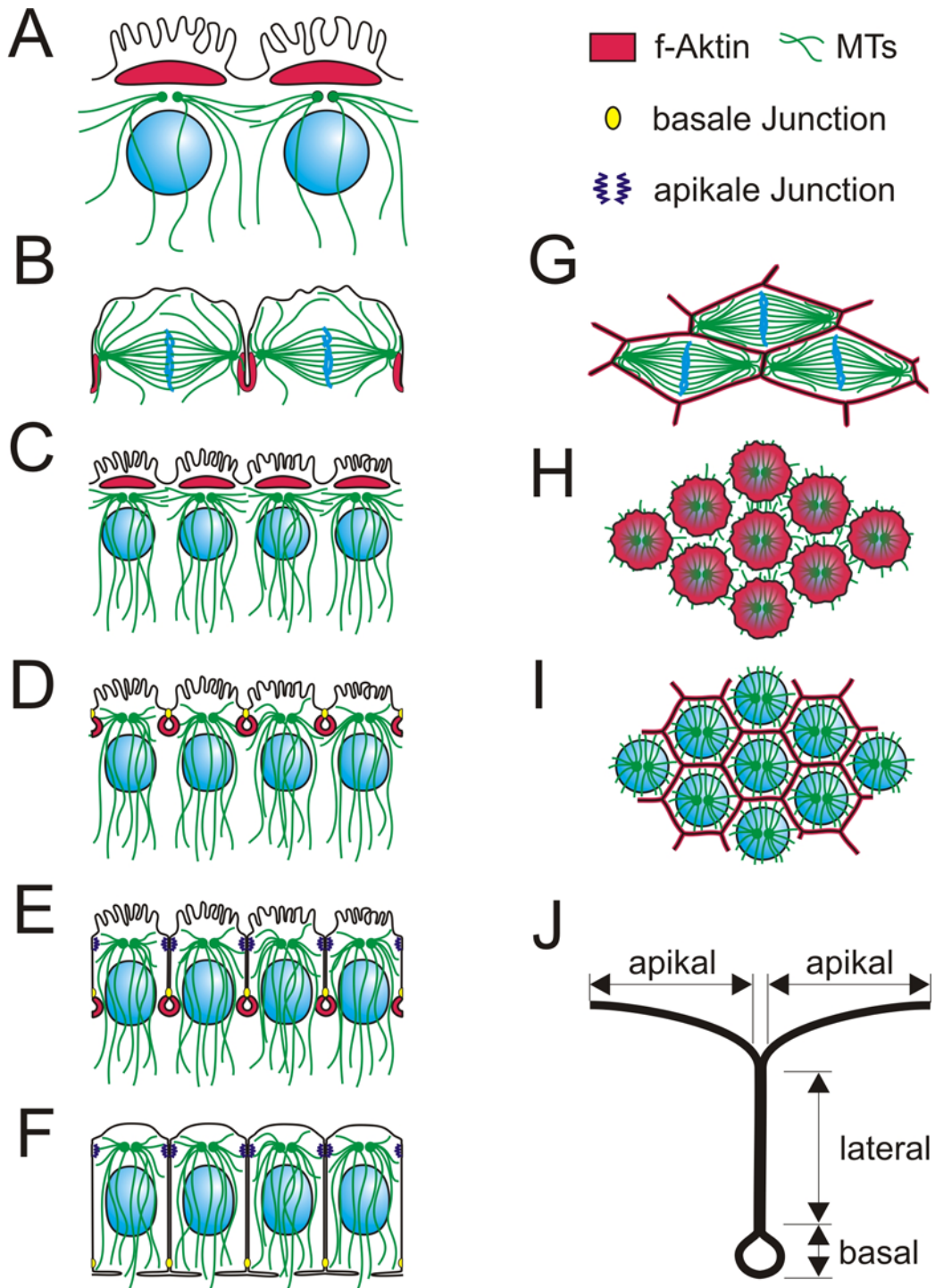


Abbildung 1.2:

Schematische Darstellung der Furchungskanalbildung

linke Seite: dargestellt sind (A): Interphase von Zyklus 13, (B): Mitose 13 mit den Pseudocleavagefurchen, (C): Beginn der Zellularisierung in Interphase von Zyklus 14, (D): Furchungskanalbildung, (E und F): Einwanderung der Membran (schnelle Phase), Die Zellularisierung wird durch Schließen der basalen Ende der Zellen (F) abgeschlossen. rechte Seite (G,H,I): für B, C und D ist jeweils die Oberflächenansicht dargestellt, zu sehen sind die mitotischen Spindeln mit den Pseudocleavagefurchen (G) und die hexagonale Membrananordnung (I). (J): Position und Bezeichnung der verschiedenen Membrandomänen.

bezeichnet, während man Phase IV häufig als schnelle Phase bezeichnet. Nachdem die Furchungskanäle das basale Ende der Zellkerne passiert haben, beginnen sie sich seitlich zu verbreitern, bis alle Kerne nahezu vollständig von Membran umschlossen sind. Auf diese Weise entsteht das zelluläre Blastoderm.

1.3 Bedeutung des Zytoskeletts für die Zellularisierung

Das Zytoskelett ist essentiell für jede lebende Zelle. Es beeinflusst ihre Form und Motilität, stabilisiert und formt Organellen, regelt den intrazellulären Transport von Proteinen und ermöglicht die Zellteilung. Die Rolle des Zytoskeletts während der syntyialen Teilungen und der Zellularisierung ist im *Drosophila* Embryo mit Hilfe spezifischer Inhibitoren untersucht worden (Foe & Alberts, 1983; Foe et al., 1993).

Werden die Mikrotubuli in Embryonen am Beginn von Zyklus 14 durch Injektion von Colcemid zerstört, stoppt die Einwanderung der Plasmamembran. Injiziert man das Colcemid hingegen am Beginn der schnellen Phase, ist der Invaginationsprozess nicht betroffen. Während der schnellen Phase verschwinden die Mikrovilli der apikalen Membranregion. Aus diesen und anderen Beobachtungen (Lecuit & Wieschaus, 2000) hat man geschlußfolgert, daß während der ersten langsamen Phase der Zellularisierung die Invagination hauptsächlich durch die Insertion neuer Membran vorangetrieben wird. Die damit verbundenen Membrantransportprozesse sind mikrotubuliabhängig. In der schnellen Phase erfolgt die Invagination unabhängig von Mikrotubuli durch Ausfalten der apikalen Membranstrukturen. Zerstört man die Mikrofilamente am Beginn von Zyklus 14 durch Injektion von Cytochalasin B, stoppt die Membraninvagination und es kommt zu einer eventuellen Retraktion der Plasmamembran. Darüber hinaus verlieren die Zellkerne ihre reguläre Ausrichtung senkrecht zur Zellmembran und beginnen sich zum Teil zu drehen. Es wird vermutet, daß kortikales Aktin über eine Interaktion mit den von den Zentrosomen ausgehenden astralen Mikrotubuli für eine Verankerung der Zellkerne an der Peripherie des Embryos sorgt (Foe et al., 1993).

1.4 Genetische Kontrolle der Zellularisierung

1.4.1 zygotische Faktoren

Embryonen, denen das X-Chromosom fehlt, zeigen Defekte in der Zellularisierung (Poulsen, 1940; Scriba, 1964; Wieschaus & Sweeton, 1988). Mit Hilfe genetischer Kartierung konnte *nullo* als das dafür verantwortliche Gen identifiziert werden (Rose & Wieschaus, 1992). Der Phänotyp von *nullo* Embryonen zeigt die charakteristischen Merkmale einer Reihe von Zellularisierungsmutanten. Diese zeichnen sich durch das Auftreten von Lücken im ansonsten regulären hexagonalen Muster der invaginierenden Membran (siehe Abb.1.2 I) aus. Ursache hierfür ist, daß es zu Störungen bei der Invagination der Plasmamembran zwischen benachbarten Zellkernen kommt. Diese Störungen treten jedoch nur an einigen Stellen auf. Im Ergebnis entstehen multinukleäre Zellen. Abgesehen von diesen Fehlstellen, läuft die Zellularisierung aber mit normaler Kinetik ab.

Bei dem Genprodukt von *nullo* handelt es sich um ein nicht konserviertes Protein ohne bekannte funktionelle Domänen. Der Phänotyp von *nullo* Embryonen läßt auf eine stabilisierende Funktion des Proteins bei der Ausbildung des Aktin-Myosin-Netzwerkes am Beginn der Zellularisierung schließen (Simpson & Wieschaus, 1990). Mit Hilfe von Antikörperfärbungen konnte gezeigt werden, daß das Protein am Furchungskanal lokalisiert (Postner & Wieschaus, 1994). Neueste Hinweise legen für *nullo* eine regulatorische Funktion bei lokalen Endozytoseprozessen nahe (Sokac & Wieschaus, in Vorbereitung). Demnach scheint *nullo* über aktinmodulierende Eigenschaften spezifisch die Abschnürung von Endozytosevesikeln am Furchungskanal zu kontrollieren. Bei Verlust von *nullo* kommt es so zu Defekten in der polarisierten Lokalisation verschiedener membranassoziierter Proteine.

In *serendipity- α* (*sry- α*) Embryonen läßt sich ein ähnlicher Phänotyp beobachten wie in *nullo* Mutanten. Auch hier entstehen multinukleäre Zellen (Merill et al., 1988; Schweisguth et al., 1990). Der Anteil von Kernen in solchen multinukleären Zellen ist jedoch geringer als bei *nullo*. Antikörperfärbungen gegen das Sry- α Protein zeigen eine Lokalisation am Furchungskanal und entlang der basolateralen Membran (Postner & Wieschaus, 1994; Schweisguth et al., 1990). In *nullo* Embryonen ist die Lokalisation von Sry- α stark beeinträchtigt. Man geht deshalb davon aus, daß beide Proteine im selben Signalweg wirken, wobei sich *nullo* epistatisch gegenüber *sry- α*

verhält. Bei dem von *sry- α* codierten Protein handelt es sich um ein nicht konserviertes Protein mit unbekannter Aminosäuresequenz. Sowohl über die molekulare Funktionsweise von Nullo, als auch über die von *Sry- α* ist wenig bekannt. Man hat jedoch in *nullo* Embryonen beobachtet, daß sich die basale Junction, die am Beginn der Zellularisierung unmittelbar über dem Furchungskanal entsteht (siehe Abb.1.2), nicht richtig ausbildet und daß sich Komponenten des Zelladhäsionskomplexes wie Armadillo und E-cadherin stattdessen entlang der gesamten lateralen Membran verteilen (Hunter & Wieschaus, 2000). Die Ausbildung der sich später bildenden apikalen Junction wird nicht beeinflusst, kann aber durch ektopische Expression von *nullo* entlang der gesamten lateralen Membrandomäne in der späten Phase der Zellularisierung, zu einem Zeitpunkt wo das Protein in Wildtypembryonen bereits abgebaut ist, blockiert werden. Aufgrund dieser Beobachtungen hat man für Nullo eine inhibitorische Wirkung für das Clustering von Junction-Komponenten vorgeschlagen, die am Beginn der Zellularisierung die Anreicherung solcher Komponenten im Bereich der basalen Junction erlaubt und nach ausreichend tiefer Invagination der Membran die Ausbildung der zweiten apikalen Junction ermöglicht (Hunter & Wieschaus, 2000).

Auch Bottleneck ist ein nicht konserviertes Protein ohne bekannte funktionelle Domänen. Es lokalisiert am Furchungskanal aber auch entlang der lateralen Membran (Scheijter & Wieschaus, 1993; Padash Barmchi et al., 2005). Auch in *bnk* Embryonen lassen sich multinukleäre Zellen beobachten. Darüber hinaus ziehen sich die invaginierenden Furchungskanäle zu früh am basalen Ende zusammen. Dies geschieht zu einem Zeitpunkt, an dem sie sich noch auf Höhe der Zellkerne befinden. Als Folge dieser vorzeitigen Konstriktion werden die Zellkerne teilweise zusammengeschnürt und nach oben oder unten weggeschoben. Über die detaillierten molekularen Mechanismen, die der Funktion von Bnk zugrunde liegen, weiß man ansonsten wenig. Aufgrund der spezifischen Kolo-kalisation mit f-Aktin ist eine direkte Rolle in der Regulation der Aktindynamik vorgeschlagen worden. (Scheijter & Wieschaus, 1993).

Ein weiteres zygotisches Gen, das eine essentielle Rolle bei der Zellularisierung spielt ist *slam* (*slow as molasses*). Der *slam* Phänotyp unterscheidet sich deutlich von dem, der sich in *nullo*, *sry- α* oder *bnk* Mutanten beobachten läßt. In Embryonen, die defizient für *slam* sind, ist die Kinetik der Membraninvagination gestört (Lecuit et al., 2002). Eine Einwanderung der Membranfront läßt sich nur in Phase IV beobachten.

Wie bereits erwähnt, kommt es während der Zellularisierung zu einer etwa 20-fachen Vergrößerung der Membranoberfläche. Dieses außergewöhnliche Oberflächenwachstum wird durch die polarisierte Insertion von Plasmamembranvesikeln aus zytoplasmatischen Membranreservoirs ermöglicht. Die Insertion erfolgt dabei in Phase I zunächst in die apikale Membrandomäne (siehe Abb.1.2 J) und ab Phase II bevorzugt lateral (Lecuit & Wieschaus, 2000).

Aufgrund der Akkumulation von Transmembranproteinen in vesikelartigen Strukturen im subapikalen Zytoplasma wurden die beobachteten Defekte in *slam* Mutanten auf Störungen in der polarisierten Membraninsertion zurückgeführt. Der apikale Membranbereich ist reich an Mikrovilli und weist in Phase I eine hohe exo- und endocytische Aktivität auf. In *slam* Mutanten ist diese Aktivität reduziert (Lecuit et al., 2002). Das Protein lokalisiert exklusiv am Furchungskanal (Lecuit et al., 2002 und diese Arbeit). Es wurde demnach postuliert, daß Slam an der Ausbildung einer stabilen Membrandomäne im Bereich des späteren Furchungskanals, also zwischen den aktiven apikalen mikrovillihaltigen Membranregionen, beteiligt ist. Wenn das Protein fehlt, ist die Ausbildung dieser unterschiedlichen Membranbereiche und somit auch die polarisierte Insertion von neuer Membran am Beginn der Zellularisierung gestört. Man kann die beobachteten Effekte aber auch dahingehend interpretieren, daß in *slam* Mutanten die Mechanik des Einwanderungsprozesses gestört ist. In EM-Aufnahmen ist eine deutliche Auffaltung der Membran sichtbar (Lecuit et al., 2002). Da das Protein exklusiv am Furchungskanal lokalisiert wäre somit denkbar, daß es an der mikrotubuliabhängigen Einwanderung der Membranfront ins Innere des Embryos beteiligt ist, zumal die initiale Ausbildung der Furchungskanäle prinzipiell stattzufinden scheint (Grosshans et al., 2005).

1.4.2 maternale Faktoren

1.4.2.1 Membrantransport

Auf die Bedeutung der Insertion neuer Membran für die Zellularisierung ist bereits hingewiesen worden. Die endo- und exozytotische Maschinerie der Zelle spielt eine zentrale Rolle für die Struktur und die Dynamik der Plasmamembran. Bei der Endocytose wird Material aus dem extrazellulären Raum durch Abschnürung von Membranvesikeln aufgenommen. Diese Vesikel durchlaufen dann in der Regel

verschiedene endosomale Kompartimente. So fusionieren sie zunächst mit den frühen Endosomen. Ein großer Teil des endozytierten Materials, insbesondere Membranrezeptoren und Lipide gelangen von hier über das Recycling Endosom zurück zur Plasmamembran, wo sie mit Hilfe des sekretorischen Exocyst-Komplexes wieder gezielt eingebaut werden. Andere Bestandteile der frühen Endosomen gelangen in das *trans*-Golgi-Netzwerk oder zum Abbau über die späten Endosomen in die Lysosomen.

Die kleine GTPase Rab11 ist der prominenteste Marker für das Recycling Endosom. In *rab11* Mutanten kommt es zu Defekten bei der Bildung der Pseudocleavagefurchen und des Furchungskanals (Riggs et al., 2003). Ein ganz ähnlicher Phänotyp läßt sich auch in *nuclear fallout* (*nuf*) Embryonen beobachten (Rothwell et al., 1998). Bei Nuf handelt es sich um das *Drosophila* Homolog von Arfophilin, das mit dem Rab11 bindenden Protein Eferin/FIP3 identisch ist. Für Säuger-FIP-Proteine sind Interaktionen mit Arf6, einer weiteren GTPase des Recycling Endosoms, sowie mit Komponenten des Exocyst-Komplexes während der Zytokinese beschrieben worden (Fielding et al, 2005). In *Drosophila* können Nuf und Rab11 über eine konservierte Rab11-Bindedomäne in Nuf miteinander interagieren. Beide Proteine kolokalisieren in Embryonen und S2-Zellen (Riggs et al., 2003 und eigene Beobachtung). Die in Embryonen beobachtete perizentrosomale Lokalisation beider Faktoren hängt jeweils von der Präsenz des anderen ab. Während der Zellularisierung wird Neurotactin, ein Transmembranprotein, über das Rab11 positive Recycling Endosom in die Plasmamembran integriert (Pelissier et al, 2003). Die Lokalisation des membranassoziierten Proteins Dah ist in *nuf* Embryonen stark beeinträchtigt (Rothwell et al., 1999). Die aktive GTP-gebundene Form von Rab11 kann mit Komponenten des Exocyst-Komplexes interagieren (Beronja et al, 2005; Zhang et al, 2004). Dementsprechend kann man davon ausgehen, daß Nuf und Rab11 gemeinsam eine wichtige Rolle bei der dynamischen Reorganisation der Plasmamembran während der Zellularisierung übernehmen.

Ein weiteres essentielles Gen für die Invagination der Membran während der Zellularisierung ist *discontinuous actin hexagon* (*dah*). Dah ist ein peripheres, membranassoziiertes Protein. Es lokalisiert sowohl in vesikelartigen cytoplasmatischen Strukturen, als auch direkt an der Plasmamembran der Pseudocleavagefurchen und des Furchungskanals (Zhang et al., 1996). Dah weist eine schwache Homologie zu Komponenten des Dystrophinkomplexes auf. Dieser

Komplex spielt eine Rolle bei der Verbindung von Aktinzytoskelett und extrazellulärer Matrix insbesondere in Muskelzellen. In einem auf dem *Yeast-Two-Hybrid-System* beruhenden Hochdurchsatz-Interaktions-Screen wurde Nuf als Bindepartner von Dah identifiziert (Giot et al., 2003). Die Lokalisation von Dah wird zudem durch nuf beeinflusst. In *dah* Mutanten gibt es ähnlich wie in *nuf* und *rab11* Embryonen unvollständige Pseudocleavagesfurchen und eine stark gestörte Zellularisierung. Dabei löst sich das hexagonale Membrangitter sukzessive auf. Es ist somit nicht unwahrscheinlich, daß Dah zusammen mit Nuf und Rab11 die Funktion des Recycling Endosoms während der Zellularisierung kontrolliert.

Die Bedeutung der dynamischen Reorganisation der Plasmamembran für die Zellularisierung wird durch Untersuchungen an einer Reihe weiterer Faktoren bestätigt. In Embryonen, die homozygot für ein temperatursensitives Allel des Gens *shibire* sind, kommt es bei restriktiver Temperatur nicht zur Invagination der Plasmamembran in der langsamen Phase. Bei dem von *shibire* codierten Protein handelt es sich um das *Drosophila*-Homolog von Dynamin. Dynamin kontrolliert die Abschnürung und Internalisierung von Vesikeln an der Plasmamembran während der Endozytose und beeinflusst darüber hinaus auch den Vesikelfluß vom Recycling Endosom zur Plasmamembran (van Dam & Stoorvogel, 2002). Die erhöhte Endozytoseaktivität in der apikalen Membranregion am Beginn der Zellularisierung, die sich im Wildtyp beobachten läßt (Lecuit & Wieschaus, 2000), ist in *shibire* Mutanten reduziert (Pelissier et al., 2003). Wird die *shibire*-Genfunktion hingegen am Beginn der schnellen Phase ausgeschaltet, kommt es trotzdem zu einer, wenn auch leicht verlangsamten Invagination der Plasmamembran. Ähnliche Defekte treten in Embryonen nach Injektion einer dominant negativen Variante von Rab5 auf (Pelissier et al., 2003). Rab5 reguliert den Transport von endocytisiertem Material in die frühen Endosomen und beeinflusst so ähnlich wie Dynamin die frühen Funktionen des zellulären Endozytoseapparates.

Eine gestörte Zellularisierung läßt sich auch in Embryonen mit einer hypomorphen Mutation in *Syntaxin1a* beobachten. Dieses Gen codiert für das t-Snare-Protein Syntaxin1 (Burgess et al., 1997). t-Snares sind insbesondere am Andocken von Membranvesikeln an ihre Zielmembran und der anschließenden Membranfusion beteiligt. In *syx1A* Embryonen lassen sich Bereiche beobachten, in denen das hexagonale Aktinringgerüst, das sich normalerweise am Beginn von Zyklus 14 bildet, vollständig fehlt. Eine Invagination der Plasmamembran findet in diesen Regionen

nicht statt. Syntaxine spielen auch eine Rolle bei der Zytokinese in *C.elegans* (Jantsch-Plunger & Glotzer, 1999).

Auch die Funktion von sekretorischen Komponenten für die Zellularisierung ist untersucht worden. So spielt beispielsweise der mikrotubuliabhängige basal-apikale Transport von Golgi Vesikeln eine Rolle bei der Invagination der Membranfront während der Zellularisierung. Dies konnte sowohl durch die Injektion von Antikörpern gegen das Golgin Lava Lamp, als auch nach Injektion von Brefeldin A gezeigt werden (Sisson et al., 2000). Es wird vermutet, daß Lava Lamp über eine Assoziation mit dem Motorprotein Dynein den apikalen Transport von Golgimembranen vermittelt. Nach Injektion eines dominant negativen Proteinfragmentes, das für die Bindung an Dynein verantwortlich ist, wird der apikale Transport des Golgi blockiert, die Invagination der Plasmamembran wird verzögert und es bilden sich Lücken im hexagonalen Membrangitter, was zur Bildung von multinukleären Zellen führt (Papoulas et al., 2005).

Die Funktion des Exocyst-Komplexes während der Zellularisierung ist bisher nicht untersucht worden. Dieser konservierte Proteinkomplex ist ein essentieller Teil des zellulären Exozytoseapparates und vermittelt die Insertion sekretorischer Vesikel in die Plasmamembran. In einer Reihe von Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, daß Exocystkomponenten auch in *Drosophila* essentiell für den gerichteten Membrantransport der Exozytose sind (Murthy & Schwarz, 2004; Beronja et al., 2005; Langevin et al., 2005). Während der Zellularisierung findet intensive Exozytose statt (Lecuit & Wieschaus, 2000), so daß man davon auszugehen kann, daß der Exocyst-Komplex auch hier eine wichtige Rolle spielt.

1.4.2.2 *RhoGEF2, Rho1* und *Diaphanous*

Zur Familie der Rho-Proteine gehören unter anderem Rho, Rac und Cdc42. Die durch diese Faktoren induzierten Veränderungen im Zytoskelett der Zelle werden von einer Reihe von Effektorproteinen vermittelt. Zu den Effektoren von Rho1 gehören beispielsweise ROCK (*Rho kinase*), eine Kinase, die die Phosphorylierung der regulatorischen Untereinheit von Myosin II reguliert (Amano et al., 1996), die Citron Kinase und Diaphanous (Dia). Dia gehört zur Familie der Formine. Mitglieder dieser Proteinfamilie können die Verlängerung von Aktinfilamenten an ihren Plus-Enden vermitteln (Wallar & Alberts, 2003). Darüber hinaus hat Dia auch einen Einfluß auf

die Stabilität von Mikrotubuli (Ishizaki et al., 2001; Palazzo et al., 2001; Wen et al., 2004). Die Signalwege, die zur Aktivierung von Rho-Proteinen führen, werden oft von Zelloberflächenrezeptoren als Reaktion auf externe Stimuli initiiert. Rho-GTPasen übernehmen auch eine essentielle Funktion bei der Regulation der Aktindynamik im frühen *Drosophila*-Embryo. Durch Injektionsexperimente mit C3-Exoenzym, einem spezifischen Rho-Inhibitor, sowie konstitutiv aktiven bzw. dominant negativen Varianten der Rho-Proteine Rho, Rac und Cdc42 konnte gezeigt werden, daß das Aktinzytoskelett vor und während der Zellularisierung durch Rho1 und Cdc42, nicht aber durch Rac, reguliert wird (Crawford et al., 1998). Die Inaktivierung von Rho1 führt dabei zu schweren Störungen im Aktinzytoskelett. Ähnliche Effekte sind nach Überaktivierung von Cdc42 zu beobachten. Die präzise zeitliche und räumliche Regulation der Aktivitäten einzelner Rho-Proteine ist somit essentiell für die während der Embryogenese ablaufenden Entwicklungsprozesse.

In unserem Labor konnte mit RhoGEF2 ein Protein identifiziert werden, das an der Regulation von Rho während der Zellularisierung beteiligt ist. RhoGEF2 ist ein GTP-Austauschfaktor mit mehreren funktionellen Domänen (Abb.1.3). In biochemischen Experimenten konnte gezeigt werden, daß RhoGEF2 *in vitro* spezifisch die GTPase-Aktivität von Rho1 stimuliert (Grosshans et al., 2005). Darüber hinaus konnten wir auch zeigen, daß durch die Zugabe der aktiven Form von Rho1 die Aktivität von Dia in einem *in vitro* Aktinpolymerisationsassay erhöht werden kann. Für maternales RhoGEF2 defiziente Embryonen zeigen einen starken Gastrulationsphänotyp. Dabei ist insbesondere die apikale Konstriktion der Zellen des prospektiven Mesoderms beeinträchtigt. (Barett et al., 1997; Häcker & Perrimon, 1998). Neben der offensichtlichen Funktion in der Gastrulation zeigen *RhoGEF2* Mutanten auch Defekte in der Zellularisierung. So kommt es an einigen Stellen zu Problemen bei der Bildung der Furchungskanäle, was zum Auftreten multinukleärer Zellen führt. Darüber hinaus ist für RhoGEF2 eine Rolle bei der basalen Konstriktion der Zellen in der späten Zellularisierung vorgeschlagen worden (Padash Barmchi et al., 2005). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, daß die Lokalisation von Bnk am Furchungskanal in *RhoGEF2* Mutanten speziell in der späten Zellularisierung stark beeinträchtigt ist. Zudem kann durch ektopische Expression von *RhoGEF2* zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt Bnk rekrutiert werden, was auf eine direkte oder indirekte Interaktion beider Proteine hinweisen könnte. In *RhoGEF2/bnk* Doppelmutanten erfolgt die initiale Bildung des hexagonalen Aktinratters ähnlich wie

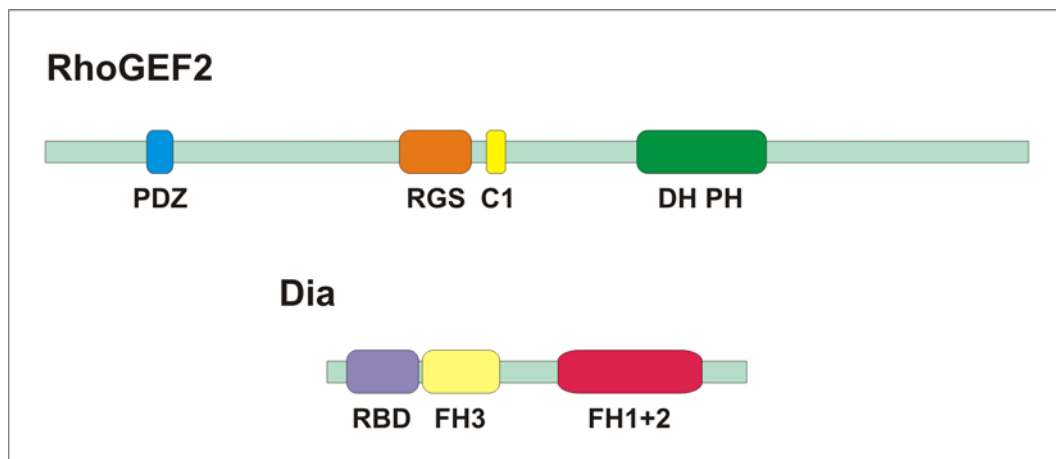


Abbildung 1.3

Proteinstruktur von RhoGEF2 und Diaphanous

PDZ - benannt nach PSD95, ZO1 und Dlg; RGS - *regulator of G-protein signaling*; C1 - *Protein kinase C conserved region 1*; DH PH - *Dbl/Pleckstrin homology domain*; RBD - *Rho binding domain*; FH1-3 - *Formin homology domain*

in *RhoGEF2* Embryonen. Im weiteren Verlauf der Membraninvagination kommt es jedoch zu einer zunehmenden Destabilisierung und schließlich zu einem kompletten Verlust der Integrität des Aktinnetzwerkes (Padash Barmchi et al., 2005).

Der Phänotyp von *RhoGEF2* Embryonen in der Zellularisierung ähnelt dem von *dia* Embryonen. Mit Hilfe von Antikörperfärbungen konnte nachgewiesen werden, daß beide Proteine am Furchungskanal kolokalisieren und dort auch mit Rho1 überlappen. Die Lokalisation von Rho1 und auch die von Dia hängt während der Initiationsphase der Zellularisierung zum Teil von RhoGEF2 ab (Grosshans et al., 2005; Padash-Barmchi et al., 2005). Aufgrund dieser Beobachtungen und der Ergebnisse der bereits erwähnten biochemischen Experimente wurde von uns ein Modell vorgeschlagen, nach dem die Lokalisation von RhoGEF2 am Furchungskanal zur Rho-abhängigen Aktivierung von Dia und somit so einer Aktinpolymerisierung führt, was auch durch die Beobachtung bestätigt wird, das in *RhoGEF2* und *dia* Mutanten die Aktinlevel am Furchungskanal reduziert sind. Somit spielt die Polymerisierung von Aktin am Furchungskanal eine wichtige Rolle für die Ausbildung dieser Membranstruktur.

1.4.2.3 *Abelson und Enabled*

Bei Enabled (Ena) handelt es sich um das *Drosophila* Homolog der Ena/VASP Proteinfamilie, die die Aktinpolymerisierung kontrollieren, indem sie an freie Enden von wachsenden Aktinfilamenten binden (Bear et al., 2002). Es kommt so zur Konkurrenz mit dem Capping Protein, das nach Bindung an freie Enden eine weitere Verlängerung des Filaments blockiert. Die Bindung von Enabled hat einen gegenteiligen Effekt. Es erlaubt die Anlagerung weiterer dimerer Profilin/Aktin-Einheiten und wirkt so als Aktivator der Polymerisation langer unverzweigter Aktinfilamente. Während der Zellularisierung wird Enabled von der Kinase Abelson (Abl) reguliert (Grevengoed et al., 2003). Abelson lokalisiert im syncytialen Blastoderm an den Aktinkappen und den Pseudocleavagefurchen. Während der Zellularisierung findet man das Protein vor allem im Bereich der apikalen Junction und zu einem geringen Anteil auch am Furchungskanal (Fox & Peifer, 2007). Es wird vermutet, daß Abl die Lokalisation von Ena über einen unbekanntem Mechanismus negativ reguliert. In *abl* Mutanten kommt es während der Zellularisierung zu einer ektopischen Akkumulation von Ena im apikalen Bereich der sich bildenden Zellen (Grevengoed et al., 2003). Dies führt zu einer Anreicherung ektopischer Aktinstrukturen in dieser Region und einer gleichzeitigen Reduzierung der Aktinlevel am Furchungskanal. Interessanterweise kommt es in *abl* Embryonen neben der Akkumulation von apikalem Aktin auch zu Defekten in der Furchungskanalbildung und zum Auftreten multinukleärer Zellen. Im Gegensatz dazu scheint Ena keine Rolle bei der Zellularisierung zu spielen, da zum einen das Ena Protein in Wildtypembryonen keine Lokalisation am Furchungskanal zeigt (Grevengroed et al., 2003) und zum anderen die Etablierung des hexagonalen Aktinratters in *ena* defizienten Embryonen nicht beeinträchtigt ist (Fox & Peifer, 2007).

Trotz reduzierter Level ist f-Aktin sowohl in *RhoGEF2* als auch in *dia* Mutanten am Furchungskanal vorhanden, was die Existenz redundanter Mechanismen für die Kontrolle der Aktinpolymerisation nahelegt. Eine hypomorphe Mutation in einer Untereinheit des Arp2/3-Komplexes (Arp1c) führt zu Störungen in der Aktindynamik während der syncytialen Teilungen 10-13. Die Aktinkappen der Interphase bilden sich ähnlich wie im Wildtyp unmittelbar nach dem Austritt aus der Telophase, bleiben aber kleiner und werden an ihrem basalen Rand nicht verbreitert. Im Einklang damit lokalisieren Komponenten des Arp2/3 Komplexes wie Arp3 und Arp2c vornehmlich

am basalen Rand der Aktinkappen, jedoch nicht am Furchungskanal oder entlang der lateralen Membran während der Zellularisierung (Stevenson et al., 2002). Auch die Bildung der Pseudocleavage-Furchen ist beeinträchtigt. Die Zellularisierung läuft in diesen Mutanten normal ab. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß dies durch die zygotische Expression des paternalen *arp1c* Wildtypallels ermöglicht wird. Die Arp2/3 vermittelte Aktinpolymerisierung scheint aber nur eine untergeordnete Rolle bei der Organisation von f-Aktin am Furchungskanal zu spielen.

1.5 Zellularisierung und Zytokinese

Die Zellularisierung im *Drosophila*-Embryo wird oft als Sonderform der Zytokinese betrachtet (Mazumdar & Mazumdar, 2003). In der Tat gibt es viele Ähnlichkeiten zwischen beiden Prozessen. So spielen viele der an der Zytokinese beteiligten Faktoren auch eine Rolle während der Zellularisierung. Dennoch ist klar, daß es auch deutliche Unterschiede gibt. So beginnt die Zellularisierung in der Interphase, während die Teilungsfurchen der Zytokinese sich während der Anaphase in der Mitose bilden. Zudem werden während der Zellularisierung anders als bei der regulären Zytokinese nicht einfach nur neue Zellen gebildet, sondern es entsteht ein polarisiertes Epithel. Sichtbar wird das beispielsweise durch die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten. So bildet sich durch die Akkumulation von E-cadherin, Armadillo (*Drosophila* Homolog von β -catenin) und α -catenin die sogenannte basale Adhärenzverbindung oder auch basale Junction (Abb.1.2 D) apikal vom Furchungskanal. Etwas später kommt es zur Bildung einer zweiten Zell-Junction im apikalen Bereich der Zellen (Abb.1.2 E). Insofern ist die Zellularisierung deutlich komplexer als die Zytokinese einer symmetrischen Zellteilung. Auch die Initiationsphase ist in beiden Prozessen unterschiedlich. Dabei ist das grundlegende Problem in beiden Fällen, daß durch ein Signal die Invagination der Plasmamembran zur richtigen Zeit und am richtigen Ort initiiert werden muß. Bei der regulären Zytokinese ist es in den letzten Jahren gelungen, einige der daran beteiligten Faktoren zu identifizieren (zusammengefaßt in D'Avino et al., 2005). Dabei wurde auch klar, daß der Ablauf der Zytokinese, obwohl viele Schlüsselkomponenten des Zytokineseapparates konserviert sind, in unterschiedlichen biologischen Systemen im Detail durchaus variieren kann. In *Drosophila* spielt der Centralspindlin-Komplex eine wichtige Rolle bei der Initiation der Zytokinese. (Abb.1.3). Dieser Komplex

besteht aus dem Plusend-gerichteten Motorprotein Pavarotti (Pav) und dem Rac Inhibitor RacGAP50C (*tumbleweed*). Der Komplex lokalisiert während der Anaphase an der sogenannten zentralen Spindel, einem Bereich der mitotischen Spindel, in dem sich Mikrotubuli der beiden gegenüberliegenden Spindelpole überlappen. Darüber hinaus findet man ihn auch in der Nähe der Plusenden astraler Mikrotubuli im Bereich des äquatorialen Zellkortex. Die Motoraktivität und die Mikrotubuliassoziation von Centralspindlin wird zellzyklusabhängig von den Kinasen Polo und

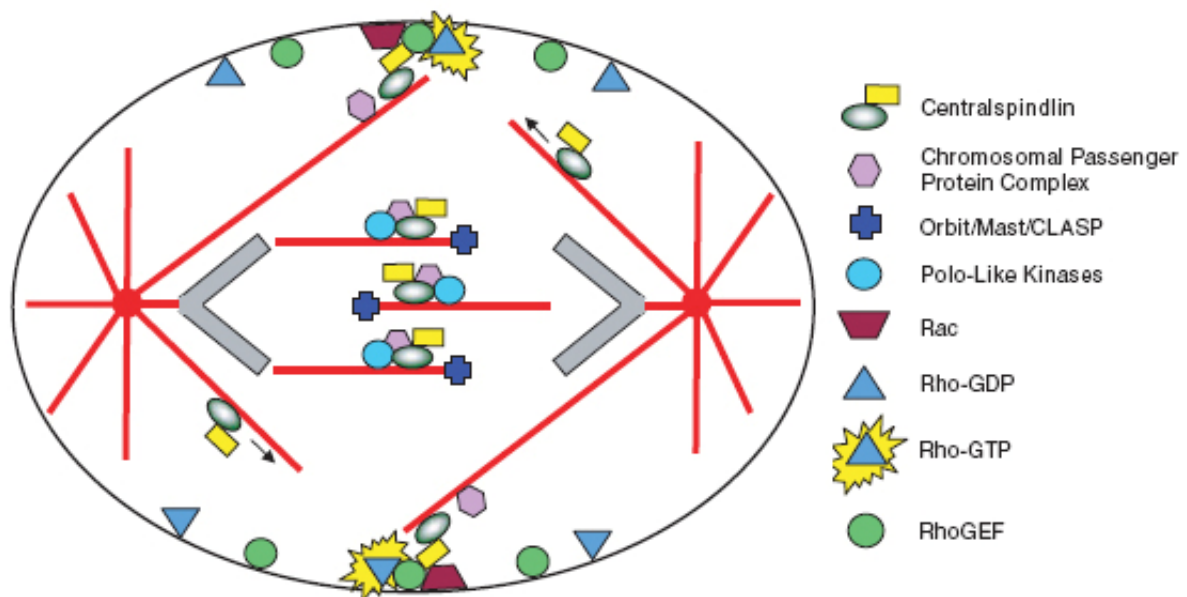


Abbildung 1.3:

Modell zur Initiation der Zytokinese durch den Centralspindlin-Komplex (D'Avino et al., 2005)

Der Centralspindlin-Komplex besteht aus einem Motorprotein und einem RacGAP-Faktor und wird entlang von astralen Mikrotubuli an den Zellkortex transportiert.

CDK-1 reguliert. Nach dem Eintritt in die Anaphase kommt es zu einer Akkumulation des Komplexes am äquatorialen Zellkortex. Dies passiert zunächst unter Beteiligung der astralen Mikrotubuli. Am Zellkortex inhibiert die RacGAP Untereinheit die Aktivität von Rac und interagiert mit dem RhoGEF Pebble (Pbl). Dies führt zu einer lokalen Aktivierung von Rho1. Rho1 sorgt über Aktivierung seiner Effektorproteine Rho-Kinase und Dia und eventuell auch über die Aktivierung der Citron Kinase (codiert vom *Drosophila* Gen *sticky*) für die Assemblierung eines kontraktilen Rings. Dieser besteht aus Mikrofilamenten, Myosin II, Septinen und Annilin und ist für die Ingression der Teilungsfurche verantwortlich. Es ist unklar, ob all diese Proteine auch eine Rolle bei der Initiation der Zellularisierung spielen. Um dies zu klären, müßte man die maternale Komponente dieser Gene durch die Induzierung von

Keimbahnklonen ausschalten. Aufgrund der essentiellen Funktion von Faktoren wie Pav, RacGap50C und Pbl für die reguläre Zytokinese und aufgrund der Tatsache, daß während der *Drosophila* Oogenese in den Keimbahnzellen Zellteilungen ablaufen ist es aber sehr wahrscheinlich, daß Fliegen, mit für die genannten Faktoren homozygot mutanter Keimbahn, keine Eier legen und die entsprechenden Genfunktionen in der frühen Embryonalentwicklung so nicht untersucht werden können. Pbl lokalisiert ähnlich wie Pav während der Interphase hauptsächlich im Zellkern (Prokopenko et al., 1999; Minestrini et al.; 2003). Pav kann während der Zellularisierung jedoch auch am Furchungskanal detektiert werden. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, das Komponenten, die essentiell für die Initiation der Zytokinese sind, in ähnlicher Weise auch an der Initiation der Zellularisierung beteiligt sind. Im umgekehrten Fall weiß man jedoch, daß viele Faktoren, die eine Rolle in der Zellularisierung spielen, keine Funktion in der regulären Zytokinese haben. So zeigen bspw. Mutationen in *RhoGEF2*, *nullo*, *sry- α* , *bnk*, *dah* und *nuf* keine Zytokinesedefekte. Für *dia*, *abl* und *rab11* sind hingegen essentielle Funktionen in der Zytokinese beschrieben (Castrillon & Wasserman, 1994; Prokopenko et al., 2007; Giansanti et al., 2007). *Annilin* und *peanut*-Mutanten zeigen Defekte in der späten Zellularisierung (Field et al., 2005; Adam et al., 2000). Myosin II ist nicht essentiell für den Invaginationsprozess während der Zellularisierung, wird aber für den basalen Verschuß der Zellen benötigt. (Royou et al., 2004).

Zusammenfassend kann man feststellen, daß sich die Regulation von Zellularisierung und Zytokinese trotz unzweifelhaft vorhandener mechanistischer Gemeinsamkeiten deutlich unterscheidet. Entsprechend sollte es durch die Untersuchung der bei der Zellularisierung ablaufenden Prozesse möglich sein, neue Erkenntnisse in grundlegende zellbiologische Abläufe und ihre Regulation während der Entwicklung zu gewinnen.

1.6 Lokale Rho-Aktivierung durch subzelluläre Kompartimentierung regulatorischer Faktoren

Die zentrale Rolle von GTPasen der Rho-Familie in der Regulation des Aktin-Zytoskeletts ist bereits vielfach untersucht worden (zusammengefasst in Burrige & Wennerberg, 2004). Diese Proteine wechseln zwischen einem aktiven, GTP-gebundenen und einem inaktiven GDP-gebundenen Konformationszustand. Die

Aktivität wird dabei von regulatorischen Proteinen, sogenannten GEFs, GAPs und GDIs kontrolliert. GEFs (*Guanin nucleotid exchange factors*) katalysieren den Austausch von gebundenem GDP durch freies GTP und aktivieren so die GTPase. GAPs (*GTPase-activating proteins*) hingegen erhöhen die Hydrolyserate des gebundenen GTPs und inaktivieren so das Protein. GDIs (*Guanine nucleotide dissociation inhibitors*) binden an Rho-Proteine und inhibieren den Nukleotid-austausch und führen so ebenfalls zu einer Inaktivierung der GTPase.

RhoGTPasen lokalisieren durch eine C-terminale Prenylierung in erster Linie an Membranen. Dort wird ihre Aktivität durch die Lokalisation der beschriebenen regulatorischen Proteine bestimmt. Die subzelluläre Verteilung dieser Regulatoren ist somit entscheidend für viele Rho-abhängige Prozesse. So wird während der Zytokinese durch die spezifische Lokalisation von Pebble und RacGAP50C am Zellkortex der äquatorialen Teilungsebene eine lokale Rho Aktivierung bei gleichzeitiger Inaktivierung von Rac erreicht. Die apikale und somit asymmetrische Aktivierung von Rho1 in den epithelialen Vorläuferzellen der posterioren Atmungsorgane (*Spiracles*) des ersten *Drosophila*-Larvenstadiums wird zum Teil durch die differentielle Lokalisierung der beiden GEFs RhoGEF2 und RhoGEF64C (apikal) und des GAP-Proteins RhoGAP Cv-c (basolateral) vermittelt (Simões et al., 2006). In differenzierten humanen HL60 Zellen, wird durch die Lokalisation von PDZRhoGEF, einem dem RhoGEF2 aus *Drosophila* homologen Protein, die Aktivierung von RhoA an der kontraktiven Rückseite dieser Zellen vermittelt, was zu ihrer Polarisierung beiträgt (Wong et al., 2007). Wie die oftmals polare Lokalisation von Rho-Regulatoren erreicht wird, ist in vielen Fällen weitgehend unklar. Für die Zytokinese (siehe vorherigen Abschnitt) ist zumindest für RacGAP50C ein aktiver Transport an den Zellkortex durch ein mikrotubuliabhängigen Motor (Pav) entlang astraler Mikrotubuli vorgeschlagen worden. Im Fall von PDZRhoGEF weiß man lediglich, daß die PDZ-Domäne für die korrekte Proteinlokalisierung verantwortlich ist. Für RhoGEF2 konnte in *Drosophila* S2-Zellen eine Assoziation mit den Plusenden von Mikrotubuli beobachtet werden, die durch Aktivierung des G_{α} -Proteins Concertina vermutlich über eine Interaktion mit der RGS-Domäne von RhoGEF2 aufgehoben werden kann (Rogers et al., 2004). Dementsprechend ist vorgeschlagen worden, daß RhoGEF2 beispielsweise während der apikalen Konstriktion der prospektiven Mesodermzellen in der Gastrulation über die Mikrotubuliassoziation an den Zellkortex gelangt, apikal durch Interaktion mit aktiviertem Concertina an der

Membran verankert wird und dort die lokale Aktivierung von Rho1 vermittelt (Rogers et al., 2004; Kölsch et al., 2007).

1.7 Ziel dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Rolle von RhoGEF2 am Beginn der Zellularisierung genauer charakterisiert werden. Da RhoGEF2 die Aktivität von Rho1 und Dia am Furchungskanal kontrolliert, sollte versucht werden, die Mechanismen zu ergründen, die zur Lokalisation von RhoGEF2 am Furchungskanal führen, um so die lokale Rho-Aktivierung besser zu verstehen.

Darüber hinaus sollte die Dynamik der Furchungskanalbildung mit Hilfe verschiedener fluoreszenzmarkierter Marker sowohl im Wildtyp, als auch in mutanten Embryonen beobachtet werden. Dabei ging es insbesondere um die Frage wie und wodurch das hexagonale Muster, dem die Einwanderung der Plasmamembran folgt, festgelegt wird.

2. Materialien

2.1 Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien von den Firmen Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Invitrogen (Carlsbad, USA), AppliChem GmbH (Darmstadt), Merck (Darmstadt) und Roth (Karsruhe) bezogen.

2.2 Enzyme

- Restriktionsenzyme Fermentas (St. Leon-Rot), Roche (Mannheim),
New England Biolabs (Ipswich, USA)
- Shrimp Alkaline Phosphatase Fermentas
- Vent DNA-Polymerase New England Biolabs
- Pfu DNA-Polymerase Stratagene (La Jolla, USA)
- T4 DNA Ligase Fermentas

2.3 Radioaktive Substanzen

- Redivue L-[³⁵S] Methionine (in vitro translation grade), (1000Ci/mmol, 15mCi/ml) -
GE Healthcare/Amersham (Chalfont St. Giles, Großbritannien).

2.4 Oligonukleotide

Die nachfolgend aufgelisteten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) geliefert.

CW1a: ATA CTC GAG ACC GGT AAA AAT GGC CTC CTC CGA GGA C
CW1b: AGC TAA GCT TGG CGC CGG TGG AGT GGC G
CW5a: GCA GAA TTC AAT GAC CCA TCA ATC AAA AAA CG
CW5b: ATC CTC GAG TTA AGG CGG TAG CGG TGG TGG
CW5c: TAC GCT CGA GTT AGT CCA CCG GCT GTG GCC C
CW5e: TGC AGA ATT CCA ACG GCA GCA TAA TGG GCG
CW6a: GCA GAA TTC ACG CTT GCC TGG CAT GAT G

CW6b: ATC CTC GAG TTA TGG ATC AGA GGT CTT GCG G
CW7a: GCA TCT AGA AAG CTT GTC GTC GCG TCC C
CW7b: ACC TCT AGA TTA CTT CTG AAT GGG TTC GCC
CW8a: GCA GAA TTC ATA TTC GGC GAA TGG GAC GG
CW8b: ATC CTC GAG TTA TTC CTC ATC CTC AGT GCT AG
CW17B: GCC TGC AAT CTC CGC TGC
CW21A: GCA GGA TCC ATG ACG CCG AGT ACG CCA AGC C
CW21B: TCG GGA TCC GAG AAT GGG TGT CGA GGG CG
CW22A: TAG CCG ATC GAT CGC CGA GTA CGC CAA GCC
CW22B: GCA AGT ATC GAT GAA TGG GTG TCG AGG GCG
CW24A: GCA GGA TCC AAA CGT GGA ACG GCC ACC AC
CW24B: TCG GGA TCC CGA ATT GAC CAT CGG CGT CG
CW25A: GCA GGA TCC TCG CTG CAG GTG GCC AAT AC
CW25B: TCG GGA TCC AGC AAC TGA GGG CGC CAC C
CW26C: CAG TCA GCC GGC CTT GTT CTT TTT GCA GGA TCC C
CW27a: TGC ATA CTA GTC TAG CAG TCG ATT CAC TAG CCA GC
CW27b: GGT GGT CCC GTC GGC AAG AG
CW28A: TGC AGG ATC CAT GTC CCC TAT ACT AGG TTA TTG G
CW28B: ACC TGG ATC CAT CCG ATT TTG GAG GAT GG
CW29A: TAG CCG ATC GAT TAG CCT CCT CCG AGG ACG TCA TC
CW29B: CAG TGA ATT CTT AGG CGC CGG TGG AGT GGC
CW31A: GCA GAA TTC ACG CCG AGT ACG CCA AGC C
CW31B: TCG CTC GAG TTA GAG AAT GGG TGT CGA GGG CG
CW32A: AAA GAT AGC AAC GGA GCC GGG GCG AAG GTT TCC GGA GAT
CW32B: ATC TCC GGA AAC CTT CGC CCC GGC TCC GTT GCT ATC TTT
CW37a: TGC GGT ACC ATG GCC TCC TCC GAG GAC
CW37b: ACT AAG CTT GGC GCC GGT GGA GTG GCG
CW37c: G TCT AAG CTT ATG ACC CAT CAA TCA AAA AAC G
CW56C: ATC GCT CGA GCT AGA TGC GCC AGC CCT G
CW56D: AGC TGA ATT CGA CGA CAT TCG CGA GAC G
MW-N1: GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CGA CCA TTC TCA AGA AAT CTC
AAA
MW-N2: GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CGC GTG GCT GCG CAG ACT C

2.5 Verwendete Vektoren

Vektor	Quelle
- pBS-KS(+)	Stratagene - (La Jolla, USA)
- pBS2-SK(+)	Stratagene
- pCS2MT	R.A. Rupp, LMU München, (Rupp et al., 1994)
- pCS2HA	J. Grosshans
- pCS2-RhoGEF2	Y. Kussler-Schneider, AG Grosshans
- pCS2-RG2-T1544A	Y. Kussler-Schneider, AG Grosshans
- pJG4-5	J. Grosshans
- pEG202	J. Grosshans
- pSH18-34	J. Grosshans
- pUASp	J. Grosshans (Rørth, 1998)
- sGMCA	D.P. Kiehart, Duke University, Durham, (Kiehart et al., 2000)
- Δ 2-3 Turbo	J. Grosshans
- pMT-Gal4	M. Boutros, DKFZ Heidelberg
- pMT-V5_His_c	Invitrogen
- pRSET _B -mRFP1	R.Y. Tsien, UCSD, La Jolla, (Campbell et al, 2002)
- pGEX60H	J. Grosshans
- pJG4-5-B1_4	diese Arbeit, isoliert aus <i>Yeast-Two-Hybrid</i> cDNA Bibliothek

2.6 Antikörper und Farbstoffe

Primäre Antikörper	Quelle
- Rb- α -RhoGEF2	Grosshans (Grosshans et al., 2005)
- Rb- α -Slam	Grosshans (unveröffentlicht)
- M- α -Myc 9E10	H. Saumweber, Berlin
- M- α -HA	Covance Research Products/BAAbCO, (USA)
- M- α -GFP	Chemicon (Temecula, USA)
- M- α - γ -Tubulin	Sigma-Aldrich
- Rat- α -Yrt	U. Tepass, Toronto, (Laprise et al., 2006)
- Rat- α -Fry	P.N. Adler, Charlottesville (Emoto et al., 2004)

- M- α -Dlg Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa

Sekundäre Antikörper

Alle für Immunfärbungen verwendeten sekundären Antikörper wurden von der Firma Invitrogen/Molecular Probes bezogen und jeweils in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt.

- Goat Anti-Rat IgG (H+L) Alexa Fluor 488
- Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 488, 546 bzw. 647
- Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor 488, 546 bzw. 647
- Horse Peroxidase (POD) anti-rabbit IgG (H+L) - Sigma-Aldrich
(1:10000 im Western Blot)

Farbstoffe

- Alexa Fluor Phalloidin 488, 546 bzw. 647 - Invitrogen/Molecular Probes
- DAPI (4',6'-Diamidino-2-phenylindole) - Sigma-Aldrich

Einbettungsmedien

- Aquapolymount - Polysciences (Eppelheim)

2.7 Bakterienstämme

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

2.8 Hefestämme

- EGY48: Mat α , *his3*, *leu2::op(laxA)4LEU2*, *trp1*, *ura3-52*

2.9 Zelllinien

- *Drosophila* S2 R+ M. Boutros, DKFZ Heidelberg

2.10 Fliegenstämme

Tabelle 2.1

Liste der in dieser Arbeit verwendeten Fliegenstämme

Genotyp	Quelle
<i>ore^R</i>	Laborstammsammlung
<i>w¹¹¹⁸</i>	Laborstammsammlung
<i>w, Sp/CyO P{ry⁺, hb-lacZ}; Drl/TM3 Sb P{ry⁺, hb-lacZ}</i>	Laborstammsammlung
<i>w, P{FRT(<i>w^{hs}</i>)}G13 RhoGEF2^{I(2)04291}/CyO</i>	U.Häcker, (Padash Barmchi et al., 2005)
<i>w; P{FRT(<i>w^{hs}</i>)}G13 RhoGEF2^{I(2)04291}/CyO P{ry⁺, hb-lacZ}; P{w⁺, sqh-myc₆-RhoGEF2}</i>	diese Arbeit
<i>w; P{FRT(<i>w^{hs}</i>)}G13 RhoGEF2^{I(2)04291}/CyO P{ry⁺, hb-lacZ}; P{w⁺, sqh-myc₆-RhoGEF2_GAGA}/TM3 Sb P{ry⁺, hb-lacZ}</i>	diese Arbeit
<i>w, P{FRT(<i>w^{hs}</i>)}G13 RhoGEF2^{I(2)04291}/CyO P{ry⁺, hb-lacZ}; P{w⁺ sqh-myc₆-RhoGEF2_T1544A}</i>	diese Arbeit
<i>w, P{w⁺, Ubq-DE-cadherin-GFP}</i>	H.Oda, (Oda & Tsukita, 2001)
<i>w, nuf¹ sr e cal/TM6B Tb Hu</i>	W.Sullivan, (Sullivan et al., 1993)
<i>rab11^{J2D1}/TM3 Sb</i>	Bloomington Stock Centre
<i>rab11^{93Bi}/TM3 Sb</i>	Bloomington Stock Centre
<i>w dah³⁰/FM6</i>	Bloomington Stock Centre
<i>w, Sp/CyO P{ry⁺, hb-lacZ}; P{w⁺ tub-Gal4-VP16}15 P{w⁺, UAS-4xPDZ_{RG2}-RFP}/TM3 Sb P{ry⁺, hb-lacZ}</i>	diese Arbeit
<i>w, P{w⁺ tub-Gal4-VP16}67</i>	Laborstammsammlung
<i>w, P{w⁺ tub-Gal4-VP16}15</i>	Laborstammsammlung
<i>w, P{w⁺, UAS-RFP-RhoGEF2}</i>	diese Arbeit
<i>w, P{w⁺, sqh-moe-GFP}</i>	D.P.Kiehart, (Kiehart et al., 2000)
<i>w, P{w⁺, sqh-moe-RFP}</i>	diese Arbeit
<i>w, P{w⁺ Ubq-GFP-DSas-6}/CyO</i>	J.W.Raff (Peel, et al., 2007)
<i>w¹¹¹⁸, P{GAL4::VP16-nos.UTR}MVD1, P{UASp-GFPS65C-αTub84B}3</i>	Bloomington Stock Centre

w , P{neoFRT}82B yrt^{75A} /TM3 Sb P{ry ⁺ , hb-lacZ}	U.Tepass, (Laprise et al., 2006)
P{ry ^{+17.2} =PZ} blot ¹⁶⁵⁸ ry ⁵⁰⁶ P{FRT(w ^{hs})}2A/TM6	H.Skaer, (Johnson et al., 1999)
abl ⁴ P{FRT(w ^{hs})}2A/TM3 Sb	M.Peifer, (Grevengoed et al., 2001)
w^{1118} P{hsFLP}; P{FRT(w ^{hs})}G13 P{ovoD1-18}2R/CyO	Laborstammsammlung
w^{1118} P{hsFLP}; P{ovoD1-18}3L P{FRT(w ^{hs})}2A/TM3 Sb	Laborstammsammlung
w^{1118} P{hsFLP}; P{neoFRT}82B P{ovoD1-18}3R/TM3 Sb	Laborstammsammlung
y^1 ; P{SUPor-P}Map60 ^{KG00506} /SM6a; ry ⁵⁰⁶	Bloomington Stock Centre

2.11 Kultur- und Nährmedien, Fliegenfutter

- LB-Medium	10 g	Bactotrypton
	10 g	NaCl
	5 g	Hefeextrakt
	15 g	Bactoagar (für Platten)
	0,1 mg/ml	Ampicillin (für Selektionsmedium)
		Endvolumen 1 Liter
- YPD	10 g	Hefeextrakt
	20 g	Peptone
	20 g	Agar +1 Pellet NaOH (nur für Platten)
	20 g	Glukose
		Endvolumen 1 Liter
- SD-Medium	6,7 g	Yeast nitrogen base ohne AS
	0,6 g	AS-Mix ohne His, Trp, Leu, Ura
	20 g	Agar +1 Pellet NaOH (nur für Platten)
	10 ml	AS/Uracil (aus 100x Stammlösung)
	20 g	Glukose (bzw. 20g Galaktose +10g Raffinose)
		Endvolumen 1 Liter
- Indikatorplatten		SD-Medium
	0,1M	Kaliumphosphatpuffer pH=7,0
	40 µg/ml	X-Gal

- Stammlösungen	2,4 mg/ml	Uracil	100x
	2,4 mg/ml	Histidin	100x
	7,2 mg/ml	Leucin	100x
	5,0 mg/ml	Tryptophan	100x
	20 mg/ml	X-Gal in DMF	500x

Die Medien, AS-Stammlösungen und die Zuckerlösungen wurden separat autoklaviert und dann gemischt.

- Zellkulturmedium Schneider's *Drosophila* Medium -GIBCO/Invitrogen
 FCS - GIBCO/Invitrogen

- Fliegenfutter 20 l Wasser zusammen mit 256 g Faden-Agar erhitzen, bis der Agar vollständig gelöst ist. 800 g Bäckerhefe (Trockenhefe), 320 g Sojabohnenmehl und 2,56 kg Maismehl in 8 l Wasser suspendieren und in den kochenden Agar geben. 700g Zuckerrübensirup und 2,56g Malz in weiteren 4l Wasser suspendieren und dazugeben. Das Futter dann für 30 Minuten kochen lassen. Nach Abkühlung auf unter 60°C 320 ml Nipaginlösung (13,3% in Ethanol) und 400 ml Propionsäure dazugeben, mischen und in Futterröhrchen abfüllen. Die Röhrchen werden nach dem Erkalten mit Kunststoffstopfen verschlossen und bei 18°C gelagert.

- Apfelsaftagarplatten 70 g Agar werden in 3l Wasser autoklaviert. Nach anschließender Zugabe von 1l Apfelsaft, 100 g Zucker und 40 ml Nipaginlösung (15% Nipagin in Ethanol) wird der Apfelsaftagar in Plastikschaalen gegossen und nach dem Erkalten bei 4°C gelagert.

2.12 Puffer und Lösungen

- PBS	130 mM	NaCl
	7 mM	Na ₂ HPO ₄
	3 mM	NaH ₂ PO ₄
- PBT		PBS +
	0,1 %	Tween20
- Fixierlösung	0,4 %	NaCl
(Hitze-fixierung)	0,03 %	Triton X-100
- TE:	10 mM	Tris/HCl pH7.5
	1 mM	EDTA
- TAE	40 mM	Tris-Azetat
	1 mM	EDTA
- 6xLadepuffer	10 mM	Tris-HCl (pH 7.6)
	0,03 %	Bromphenolblau
	0,03 %	Xylenecyanol FF
	60 %	Glyzerin
	60 mM	EDTA

DNA-Minipräparation

- Lösung 1	10 mM	Glukose
	25 mM	Tris-HCl pH 8.0
	10 mM	EDTA pH 8.0
- Lösung 2:	0,2 M	NaOH
	1 %	SDS
- Lösung 3:	3 M	Kaliumazetat
	5 M	Essigsäure

RNA-Gelelektrophorese

- 10x MOPS	200 mM	MOPS
	50 mM	Natriumazetat
	10 mM	EDTA pH=7,0
- Formamid-	100 µl	Formamid
Ladepuffer	33,3 µl	37% Formaldehyd
	20 µl	10x MOPS
	2 µl	10mg/ml Ethidiumbromid

SDS-PAGE

- Trenngel	375 mM	Tris-HCl pH 8,8
	0,1 %	SDS
	10 %	PAA
	0,1 %	APS
	0,06 %	TEMED
- Sammelgel	125 mM	Tris-HCl pH 6,8
	5 %	PAA
	0,1 %	APS
	0,1 %	TEMED
- Laemmli	45 mM	Tris-HCl pH 6,8
	3 %	SDS
	0,3 %	Bromphenolblau
	10 %	Glycerol
	3 %	β-Mercaptoethanol
- Laufpuffer	150 g	Glycin
	10 g	SDS
	32,8 g	Tris
		Endvolumen 1 Liter

- Coomassie	200 ml	Methanol (tech.)
Färbelösung	200 ml	ddH ₂ O
	80 ml	Essigsäure (tech.)
	0,5 g	Coomassie R-250 (0,1% w/v)

- Entfärbelösung	600 ml	Methanol (tech.)
	200 ml	Essigsäure (tech.)
		Endvolumen 2 Liter

Silberfärbung

- Lösung A	200 g/l	Ammoniumsulfat in 1% Phosphorsäure
- Lösung B	60 g/l	Ammoniumsulfat in 1% Phosphorsäure
- Lösung C	2 %	Coomassie G450 in 50% Ethanol (w/v)
-Stopplösung	5 %	Glyzerin in 3% Essigsäure

Western-Blot

- Anodenpuffer	3,06 g	Tris
	100 ml	Methanol
		Endvolumen 1 Liter
- Kathodenpuffer	3,02 g	Tris
	5,25 g	6-Aminohexansäure (capronic acid)
	100 ml	Methanol
		Endvolumen 1 Liter
- Blockierlösung	5 %	Magermilchpulver in PBT

GST-Pull Down Assay

- Extraktionspuffer	50 mM	Hepes pH 7.5
	100 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	10 %	Glyzerin
	1 mM	PMSF frisch aus 0,1 M Stammlösung
	1 x	Inhibitor Mix
- 100x Inhibitor Mix	1 mM	Leupeptin
	0,1 mM	Bestatin
	0,1 mM	Pepstatin A
	0,1 mM	E-64
	0,5 mg/ml	Aprotinin A
- Waschpuffer 1	50 mM	Hepes pH=7,5
	100 mM	NaCl
	0,1 %	Tween20
- Waschpuffer 2	50 mM	Hepes pH=7,5
	100 mM	NaCl
	10 mM	ATP (Adenosin 5'-triphosphate di-Natriumsalz)
	5 mM	MgCl ₂
	0,1 %	Tween20
- Elutionspuffer 1	50 mM	Hepes pH=7,5
	250 mM	NaCl
	0,1 %	Tween20
	1 mM	EDTA
- Elutionspuffer 2	50 mM	Hepes pH=7,5
	500 mM	NaCl
	0,1 %	Tween20
	1 mM	EDTA

- Elutionspuffer 3 50 mM Hepes pH=7,5
 1 M NaCl
 0,1 % Tween20
 1 mM EDTA

- Elutionspuffer 4 50 mM Hepes pH=7,5
 1,5 M MgCl₂
 0,1 % Tween20

Yeast-Two-Hybrid

- LiAc/TE 100 mM Lithiumaztetat
 10 mM Tris/HCl pH 8,0
 1 mM EDTA

- PEG/LiAc/TE 100 mM Lithiumaztetat
 10 mM Tris/HCl pH 8,0
 1 mM EDTA
 40 % PEG4000 (w/v)

- LiSorb 100 mM Lithiumaztetat
 10 mM Tris/HCl pH 8,0
 1 mM EDTA
 1 M Sorbitol

- Carrier-DNA 10 mg/ml denaturierte Lachsspermien DNA

2.13 Chromatographie

- Glutathione Sepharose 4B - GE Healthcare/Amersham

- HisTrap HP 1ml - GE Healthcare/Amersham

2.14 Reagenziensätze

- ECL plus Western Blotting Detection System - GE Healthcare/Amersham
- Plasmid Midi Kit Nucleobond AX - Macherey-Nagel (Düren)
- QIAquick Gel Extraction Kit - Qiagen (Hilden)
- Effectene Transfection Reagent kit - Qiagen
- MEGAscript High Yield Transcription Kit - Ambion (Foster City, USA)
- mMESSAGE mMACHINE High Yield Capped RNA Transcription Kit - Ambion

2.15 sonstige Materialien

- 1 kb DNA Ladder - NEB
- ssRNA Ladder - NEB
- PageRuler™ Unstained Protein Ladder - Fermentas
- Prestained Protein Molecular Weight Marker - Fermentas
- RNasin (20-40U/μl) - Promega (Mannheim)
- Rabbit Reticulocyte Lysate, Nuclease treated - Promega
- ConcanavalinA - Sigma-Aldrich
- Demecolcine (Colcemid) - Sigma-Aldrich
- Latrunculin A - P. Crews, Santa Cruz, USA
- Colcemid - Sigma-Aldrich
- Protran Nitrocellulose Membran - Whatman/Schleicher & Schuell
- Whatman 3MM Chr Blotpapier - Whatman (Springfield Mill, GB)
- Bradford Reagenz - Sigma-Aldrich
- BSA/Albumin Fraktion V - Applichem
- Lab-TEK Chambered Coverglass - nunc (Wiesbaden)

2.16 Software

- Adobe Photoshop 9.0
- ImageJ 1.38x
- Leica Confocal Software 2.61
- PerkinElmer UltraView 2.0.0.009
- Lasergene 7.1.0

2.17 Mikroskope

- Leica DMIRE2 konfokal
- Zeiss Axiovert 200M PerkinElmer Ultra-View Spinning Disc konfokal

2.18 Geräte

- | | |
|-------------------------|---|
| - Thermocycler | PTC-200 Peltier Thermal Cycler - MJ Research |
| - Western-Blot | Trans-blot SD Semi-Dry Transfer Cell - BIO-RAD |
| - Radiographie | FUJIFILM FLA-3000 Software: Image Reader V1.8E
Fuji Medical X-Ray Film, 13x18 cm
Image Screens BAS-MS 2040 (Fujifilm) |
| - Ultraschallgerät | Cell Disruptor B15 Sonifier - Branson |
| - Geldokumentation | Raytest IDA (Image Documentation & Analysis) |
| - Elektroporationsgerät | Gene Pulser™ - BIO-RAD |
| - Proteinreinigung | ÄKTAprime™ plus - GE Healthcare/Amersham |
| - Nadelzieher | P-87 Flaming/Brown Micropipette Puller - Sutter
Instrument Co |
| - Mikroinjektion | FemtoJet - Eppendorf |

3. Methoden

3.1 Fliegenarbeiten

3.1.1 Fliegenhaltung

Die Fliegen wurden bei Raumtemperatur in mit Futterbrei gefüllten Plastikröhrchen gehalten. Zur Eiablage wurden die Fliegen in Plastikkäfige umgesetzt, die am Boden mit einer Apfelsaftagarplatte verschlossen wurden. Sowohl die Futterröhrchen als auch die Apfelsaftagarplatten wurden zur Stimulierung der Eiablage mit etwas Bäckerhefe bestrichen.

3.1.2 Erzeugung von Keimbahnklonen

Fliegen mit homozygot mutanter Keimbahn und heterozygotem Soma wurden mit Hilfe des FRT/FLP System erzeugt (Chou & Perrimon, 1996). Die Nachkommen von Fliegen des entsprechenden Genotyps wurden 36-48h nach der Eiablage für 1h bei 37°C inkubiert, um die Expression der Flipase zu induzieren. Diese Behandlung wurde einmal nach weiteren 24h wiederholt.

3.1.3 Dechorionieren und Fixieren von Embryonen

Embryonen des gewünschten Entwicklungsstadiums wurden auf Apfelsaftagarplatten gesammelt und anschließend mit 50 % Klorix für 2 min dechorioniert. Die dechorionierten Embryonen wurden in einem kleinen Edelstahlnetz gesammelt und ausgiebig mit destilliertem Wasser gewaschen. Für die Formaldehydfixierung wurden die Embryonen im Anschluß in ein Glasröhrchen mit Fixiergemisch überführt und für 30 Minuten auf dem Schüttler fixiert. Zum Entfernen der Vitellinmembran wurde die untere formaldehydhaltige Phase verworfen und durch 5 ml Methanol ersetzt. Nach etwa 30 Sekunden kräftigem Schütteln konnten die auf den Boden gesunkenen devitellinisierten Embryonen mit einer Pasteurpipette entnommen und in ein Eppendorfgefäß überführt werden. Die Embryonen wurden dann noch 2 mal kurz und zweimal für 5 Minuten mit Methanol gewaschen und anschließend bei -20°C gelagert oder direkt für entsprechende Färbungen eingesetzt.

Für einige Versuche, beispielweise bei RNA-injizierten Embryonen oder bei Embryonen die mit Phalloidin gefärbt werden sollten, war eine manuelle Entfernung der Vitellinmembran erforderlich. Zu diesem Zweck wurden die untere Phase nach der 30 minütigen Fixierung entfernt und durch 5 ml PBS ersetzt. Anschließend wurde das gesamte verbliebene Fixiergemisch einschließlich der Embryonen durch ein Netzchen gekippt, wobei die Embryonen im Netz aufgefangen wurden. Um das Heptan möglichst vollständig zu entfernen, wurde das Netzchen mit den Embryonen kurz auf Papierhandtüchern abgetupft und dann in PBT geschwenkt. Dieser Vorgang wurde mehrere Male wiederholt. Schließlich wurden die Embryonen mit einem feinen Pinsel auf doppelseitiges Klebeband, das zuvor in den Deckel einer kleinen Plastikpetrischale geklebt worden war, überführt und mit PBT bedeckt. Die Vitellinmembran wurde dann mit einer feinen Kanüle entfernt. Die so behandelten Embryonen wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und für Färbungen eingesetzt oder bei 4°C gelagert.

Zur Hitzefixierung wurden Embryonen wie beschrieben dechorioniert und anschließend für 10 Sekunden in Fixierlösung, die zuvor in der Mikrowelle aufgeköcht worden war, fixiert. Durch Zugabe von Eis wurde der Fixiervorgang gestoppt und die Embryonen wie bereits beschrieben mit Hilfe eines Heptan/Methanol-Gemisches devitellinisiert.

3.1.4 Mikroinjektion in Embryonen

Für die Injektion von mRNA, dsRNA und Inhibitoren sowie zur Etablierung transgener Fliegenlinien wurden Embryonen im gewünschten Stadium gesammelt und dechorioniert. Die dechorionierten Embryonen wurden nach dem Waschen mit destilliertem Wasser auf einem Stück Apfelsaftagar aufgereiht, auf ein dünn mit Heptankleber bestrichenes Deckgläschen transferiert und dann für ca. 10 Minuten im Desikkator getrocknet. Nach dem Trocknen wurden die Embryonen mit Voltalef-Öl bedeckt und unter das Injektionsmikroskop gelegt. Die Injektionsnadel wurde mit Hilfe von Eppendorf Microloader-Pipettenspitzen mit der zu injizierenden Lösung befüllt und nach dem Einspannen in den Mikromanipulator wurden ca 50-100 pl in das posteriore Ende jedes Embryos injiziert. Latrunculin A und Colcemid wurden jeweils in einer Konzentration von 50 µg/ml injiziert. Für eine anschließende Fixierung der injizierten Embryonen wurden diese für etwa 1-2 Stunden bei 25°C

inkubiert, Öl und Embryonen wurden mit Heptan vom Deckgläschen in ein Glasröhrchen gewaschen und nach nochmaligem Waschen mit Heptan auf die schon beschriebene Weise fixiert. Die Injektionen für die Keimbahntransformation erfolgte analog. Dabei wurde darauf geachtet die DNA-Lösung möglichst genau in die Polregion des Embryos zu injizieren. Nach der Injektion wurden die Embryonen in einer feuchten Kammer bei 18°C bis zum Schlupf der Larven gelagert.

3.1.5 Herstellung transgener Fliegen

Die Herstellung transgener Fliegenlinien erfolgte durch P-Element-vermittelte Keimbahntransformation (Rubin & Spradling, 1982). Hierzu wurden der entsprechende Transformationsvektor und das Helferplasmid $\Delta 2-3$ Turbo im Verhältnis 3:1 gemischt. Dieses DNA-Gemisch wurde anschließend mit Ethanol und Natriumazetat gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in Aqua dest zu einer Endkonzentration von 0,6-1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ aufgenommen, bevor es wie beschrieben in die Polzellregion von Embryonen des Genotyps w^{1118} injiziert wurde. Die aus den injizierten Embryonen geschlüpften Fliegen wurden mit Fliegen des Genotyps $w; Sp/Cyo P\{ry^+, hb-lacZ\}; Dr /TM3 Sb \{ry^+, hb-lacZ\}$ gekreuzt, so daß erfolgreiche Insertionen in der Nachkommenschaft dieser Kreuzungen anhand der durch die Expression des im Transformationsvektor enthaltenen *mini-white* Gens verursachte rote Augenfarbe selektiert werden konnten. Einzelne rotäugige Männchen dieser Generation wurden erneut gegen $w; Sp/Cyo P\{ry^+, hb-lacZ\}; Dr /TM3 Sb \{ry^+, hb-lacZ\}$ Weibchen gekreuzt. Durch die Auswertung der Segregation der dominanten Marker in der Nachkommenschaft dieser Kreuzung wurde schließlich ermittelt, auf welchem Chromosom das Transgen ins Genom inseriert wurde. Gleichzeitig konnten durch die Verpaarung entsprechend balancierter Fliegen stabile transgene Linien etabliert werden.

3.1.6 Antikörperfärbungen

Fixierte Embryonen, die in Methanol bei -20° gelagert worden waren, wurden vor dem Färben 3 mal kurz und dreimal für 5 Minuten auf dem Rad mit PBT gewaschen, um das Methanol zu entfernen. Anschließend wurden sie in 5% BSA in PBT für mindestens 30 Minuten blockiert und dann über Nacht bei 4°C oder für 2h bei

Raumtemperatur mit dem ersten Antikörper in PBT plus 0,1% BSA inkubiert. Danach wurden die Embryonen dreimal kurz und viermal für je 15 Minuten mit PBT gewaschen, bevor sie für 1-2h mit dem jeweiligen sekundären Antikörper inkubiert wurden. Nach diesem Schritt wurde die Waschprozedur wiederholt. Eine eventuelle Aktinfärbung durch Phalloidin (1:1000 in PBT) erfolgte nach dem letzten Waschschrift für weitere 30 Minuten. Abschließend wurden die Embryonen mit DAPI (0,8 µg/ml in PBT) für 2-5 Minuten gefärbt, wiederum zweimal kurz und einmal für 5 Minuten mit PBT gewaschen und in Aqua Polymount eingebettet.

3.1.7 *Live Imaging* mit Embryonen

Fluoreszenzmarkierte Embryonen wurden auf Apfelsaftagarplatten gesammelt, dechorioniert und auf einem Stück Apfelsaftagar aufgereiht. Die aufgereihten Embryonen wurden mit einem mit Kleber bestrichenen Deckgläschen aufgenommen und mit Voltalef-10S-Öl bedeckt. Mit Hilfe von Klebebandstreifen wurde das Deckgläschen mit der Glasseite nach unten auf einem speziellen offenen Objektträger aus Aluminium fixiert. An inversen Mikroskopen konnte die Entwicklung der Embryonen so direkt verfolgt werden.

3.2 DNA-Arbeiten

3.2.1 Restriktionsanalyse

Zum präparativen Verdau von Plasmid DNA wurden in der Regel 5 µg DNA mit 10 U des entsprechenden Restriktionsenzym und dem vom Hersteller empfohlenen Puffer in einem 30 µl Ansatz für 2-3h bei 37°C verdaut. Für analytische Verdaus wurden 0,5 bis 1 µg DNA und 5 U Enzym eingesetzt und die Inkubationszeit auf 1-2h verkürzt. Beim Verdau von Plasmiden aus Minipräparationen wurde den Ansätzen 0,5 µl RNase zugefügt.

3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 1%igen Agarosegelen. Hierzu wurden 150 ml TAE Puffer zusammen mit 1,5 g Agarose in der Mikrowelle aufgekocht. Nachdem sich das Gemisch etwas abgekühlt hatte, wurde Ethidiumbromid zu einer Konzentration von 0,5 µg/ml zugefügt, der Ansatz durch leichtes Schwenken gemischt und in eine vorbereitete Gelkammer gegossen. Nach dem Abkühlen wurde das Gel in die Elektrophoresekammer gelegt und mit TAE Puffer bedeckt, bevor die Kämme für die Geltaschen vorsichtig entnommen wurden. Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen 6x Ladepuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Zusätzlich zu den zu analysierenden Proben wurde auch ein Längenstandard geladen. Der Gellauf erfolgte dann bei 10V/cm Gellänge für etwa 1 Stunde. Zum Sichtbarmachen der aufgetrennten DNA-Fragmente wurde das Gel auf ein UV-Tisch gelegt und fotografiert.

3.2.3 DNA-Aufreinigung aus dem Gel

Zur Aufreinigung von elektrophoretisch aufgetrennten DNA Fragmenten aus Agarosegelen, wurde das QiaQuick Kit von Qiagen entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

3.2.4 Ligation von DNA Fragmenten

Für Ligationen wurden 50-100 ng des entsprechend verdauten Vektors zusammen mit einer je nach Größe des zu ligierenden Inserts variierenden Menge an Insert-DNA in einem 10 µl Ansatz zusammen mit dem entsprechenden Puffer und 5U T4 DNA Ligase inkubiert. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert lag dabei zwischen 1:2 und 1:10. In der Regel erfolgten die Ligationen über Nacht bei 16°C oder für 1-2h bei Raumtemperatur.

3.2.5 Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden

Um bei Klonierung von DNA Fragmenten in einen Vektor die Selbstligation des geschnittenen Vektors zu verhindern, wurden die 5'-Enden an den kompatiblen Enden des Vektors dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung erfolgte mit Hilfe von

SAP (*shrimp alkaline phosphatase*). Pro Ligationsreaktion wurden 100ng DNA zusammen mit 1U SAP in 1x SAP-Puffer für 15 min bei 37°C inkubiert. Durch anschließende 15 minütige Inkubation bei 65°C wurde das Enzym inaktiviert.

3.2.6 Transformation von Plasmiden in *E.coli*

Transformation durch Hitzeschock

Die Hitzeschocktransformation erfolgte mit Hilfe von nach der Rubidiumchloridmethode hergestellten kompetenten *E.coli* Zellen. Diese wurden für ca 10 Minuten auf Eis aufgetaut. Nach dem Auftauen wurden etwa 5-50ng des zu transformierenden Plasmids zu den Bakterien pipettiert, der Ansatz kurz gemischt und dann für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Daran anschließend erfolgte ein zwei-minütiger Hitzeschock bei 42°C bevor 200 µl LB-Medium dazugegeben wurden. Die Zellsuspension wurden dann für ca 30-45 Minuten bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert, anschließend auf Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Transformation durch Elektroporation

Aufgrund der höheren Effizienz wurden für die PCR-basierte Herstellung von Punktmutationen die entsprechenden Konstrukte durch Elektroporation transformiert. Dazu wurden vorher hergestellte elektrokompente *E.coli* Zellen kurz auf Eis aufgetaut und etwa 1 -2 µl des zu transformierenden Ansatzes dazupipettiert. Nach etwa 1 minütiger Inkubation auf Eis wurde der Ansatz in eine vorher gekühlte Elektroporationsküvette überführt und bei 2,5 kV im Elektroporationsgerät transformiert. Um einen Kurzschluss durch etwaige noch im Transformationsansatz enthaltene Salze zu verhindern, wurde mitunter eine Mini-Dialyse mit Mikrofiltern für ca 30 Minuten gegen 1l Aquadest durchgeführt. Nach der Elektroporation wurde 1 ml LB-Medium zu den Bakterien gegeben und die Zellsuspension in ein Eppendorf-Gefäß überführt, für 45 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend auf Selektionsmedium ausplattiert. Die Platten wurden dann bei 37°C über Nacht kultiviert.

3.2.7 PCR

Standard PCR

Die *Polymerase Chain Reaction* erlaubt die gezielte Amplifikation von DNA-Fragmenten auch aus sehr geringen Mengen Ausgangsmaterial bei gleichzeitiger Einführung neuer Restriktionsschnittstellen. Diese Technik wurde deshalb bei vielen Klonierungen und auch bei der Herstellung von Punktmutationen eingesetzt. Ein Standard 50 μ l-PCR-Ansatz enthielt dabei etwa 1 μ g Template-DNA, 1U thermostabiler DNA-Polymerase, 200 nM dNTP-Gemisch (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und je 0,5 μ M Sense und Antisenseprimer in H₂O. Alle Amplifizierungsreaktionen wurden in einem Thermocycler durchgeführt. Die dabei verwendeten Programme und Annealing-Temperaturen wurden je nach verwendetem Primerpaar entsprechend gewählt.

Colony PCR

Die Identifikation von Klonen, die nach Transformation mit einem Ligationsansatz einen Vektor aufgenommen haben, in den das Insert in der gewünschten Art und Weise eingebaut wurde, kann zum einen durch Isolierung des entsprechenden Plasmids und einer anschließenden geeigneten Restriktionsanalyse erfolgen, es ist aber mitunter einfacher, gewünschte Klone durch eine sogenannte Colony PCR direkt zu identifizieren. Dazu wurde ein PCR Ansatz wie beschrieben in einem Volumen von 12,5 μ l auf Eis angesetzt. Wenn die Orientierung des Inserts eine Rolle spielte, wurde z.B. einen Sense-Primer im Vektor und einen Antisenseprimer im Insert gewählt. Anschließend wurde mit einem sterilen Zahnstocher eine Bakterienkolonie gepickt, kurz in den PCR Ansatz getaucht und anschließend auf einer Backup-Platte mit Selektionsmedium ausgestrichen, um positive Klone zwecks Plasmid-Isolierung später in Kultur nehmen zu können. Die Amplifizierungsreaktion erfolgte wiederum im Thermocycler. Anschließend wurden die Ansätze auf ein Agarosegel geladen und positive Klone anhand der Anwesenheit eines passenden PCR-Produktes identifiziert.

PCR Mutagenese

Mit Hilfe von zueinander komplementären Oligos können gezielt Punktmutationen in eine bestehende DNA Sequenz eingeführt werden. Dabei wird die gesamte DNA-Sequenz des zu mutierenden Vektors amplifiziert. Die Länge des bei 72°C ablaufenden Elongationsschrittes muß dementsprechend angepaßt werden.

Im Gegensatz zur Standard-PCR wurde nur 1ng der Template-DNA eingesetzt. Zudem wurde Pfu-Polymerase verwendet und der PCR Zyklus wurde nur 20 mal wiederholt. Das PCR-Produkt wurde anschließend mit Hilfe von Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt, gefällt und für 1,5h bei 37°C mit DpnI verdaut. Dabei wurde die Template-DNA abgebaut. Nach einer erneuten Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließender Fällung wurden elektrokompetente *E.coli*-Zellen mittels Elektroporation transformiert und auf Selektionsmedium ausplattiert. Aus den so erhaltenen Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert, gereinigt und sequenziert, um Klone mit der gewünschten Punktmutation identifizieren zu können.

3.2.8 Plasmid-Mini-Präparation

Zur Isolation von Plasmid DNA aus *E.coli* wurden 1,5 ml einer von einer Einzelkolonie angeimpften Übernachtskultur in Eppendorfgefäße überführt und die Bakterien bei 10000 rpm für 1 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 100 µl Lösung I resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung II und anschließender 5 minütiger Inkubation bei RT, wurden 100 µl Lösung III dazupipettiert, der Ansatz kurz gemischt und für 10 Minuten auf Eis gestellt. Die Proben wurden danach bei 13000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gefüllt. Nach Zugabe von 1 ml Ethanol wurde die DNA für mindestens 10 Minuten auf Eis gefällt und nach erneuter 10 minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm wurde das Pellet einmal mit 750 µl 70% igem Ethanol gewaschen. Das Ethanol wurde schließlich nach erneuter Zentrifugation abgesaugt und das Pellet in der Speedvac getrocknet. Zuletzt wurde das trockene DNA-Pellet in 50 µl TE aufgenommen. Der Ansatz wurde nochmals gemischt und dann bei -20°C gelagert.

3.2.9 Plasmid-Midi-Präparation

Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde ein entsprechender Reagenziensatz verwendet. 50 ml einer mit einer Einzelkolonie angeimpften Übernachtskultur wurden entsprechend den Angaben des Herstellers zur Plasmid-Gewinnung eingesetzt. Die Konzentration der erhaltenen Plasmid-Präparation wurde photometrisch bestimmt und die Lösung bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.10 Sequenzierung

Alle DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma SeqLab in Göttingen durchgeführt. Dazu wurden ca. 600 ng Plasmid bzw. 100-200 ng PCR-Produkt zusammen mit 20 pmol des entsprechenden Primers in einem Gesamtvolumen von 7 µl gemischt und eingeschickt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Lasergene.

3.2.11 Konstrukte

Alle für diese Arbeit hergestellte Konstrukte sind in Tabelle 3.1 aufgelistet. Mehrschrittklonierungen sind zudem im Text detailliert beschrieben.

Tabelle 3.1

Liste der in dieser Arbeit verwendeten DNA-Konstrukte

Konstrukt	Oligos	Klonierung
pCS2MT-RhoGEF2		siehe Text
pCS2MT-RhoGEF2-I	CW5a CW5b	als EcoRI/XhoI Fragment in pCS2MT
pCS2MT-RhoGEF2-IA	CW5a CW5c	als EcoRI/XhoI Fragment in pCS2MT
pCS2MT-RhoGEF2-IB	CW5e CW5b	als EcoRI/XhoI Fragment in pCS2MT
pCS2MT-RhoGEF2-IB -GAGA	CW32a CW32b	siehe Text
pCS2MT-RhoGEF2-II	CW6a CW6b	als EcoRI/XhoI Fragment in pCS2MT
pCS2MT-RhoGEF2-III	CW7a CW7b	als XbaI/XbaI Fragment in pCS2MT

pCS2MT-RhoGEF2-IV	CW8a CW8b	als EcoRI/XhoI Fragment in pCS2MT
pCS2MT-4xPDZ _{RG2}	CW21a/CW21b CW22a/CW22b	siehe Text
pCS2MT-GST-2xPDZ _{RG2}	CW28a CW28b	als BamHI/BamHI Fragment in pCS2MT-2xPDZ _{RG2}
pUASP-4xPDZ _{RG2}	CW29a CW29b	siehe Text
pUASP-RFP-RhoGEF2	CW37a/CW37b CW37c/CW17b	siehe Text
pUASP-RFP-RhoGEF2- GAGA		siehe Text
sRMCA	CW1a CW1b	siehe Text
pCaSpeR_sqh- myc ₆ +RhoGEF2	CW26c/CW17b CW27a/CW27b	siehe Text
pCaSpeR_sqh- myc ₆ +RhoGEF2_GAGA		siehe Text
pCaSpeR_sqh- myc ₆ +RhoGEF2_T1544A		siehe Text
pGEX60H-PDZ _{RG2}	CW21a CW21b	als BamHI/BamHI Fragment in pGEX60H
pGEX60H-PDZ _{Dlg}	CW24a CW24b	als BamHI/BamHI Fragment in pGEX60H
pGEX60H-PDZ _{Baz}	CW25a CW25b	als BamHI/BamHI Fragment in pGEX60H
pEG202-PDZ _{RG2}	CW31a CW31b	als EcoRI/XhoI Fragment in pEG202
pJG4-5-DEcadh _{intra}	CW56d CW56c	als EcoRI/XhoI Fragment in pJG4-5
pCS2-HA-CG9795		siehe Text

- pCS2MT-RhoGEF2:

Ein 7,34 kb großes SmaI/XbaI Fragment aus pCS2-RhoGEF wurde in den zuvor mit den gleichen Enzymen geschnittenen pCS2MT-RhoGEF2-I kloniert. Der Vektor enthält somit die vollständige codierende Sequenz von RhoGEF2.

- pCS2MT-RhoGEF2-IB-GAGA:

Mit Hilfe der Primer CW32a und CW32b wurde eine Mutagenese des Vektors pCS2MT-RhoGEF2-IB vorgenommen. Dabei wurden 2 Punktmutationen in die Carboxylat Bindschleife der PDZ-Domäne eingeführt. Nach der Mutagenese wurde das mutierte EcoRI/XhoI Fragment ausgeschnitten und in den Ausgangsvektor

pCS2MT kloniert. Die Sequenz des mutierten Fragmentes wurde durch Sequenzierung überprüft.

- pCS2MT-4xPDZ_{RG2}:

Die PDZ-Domäne von RhoGEF2 (Aminosäuren 241... 349) wurde mit Hilfe von CW22a (Clal) und CW22b (Clal) amplifiziert und als Clal Fragment in pCS2MT kloniert. Anschließend wurden Klone mit richtig orientierten doppelten Insertionen isoliert. Das gleiche PCR Fragment wurde noch einmal in die am 3'Ende liegende nichtmethylierte Clal-Schnittstelle des so erhaltenen Vektors pCS2MT-2xPDZ_{RG2} eingefügt. Anschließend wurde eine vierte Kopie der PDZ-Domäne mit Hilfe von CW21a (BamHI+ATG) und CW21b (BamHI) amplifiziert und in die 5'-BamHI Schnittstelle von pCS2MT-3xPDZ_{RG2} kloniert. Die Sequenz des Vektors pCS2MT-4xPDZ_{RG2} wurde durch Sequenzierung auf Fehler überprüft.

- pUASP-4xPDZ_{RG2}-RFP:

Mit Hilfe der Oligos CW29a (Clal) und CW29b (EcoRI) wurde die codierende Sequenz von mRFP vom Vektor pRSET_B-mRFP1 (Cambell et al., 2002) amplifiziert und in den mit Clal/EcoRI verdauten Vektor pCS2MT-4xPDZ_{RG2} eingefügt. Dabei wurde das C-terminale myc₆-Epitop durch mRFP ersetzt. Anschließend wurde aus pCS2MT-4xPDZ_{RG2}-RFP ein 2091bp großes HindIII/EcoRI Fragment ausgeschnitten und in pBS2SK(+) umkloniert. Aus dem so erhaltenen Vektor pBS2SK(+)-4xPDZ_{RG2}-RFP wurde ein 2153 bp KpnI/XbaI großes Fragment ausgeschnitten und in pUASP kloniert.

- pUASP-RFP-RhoGEF2:

Die codierende Sequenz von mRFP wurde mit CW37a (KpnI) und CW37b (HindIII) aus pRSET_B-mRFP1 amplifiziert und in pBSKS(+) kloniert. Mit Hilfe von CW37c (HindIII) und CW17b wurde der 5'-Bereich der codierenden Sequenz von RhoGEF2 vom Vektor pCS2-RhoGEF2 amplifiziert und nach Verdau mit HindIII und SmaI (interne Schnittstelle) in pBSKS(+)-RFP kloniert. Ein 7,34 kb SmaI/XbaI Fragment wurde aus pCS2-RhoGEF2 ausgeschnitten und in pBSKS(+)-RFP-RG(N-term) eingefügt. Aus dem so erhaltenen Konstrukt pBSKS(+)-RFP-RhoGEF2 wurde schließlich die gesamte Sequenz als 8,7kb großes KpnI/XbaI ausgeschnitten und in pUASP kloniert.

- pUASP-RFP-RhoGEF2-GAGA:

In pBSKS(+)-RFP-RhoGEF2 wurde ein 1251bp großes *Sma*I/*Avr*II Fragment durch das analoge Fragment aus pCS2MT-RhoGEF2-IB-GAGA (enthält 2 Punktmutationen in PDZ Domäne) ersetzt und anschließend die gesamte Sequenz wiederum als 8,7 kb großes *Kpn*I/*Xba*I Fragment in pUASP kloniert. Das Vorhandensein der beiden Punktmutationen wurde durch Sequenzierung überprüft.

- sRMCA:

Die codierende Sequenz von mRFP wurde mit Hilfe der Oligos CW1a (*Xho*I und *Age*I Schnittstellen) und CW1b (*Hind*III) aus pRSET_B-mRFP1 amplifiziert und nach Verdau mit *Xho*I und *Hind*III in pBSKS(+) kloniert. Ein 1378 bp großes *Hind*III/*Xba*I Fragment aus sGMCA (Kiehart et al., 2000) wurde in pBSKS(+)-mRFP eingefügt und das resultierende 2063 bp große Fragment mit *Age*I/*Xba*I herausgeschnitten und in den zuvor mit *Ngo*MIV/*Xba*I verdauten Vektor sGMCA (Kiehart et al., 2000) kloniert.

- pCaSpeR+sqh+myc₆+RhoGEF2

Basis für Klonierung war sGMCA (basiert auf pCaSpeR, enthält *sqh* Promotor und 3'UTR), Der N-terminale Teil von RhoGEF2 inklusive myc₆-Epitop wurde mit Hilfe der Primer CW 26c und CW 17b vom zuvor bereits klonierten Vektor pCS2MT+RhoGEF2-I amplifiziert (nt 64...1230). Durch den Primer CW26c wurde am 5'-Ende des PCR-Produkts eine *Ngo*MIV Schnittstelle eingeführt. Unter Nutzung dieser *Ngo*MVI Schnittstelle und einer internen *Sma*I Schnittstelle (1025-1030) konnte das 968 bp lange Fragment nach *Ngo*MIV/*Sma*I Verdau in den zuvor in gleicher Weise verdauten pBS2SK(+)-Vektor kloniert werden. Das Ergebnis dieses Klonierungsschrittes war der Vektor pBS2SK(+)+myc₆+RhoGEF2_N-term. Um die Sequenz von RhoGEF2 zu komplettieren, wurde ein 7,3 kb großes *Sma*I/*Xba*I Fragment aus pCS2-RhoGEF2 in pBS2SK(+)+myc₆+RhoGEF2_N-term kloniert, um pBS2SK(+)+myc₆+RhoGEF2 zu erhalten. Schließlich wurde mit Hilfe der Primer CW27a und CW27b der 3'-UTR des *sqh*-Gens aus sGMCA amplifiziert (nt 7731...8457). Durch CW27a wurde dabei am 5'-Ende eine *Spe*I-Schnittstelle eingeführt. Nach Verdau des PCR-Produktes mit *Spe*I/*Xba*I konnte das resultierende 440 nt lange Fragment in die *Xba*I Schnittstelle des Vektors pBS2SK(+)+myc₆+RhoGEF2 kloniert werden. Auf diese Weise entstand pBS2SK(+)+myc₆+RhoGEF2+3'UTR_{sqh}. Aus diesem Vektor erhielt man nach Verdau

mit NgoMIV/XbaI ein 5,3 kb großes NgoMIV/XbaI Fragment und ein 3,4 kb großes NgoMIV/NgoMIV Fragment. Diese wurden dann nacheinander in den mit NgoMIV/XbaI verdauten Vektor sGMCA kloniert.

- pCaSpeR+sqh+myc₆+RhoGEF2-GAGA

Zur Einführung der beiden Punktmutationen in der PDZ Domäne wurde pBS2SK(+)+myc₆+RhoGEF2+3'UTR_{sqh} mit SmaI/AvrII geschnitten und das analoge Fragment aus pCS2MT-RhoGEF2-IB-GAGA eingefügt. Die Klonierung in sGMCA erfolgte so wie bei pCaSpeR+sqh+myc₆+RhoGEF2. Das Vorhandensein der Punktmutationen wurde durch Sequenzierung überprüft.

- pCaSpeR+sqh+myc₆+RhoGEF2-T1544A:

Für die Klonierung von RhoGEF2-T1544A wurde pCaSpeR+sqh+myc₆+RhoGEF2 mit AvrII/PmeI verdaut und durch das analoge 3,67 kb große AvrII/PmeI Fragment aus pCS2-RG2-T1544A ersetzt. Zur Kontrolle wurde der so erhaltene Vektor sequenziert.

- pCS2HA-CG9795:

Einer der 5 im *Yeast-Two-Hybrid* Screen isolierten CG9795 cDNA Klone (pJG4-5-B1_4) enthält die komplette kodierende Sequenz des Gens, sowie 159bp 5'UTR. Der Vektor pJG4-5-B1_4 wurde mit EcoRI/Clal sowie mit Clal/EcoRI verdaut. Ein 782 bp großes EcoRI/Clal Fragment sowie ein 1,9 kb großes EcoRI/XhoI Fragment wurden isoliert und in einer 3-Punkt Ligation in den zuvor mit EcoRI/XhoI verdauten Vektor pCS2HA kloniert. Da ein Teil der Sequenz des 5'-UTR mitkloniert wurde, befinden sich im Fusionsprotein 53 zusätzliche Aminosäuren zwischen dem N-terminalen 3xHA-Epitop und der eigentlichen AS-Sequenz von CG9795.

3.3 RNA-Arbeiten

3.3.1 *in vitro* Transkription

Synthese doppelsträngiger RNA für RNAi Experimente

Das Ausschalten von Genen mit Hilfe von RNA Interferenz ist eine relativ einfache Methode um Untersuchungen zur Funktion von Genen durchzuführen. Dabei führt das Einbringen von genspezifischer doppelsträngiger RNA in die Zelle über verschiedene Prozessierungsschritte zum Abbau des endogenen Transkripts und somit zu einer Reduktion des entsprechenden Proteinlevels. Diese Technik ist in *Drosophila* bereits zur funktionellen Analyse von Genen, die sich durch eine starke zygotische Expression unmittelbar vor und während der Zellularisierung auszeichnen, erfolgreich angewendet worden (Pilot et al., 2006).

Zuerst wird dabei ein für das jeweilige Gen spezifisches Fragment der cDNA in einer PCR Reaktion amplifiziert. Die dabei eingesetzten Primer haben jeweils am 5'-Ende des zur Gensequenz komplementären Abschnitts eine T7-Promotor Sequenz. An diese bindet in der nachfolgenden *in vitro* Transkriptionsreaktion die zugefügte T7 Polymerase und ermöglicht so die gleichzeitige Transkription beider DNA Stränge in RNA. Die entstehenden komplementären RNA Stränge paaren selbstständig und man erhält doppelsträngige RNA.

In der vorliegenden Arbeit wurde die dsRNA Synthese für das Gen *nullo* mit Hilfe der Primerpaares MW-N1/MW-N2 und des Ambion Megascript Kits entsprechend des vom Hersteller empfohlenen Protokolls durchgeführt. Nach dem Vorbereiten des Reaktionsansatzes wurde die Transkriptionsreaktion für 2-3h bei 37°C inkubiert. Das DNA-Template wurde durch Zugabe von DNase abgebaut und der Ansatz durch Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt. Das so erhaltene RNA Pellet wurde in Wasser aufgenommen und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Synthese translatierbarer einzelsträngiger RNA

Durch Injektion von mRNA in 0-30 min alte Embryonen lassen sich im frühen *Drosophila* Embryo gezielt Proteine exprimieren. Die Synthese der dazu benötigten translatierbaren einzelsträngigen RNA erfolgte dabei mit Hilfe des mMESSAGE

mMACHINE High Yield Capped RNA Transcription Kits entsprechend des vom Hersteller vorgegebenen Protokolls. Die Reaktionsansätze wurden nach der Inkubation bei 37°C und dem anschließenden Abbau des DNA Templates durch Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt, das RNA Pellet in 10-20µl Wasser aufgenommen und bis zur Mikroinjektion bei -20°C gelagert.

3.3.2 denaturierende Gelelektrophorese

Zur Qualitätskontrolle wurden *in vitro* synthetisierte einzelsträngige RNA Fragmente auf denaturierenden Agarose-Formaldehyd-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Herstellung solcher Gele wurden 0,5 g Agarose in 37,5 ml H₂O durch kurzes Erhitzen in der Mikrowelle gelöst, bevor nach Abkühlen auf 60-65°C 5ml 10x MOPS und 8 ml 37%ige Formaldehydlösung dazugegeben wurden. Das Gemisch wurde nach kurzem Schütteln dann in eine Gelkammer gegossen. Die zu analysierenden RNA-Proben wurden mit 3-4 Vol. Ladepuffer versetzt. Alle so präparierten Ansätze wurden anschließend für 10 Minuten bei 65-68°C denaturiert, sofort auf Eis abgekühlt und zusammen mit einem RNA-Längenstandard aufs Gel geladen. Die Auftrennung erfolgte dann bei ca. 10 V/cm in 1xMOPS Elektrophoresepuffer.

3.4 Proteinarbeiten

3.4.1 SDS-PAGE und Coomassie-Färbung

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen ermöglicht die Analyse komplexer Proteingemische und die Bestimmung von Molekulargewichten einzelner Polypeptide. Dazu wurde zunächst die Lösung für das Trenngel in die abgedichtete Gelapparatur eingefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach ca 15 min wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel auf das nun polymerisierte Trenngel gefüllt und der Kamm für die Probenaschen eingesetzt. Nach weiteren 15 min konnte der Kamm entfernt und das Gel in die entsprechende Laufkammer montiert werden. Die zu analysierenden Proteinproben wurden mit 2xLaemmli-Puffer versetzt, etwa 5 min bei 96°C gekocht und dann zusammen mit einem Molekulargewichtsmarker auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 20mA pro Gel und konstanter Spannung für 1h und 15min in SDS-Laufpuffer. Danach wurde die Apparatur

auseinandergelöst, das Sammelgel verworfen und das Trenngel für 30 min in Coomassie-Färbelösung auf einem Schüttler inkubiert. Zum Abschluß wurde das Gel in Entfärbelösung geschwenkt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren.

Für die GST-Affinitätsbindung mit den rekombinant hergestellten PDZ-Domänen von RhoGEF2, Dlg und Baz wurden große Gradienten-Trenngele (5-17%) verwendet. Diese wurden mit Hilfe eines Gradientenmischers hergestellt. Um die Proteine nach der Elektrophorese sichtbar zu machen, wurden diese Gele entweder mit Silbernitrat oder bei gewünschter massenspektrometrischer Identifizierung einzelner Proteinbanden mit Colloidal Coomassie gefärbt.

3.4.2 Silberfärbung

Nach dem Elektrophoreselauf wurde das Trenngel aus der Gelapparatur entnommen und zunächst unter leichtem Schütteln für 1 h in Fixierlösung A inkubiert. Danach wurde das Gel für 30 Minuten in Fixierlösung B und schließlich für 2x15min in Fixierlösung C geschwenkt. Im Anschluß daran wurde das Gel zunächst für etwa 1 Minute in Färbelösung A gefärbt, anschließend 2x kurz mit destilliertem Wasser gewaschen, für weitere 6 Minuten in Färbelösung 2 inkubiert und nach erneutem zweimaligen Waschen mit destilliertem Wasser für 5-10 Minuten entwickelt. Nach ausreichender Färbung wurde die Entwicklerlösung entfernt, das Gel wiederum 2x mit Wasser gewaschen und die Färbereaktion in Stopplösung beendet.

3.4.3 Colloidal Coomassie Färbung und Massenspektrometrie

Für die massenspektrometrische Analyse von Proteinbanden aus Polyacrylamidgelen war es notwendig, die Proteine auf diesen Gelen mit einer speziellen Coomassiefärbung sichtbar zu machen. Dazu wurde das Trenngel nach dem Lauf zunächst für 30 Minuten in 3%iger Essigsäure fixiert. Danach wurde kurz in Lösung B äquilibriert und danach in einem Gemisch aus 200 ml Lösung B und 2 ml Lösung C für 24h bei Raumtemperatur gefärbt. Nach der Färbung wurde das Gel einmal kurz in Lösung B gewaschen und schließlich für 2x30 Minuten in Lösung A fixiert. Schließlich wurde das Gel zunächst einmal kurz mit technischem Ethanol, dann 2x kurz mit Leitungswasser gewaschen und dann in Lösung A aufbewahrt. Zu identifizierende Proteinbanden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und nach Trypsinverdau mit

Hilfe von MALDI-TOF analysiert. Alle Analysen wurden von der massenspektrometrischen Einrichtung des ZMBH (Leitung: Dr. Thomas Ruppert) durchgeführt.

3.4.4 Western Blot

Der Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulosemembranen erfolgte mittels des Trans-blot SD Semi-Dry Transfersystems. Dazu wurden 3 Blätter von in Kathodenpuffer getränktem Whatman Papier, das Gel, die in Anodenpuffer getränkte Nitrozellulosemembran und weitere 3 Blätter Whatman Papier (ebenfalls in Anodenpuffer getränkt) aufeinandergestapelt und in die Transferzelle eingelegt. Das Blotting erfolgte bei einem konstanten Strom von 60 mA pro Minigel für ca. eine Stunde. Danach wurde die Membran für 30 Minuten in Blockierlösung geschwenkt und über Nacht mit dem primären Antikörper (in PBT) inkubiert. Anschließend wurde dreimal für je 20 Minuten mit PBT gewaschen. Diese Prozedur wurde im Anschluß an die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (POD-gekoppelt in PBT; 2h bei RT) wiederholt. Danach wurde die Membran mit dem ECL plus Western Blotting Detection System entwickelt und mittels Autoradiographie ausgewertet.

3.4.5 *in vitro* Translation im Retikulozytenlysat

Die für die Kartierung der PDZ Lokalisationsdomäne hergestellten mRNA Fragmente wurden vor der Injektion in Embryos im Retikulozytenlysat translatiert und dabei gleichzeitig durch den Einbau von ³⁵S-Methionin radioaktiv markiert. Dazu wurden 0,5-1µg translationskompetente RNA zusammen mit 10,5 µl Retikulozytenlysat, 0,3µl Aminosäuremix (ohne Methionin), 0,6µl ³⁵S-Methionin, 0,3 µl RNAsin (40 U/µl) und 2,1µl RNase freiem Wasser für 2,5 h bei 37°C inkubiert. Nach der Translation wurden jeweils 5µl einer solchen Reaktion mit 5 µl 2x SDS-Ladepuffer vermischt, für 5 min bei 96°C gekocht und anschließend auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele wurden nach dem Lauf getrocknet und am Phosphorimager ausgewertet.

3.4.6 Autoradiographie

Für die Erstellung von Autoradiogrammen wurde das radioaktive Polyacrylamidgel bzw. Blotmembranen auf ein Blatt 3MM-Papier gelegt, auf einem Gelrockner getrocknet, in Haushaltsfolie gewickelt und in eine Screenkassette geklebt. Ein Phosphoimager-Screen wurde aufgelegt und abhängig von der Signalstärke nach 1-48h im Phosphoimager gescannt.

3.4.7 Nickelaffinitätsreinigung

Die Aufreinigung von GST-PDZ_{RG2}-H₆, GST-PDZ_{Dlg}-H₆ und GST-PDZ_{Baz}-H₆ erfolgte nach dem Standard Protokoll von QIAGEN aus geklärtem Bakterienlysat unter nativen Bedingungen (siehe auch Handbuch *The QIAexpressionist*). Für die Expression der drei Konstrukte wurde jeweils ein Liter einer frisch angeimpften BL21 Bakterienkultur bei einer OD₆₀₀ von 0,6 mit 1mM IPTG induziert und für 4h bei 37°C kultiviert. Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des automatisierten Chromatographiesystems ÄKTaprime™ plus unter Verwendung von HisTrap HP Säulen (1 ml). Diese enthalten eine Nickelsepharose Matrix und erlauben so die Affinitätsreinigung von Proteinen mit 6xHis-Motiven. Der Proteingehalt der eluierten Fraktionen wurde zunächst grob im Dot-Blot mit anschließender Amidoschwarzfärbung ermittelt, um die Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration vereinigen zu können. Dieser Proteinlösung wurde Saccharose zu einer Konzentration von 200mM zugefügt und die Endproteinkonzentration nochmals mittels Bradford-Test (Bradford, 1976) bestimmt. Die Aliquots wurden in Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.4.8 Dot-Blot und Amidoschwarzfärbung

Zur Bestimmung des Proteingehaltes der Elutionsfraktionen wurden jeweils 2 µl jeder Fraktion auf eine Nitrozellulosemembran pipettiert. Die Membran wurde anschließend an der Luft getrocknet, dann für 5 Minuten in Amidoschwarz-Färbelösung getaucht und zur Entfärbung mehrere Male mit destilliertem Wasser gewaschen.

3.4.9 Herstellung von embryonalen Proteinextrakten

5 g bei -80°C gelagerter Embryonen wurden mit 20 ml Extraktionspuffer in einem Dounce Homogenisator zerkleinert und anschließend für 10 Minuten bei 4°C und 4000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und für eine Stunde bei 100000g in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand, der hauptsächlich lösliche cytoplasmatische Proteine enthält, wurde abgenommen, wobei die oberste weiße Lipidschicht zuvor so gut wie möglich entfernt worden war. Das Pellet wurde mit dem gleichen Extraktionspuffer und zusätzlich 1% TritonX100 im Dounce Homogenisator reextrahiert und für 30 Minuten bei 4°C unter leichtem Rühren gelöst. Nach erneuter Ultrazentrifugation wurde der zweite Überstand, der Membranproteine und membranassoziierte Proteine enthalten sollte, abgenommen. Beide Extrakte wurden dann mit 75µl unbeladenen GSH-Sepharose-Beads für 1h bei 4°C vorinkubiert. Danach wurden die Beads durch Zentrifugation (4°C, 4000 U/min) pelettiert, die Überstände in neue Gefäße transferiert und nachdem ihr Proteingehalt mittels Bradford-Test bestimmt worden war, in Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.4.10 GST-Pull Down-Assay aus Embryonalextrakten

Um potentielle PDZ-Bindepartner aus embryonalen Proteinextrakten zu isolieren, wurden zunächst GSH-Sepharose-Beads mit den zuvor gereinigten rekombinanten GST-PDZ-Proteinen beladen. Dazu wurden 500µg Protein zusammen mit 100µl GSH-Sepharose-Beads (200µl einer 50%igen Suspension) und 1mM DTT in einem Volumen von 1ml PBT gemischt und bei 4°C für 2 Stunden inkubiert. Danach wurden die GSH-Sepharose-Beads durch Zentrifugation pelettiert und viermal mit je 1 ml PBT gewaschen. Zuvor waren bereits die eingefrorenen embryonalen Proteinextrakte (cytoplasmatische Fraktion und Membranfraktion) auf Eis aufgetaut worden und zur Entfernung von präzipitiertem Material einmal für 10 Minuten bei 4°C und 4000 U/min zentrifugiert worden. Zu jeweils 10 ml der so behandelten Proteinextrakte wurden nun jeweils 100 µl der beladenen und gewaschenen GSH-Sepharose-Beads gegeben. Diese Ansätze wurden für 2h bei 4°C auf einem Rotor inkubiert, anschließend zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die GSH-Sepharose-Beads wurden dann mit einem kleinen Volumen Extraktionspuffer in Mowicol

Röhchen überführt, mit 10 ml Waschpuffer 1 und danach mit 5 ml Waschpuffer 2 gewaschen. Dazu wurde der jeweilige Puffer mit der Spritze aufgezogen, auf das Mowicol Röhrchen geschraubt und langsam durchgedrückt. Danach wurden die gebundenen Proteine jeweils 2x in 200µl Elutionspuffer 1 bis 4 eluiert. Nach jedem Elutionsschritt wurden beide Eluate vereinigt und durch Zugabe von 1 Vol. 10%iger TCA-Lösung über Nacht gefällt. Die gefällten Eluate wurden zentrifugiert, mit Ethanol gewaschen, in der Speedvac getrocknet, in 50 µl Laemmli resuspendiert, für 5 Minuten bei 96°C gekocht und durch SDS-PAGE analysiert. Die GSH-Sepharose-Beads wurden nach Behandlung mit Elutionspuffer 4 direkt in 50µl Lämmli aufgekocht.

3.5 Zellkulturarbeiten

3.5.1 Kultur von *Drosophila* S2-Zellen

Drosophila S2-Zellen wurden in Schneider-Medium mit 10% FCS bei 25-27°C kultiviert. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen mit frischem Medium im Verhältnis 1:10 verdünnt und in neue Flaschen passagiert.

3.5.2 Transfektion von S2-Zellen

Für die transiente Transfektion von S2-Zellen wurde das Effecten-Transfektionskit von QIAGEN entsprechend dem Standardprotokoll des Herstellers für nicht adhärenente Zellen eingesetzt. S2-Zellen, die einen Tag vor der Transfektion passagiert worden waren, wurden abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit 10 ml sterilem PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen, gezählt und schließlich zu einer Zelldichte von $1-5 \times 10^6$ Zellen/ml ausgesät. Die Transfektionen erfolgten mit jeweils 0,5 µg Plasmid-DNA. Nach dem Vorbereiten der Transfektionsgemische wurden diese auf die Zellen verteilt und gemischt. Nach 18-24h wurden die transfizierten Zellen erneut mit PBS gewaschen, um das Transfektionsagens zu entfernen, in neue Kulturschalen transferiert und bis zum weiteren Gebrauch bei 25°C im Inkubator kultiviert.

3.5.3 *Live Cell Imaging* mit S2-Zellen

Für die Experimente mit S2-Zellen wurden Konstrukte mit Metallothionin-Promoter verwendet. Deren Expression kann durch die Zugabe von CuSO_4 ins Medium angeschaltet werden. Darüber hinaus wurde auch mit pUASP-Vektoren gearbeitet, die eigentlich bei der Keimbahntransformation zur Herstellung transgener Fliegen eingesetzt wurden. Diese Konstrukte eignen sich jedoch bei Ko-Transfektion mit einem ebenfalls induzierbaren, Gal4-exprimierenden Helferplasmid auch für die Expression in Schneider-Zellen.

200-400 μl transfizierte Zellen wurden in jeweils eine Kammer von mit Concanavalin A behandelten Lab-TEK Kammerdeckgläschen pipettiert. Dazu wurde steril filtriertes CuSO_4 zu einer Konzentration von 500 μM gegeben und die Kammer dann bei 25°C für mindesten 4h inkubiert. Die Mikroskopie erfolgte am Perkin Elmer Spinning Disk Mikroskop unter Benutzung eines 100xObjektives.

3.5.4 Concanavalin A Behandlung

Für die Timelapse-Aufnahmen mit S2-Zellen wurden LabTEK Kammerdeckgläschen von nunc (Wiesbaden) verwendet. Diese Kammern haben ein Deckgläschen als Boden und eignen sich somit für die direkte Beobachtung lebender Zellen. S2 Zellen sind nicht adhärenente Zellen. Um trotzdem eine bessere Anhaftung an die Glasoberfläche zu erreichen, wurde mit Concanavalin A behandelt. Dazu wurde Concanavalin A Lösung in ein steriles LabTEK Kammerdeckgläschen gefüllt und für 30 Minuten auf einen Schüttler gestellt. Anschließend wurde die Lösung abpipettiert und die ganze Kammer 2x mit sterilem Aqua dest gewaschen. Schließlich wurde die Kammer mit offenem Deckel unter die Sterilbank zum Trocknen gestellt, bevor die Zellen eingefüllt werden konnten.

3.6 Arbeiten mit Hefe

3.6.1 *Yeast Two Hybrid Screen*

Für den in dieser Arbeit ausgeführten Screen wurde der Hefestamm EGY48 benutzt. Dieser Stamm ist defizient für die Synthese der Aminosäuren Histidin, Tryptophan und

Leucin sowie für die Synthese von Uracil. Zudem enthält er im Genom ein Leucin-Reportergen mit LexA Bindemotiven in der Promotorregion. Dieser Stamm wurde mit dem Vektor pSH18-34 und dem Vektor pEG202-PDZ_{RG2} transformiert. Der Vektor pSH18-34 codiert für ein Protein, das die Synthese von Uracil ermöglicht und enthält außerdem ein zweites Reportersystem. Dabei handelt es sich um das β -Galaktosidase-Gen, das wiederum LexA Bindestellen in seiner Promotorregion enthält. Der Vektor pEG202-PDZ_{RG2} ermöglicht die Synthese von Histidin und exprimiert das LexA-PDZ_{RG2} Fusionsprotein unter Kontrolle eines konstitutiv aktiven Adh-Promotors.

In den so erhaltenen Hefestamm wurde dann die Bibliothek transformiert. Die Bibliothek besteht aus cDNA Fragmenten, die in den Vektor pJG4-5 kloniert wurden. Dieser enthält ein Gen, das essentiell für die Synthese von Tryptophan ist und erlaubt darüber hinaus die Expression eines Fusionsprotein, das aus einer N-terminalen transaktivierenden Domäne, einem HA-Tag und einem zufällig eingebauten Proteinfragment des *Drosophila* Proteoms besteht. Zur Herstellung dieser Bibliothek wurden cDNAs aus Ovarien von OregonR Weibchen isoliert, auf eine bestimmte Größe selektiert und als EcoRI/Xho Fragmente in pJG4-5 kloniert (Grosshans et al., 1999). Die Expression des beschriebenen Fusionsproteins steht unter Kontrolle eines Gal-Promotors und kann somit durch Umstellen der C-Quelle im Kulturmedium von Glukose auf Galktose/Raffinose induziert werden.

EGY48 Hefezellen wurden zunächst in einer Doppeltransformation mit pSH18-34 und pEG202-PDZ_{RG2} transformiert, auf SD-Glukose Platten (-Ura -His +Trp +Leu) ausplattiert und für 2-3 Tage bei 30°C inkubiert. Diese Hefezellen wurden dann in 10 Transformationsansätzen mit pJG4-5-ovo transformiert und auf SD-Galaktose Platten (-Ura -His -Trp -Leu) ausplattiert. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurde ein Zehntel eines Transformationsansatz in einer Verdünnungsreihe auf SD-Galaktose Platten (-Ura -His -Trp +Leu) ausplattiert. Alle Platten wurden bei 30°C für 3-4 Tage kultiviert. Hefekolonien, die auf den SD-Galactose Platten (-Ura -His -Trp -Leu) gewachsen waren, wurden mit sterilen Zahnstochern auf SD-Glucose Platten (-Ura -His -Trp +Leu) ausgestrichen. Diese Platten wurden nach 3-4 Tagen bei 30°C für die Replikatests verwendet.

Die auf den SD-Galaktose Platten (-Ura -His -Trp +Leu) gewachsenen Kolonien wurden ausgezählt und die Transformationseffizienz pro Ansatz ermittelt. Die ganze

Prozedur wurde einige Male wiederholt, bis eine genügend große Anzahl von Kolonien gescreent worden war.

3.6.2 Transformation von Hefe

Alle nachfolgenden Angaben beziehen sich auf einen einfachen Transformationsansatz (das entspricht ca 10^8 Hefezellen). Von einer Einzelkolonie wurden 10ml des entsprechenden Mediums angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Mit dieser Kultur wurde am nächsten Morgen 10 ml auf 30°C vorgewärmtes Medium zu einer OD_{600} von 0,07 angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,5 bei 30°C auf dem Schüttler kultiviert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (für 4min bei 2000 min^{-1}) mit 10 ml Wasser gewaschen und mit 1 ml Wasser in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach kurzem Zentrifugieren wurde das Wasser verworfen, die Zellen mit 1 ml LiAc/TE Lösung gewaschen und schließlich in 50 μl LiAc/TE vorsichtig resuspendiert. Zu dieser Zellsuspension wurden dann 50 μg Carrier DNA und 1 μg Plasmid-DNA gemischt. Nach Zugabe von 300 μl PEG/LiAc/TE Lösung und vorsichtigem Mischen, wurde der Transformationsansatz für 30 min bei 30°C im Wasserbad inkubiert, kurz resuspendiert und dann für 15min bei 42°C ins Wasserbad gestellt. Um eine möglichst hohe Transformationseffizienz zu erreichen, wurden vor dem Hitzeschock 35 μl DMSO hinzugefügt. Anschließend wurden die Eppendorfgefäße kurz im 30°C Wasserbad abgekühlt und direkt auf entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert.

3.6.3 Replikatests

Für die Replikatest wurden die zuvor auf SD-Glukose Platten (-Ura -His -Trp +Leu) ausgestrichenen positiven Klone mittels eines mit einem sterilem Samttuch bespannten Replikastempels nacheinander auf vier verschiedene Platten übertragen. Die Reihenfolge der Replikaplattierung war dabei wie folgt:

1. SD-Glukose-X-Gal Indikator-Platten (-Ura -His -Trp +Leu)
2. SD-Galaktose-X-Gal Indikator-Platten (-Ura -His -Trp +Leu)
3. SD-Glukose Wachstumstest-Platten (-Ura -His -Trp -Leu)
4. SD-Galaktose Wachstumstest-Platten (-Ura -His -Trp -Leu)

Anschließend wurden die Platten mit Parafilm versiegelt, für 3-4 Tage bei 30°C inkubiert und dann eingescannt.

3.6.4 Isolierung der Plasmid-DNA aus Hefe

1,5 ml einer gesättigten Hefekultur wurden abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 100 µl Medium resuspendiert. Nach Zugabe von 200µl Extraktionspuffer, 200µl Phenol/Chloroform und einer Spatelspitze kleiner Glaskügelchen wurde der ganze Ansatz für ca 2min auf höchster Stufe gevortext. Die wässrige Phase wurde anschließend in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 500µl Ethanol gefällt. Nach 10 minütiger Zentrifugation (13k, RT) wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, danach getrocknet und in 50 µl TE gelöst. Um die Plasmid DNA zu isolieren, wurde 1 µl der erhaltenen DNA-Lösung mittels Elektroporation in E.coli transformiert und auf LB Amp Platten ausplattiert. Mit Hilfe von DNA-Minipräparationen wurde aus 10-15 Kolonien die Plasmid-DNA isoliert und durch Restriktionsanalyse die Klone ermittelt, die den pJG4-5 Vektor enthielten.

3.6.5 Amplifikation der Inserts durch PCR und anschließende Sequenzierung

Zur Identifizierung der cDNA Fragmente aus den pJG4-5 Plasmiden der Hefezellklone, die im LacZ- und im Leucin-Reporterassay ein positives Signal gezeigt hatten, wurde die DNA nach der unter 3.6.4 beschriebenen Methode isoliert. Mit Hilfe der Primer PG7 und PG8 (Gawlinski, 2007) konnte dann in einer PCR die Sequenz des cDNA Inserts amplifiziert werden. Dazu wurde 1µl der aus den Hefen isolierten DNA als Template zu einem 50 µl PCR-Standardansatz gemischt. Das PCR-Produkt wurde mittels Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt, auf einem Agarosegel überprüft und sequenziert. Mit den erhaltenen DNA-Sequenzen wurde eine BLAST-Suche (Flybase BLAST; <http://flybase.bio.indiana.edu/blast/>) durchgeführt und die zugehörigen Gene ermittelt.

4. Ergebnisse

4.1 Die Rolle von RhoGEF2 für die Morphogenese des Furchungskanals

4.1.1 Der Zellularisierungs-Phänotyp von RhoGEF2 Keimbahnklonen

In einem Keimbahnklon-Screen für Mutationen mit weiblicher Sterilität, wurden in Embryonen von Müttern, deren Keimbahn homozygot für die Mutation *fs(2R)201* war, Defekte während der Zellularisierung beobachtet (Grosshans et al., 2005). Dieser Zellularisierungs-Phänotyp zeichnet sich dadurch aus, daß die im Wildtyp gut sichtbare invaginierende Membranfront in mutanten Embryonen nur sehr schwer sichtbar ist (Abb.4.1 A und B). Nach Fixierung und Färbung solcher Embryonen zeigen sich Lücken in der hexagonalen Anordnung der während der Zellularisierung invaginierenden Plasmamembran. (Abb.4.1 E und F). Die Zellularisierung läuft dennoch ab, auch die Kinetik der Membraneinwanderung ist im Vergleich zum Wildtyp unverändert.

Mit Hilfe meiotischer Rekombinationskartierung und Komplementationsanalyse konnte *RhoGEF2* als das mutierte Gen identifiziert werden. (Grosshans et al., 2005). Es war bereits bekannt, daß *RhoGEF2* eine essentielle Rolle für die Invagination der mesodermalen Zellen am Beginn der Gastrulation spielt (Barrett et al., 1997; Häcker & Perrimon, 1998). So konnte gezeigt werden, daß das Gen an der apikalen Konstriktion der Zellen der Ventralfurche beteiligt ist. Dabei geht man davon aus, daß es durch eine durch RhoGEF2 induzierte, apikale Rho Aktivierung zu einer Myosin-abhängigen Veränderung der Zellmorphologie kommt, was letztlich zur Ausbildung der Ventralfurche und zur Einwanderung von Zellen ins Innere des Embryos führt. Ein Phänotyp während der Zellularisierung war am Beginn dieser Arbeit noch nicht beschrieben.

Um den beobachteten Phänotyp noch detaillierter zu untersuchen, wurden in Kooperation mit A.H. Müller (Düsseldorf) Aufnahmen der Ultrastruktur fixierter *RhoGEF2^{mat-}*-Embryonen (nachfolgend werden die *RhoGEF2^{mat-}* Embryonen aus entsprechenden Keimbahnklonen der Einfachheit halber als *RhoGEF2* Embryonen bezeichnet) mit Hilfe eines Transmissions-Elektronen-Mikroskops gemacht (Abb.4.1 C und D). Auf diesen wird deutlich, daß die Morphologie des Furchungskanals (Membranschleife am basalen Ende der invaginierenden Membran) im Vergleich

zum Wildtyp deutliche Veränderungen aufweist. Zum einen ist der Furchungskanal deutlich vergrößert (von durchschnittlich 0,2 μm Durchmesser im Wildtyp auf bis zu 0,6 μm in den Mutanten), zum anderen enthalten die Furchungskanäle von *RhoGEF2*-Embryonen oft große zytoplasmatische Einstülpungen. Um die Lokalisation des Proteins zum Zeitpunkt der Zellularisierung zu untersuchen, wurde ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper hergestellt und für Immunfärbungen fixierter Embryonen eingesetzt (Abb.4.1 G). Auf diese Weise konnte gezeigt werden, daß das Protein offensichtlich nicht nur an der Bildung und Stabilisierung des Furchungskanals beteiligt ist, sondern zudem auch dort lokalisiert.

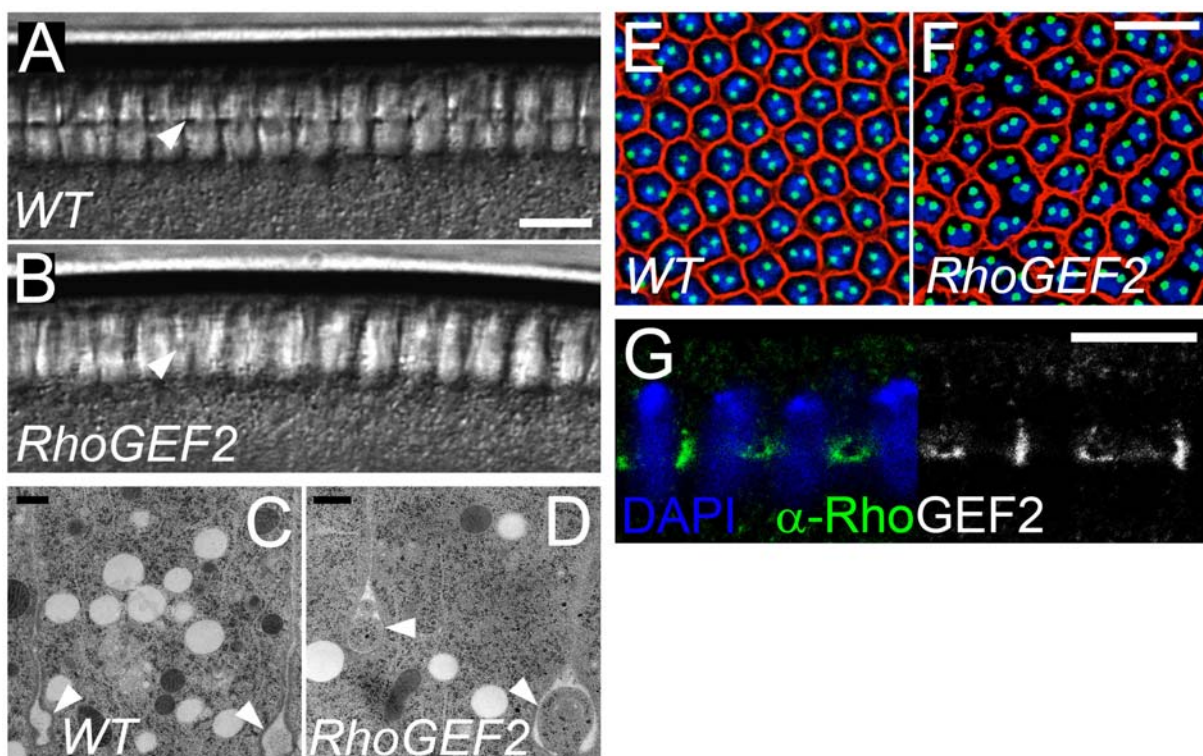


Abbildung 4.1:

Phänotyp von *RhoGEF2*^{mat⁻} – Embryonen und Proteinlokalisierung von *RhoGEF2*

A,B: Bilder von *WT* (A) und *RhoGEF2*^{mat⁻}-Embryonen (B) ca 30 Minuten nach Beginn der Zellularisierung. Die Position der invaginierenden Membranfront ist jeweils mit einem weißen Pfeil markiert. C und D: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Furchungskanäle (Pfeilspitzen) in *WT* (C) und *RhoGEF2*^{mat⁻}-Embryonen (D) (schwarzer Balken entspricht 200nm). E,F: AK-Färbung fixierter Embryonen mit α - γ -Tubulin (grün), Phalloidin (rot) und DAPI (blau). G: Immunfärbung von Wildtypembryonen mit α -*RhoGEF2*. Alle weißen Balken entsprechen jeweils 10 μm . EM-Bilder in C und D von A.H.Müller, Immunfärbungen in E,F und G: J.Grosshans

4.1.2 Charakterisierung der Mutante *RhoGEF2*^{l(2)04291}

Um festzustellen, ob es Unterschiede in der Ausprägung des Phänotyps in verschiedenen *RhoGEF2*-Allelen gibt, wurde jeweils der Anteil der Zellkerne in multinukleären Zellen ermittelt und miteinander verglichen (Grosshans et al., 2005). Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen *RhoGEF2*^{1.1}, *RhoGEF2*^{4.1} (Häcker & Perrimon, 1998) und *RhoGEF2*^{l(2)04291} (Spradling et al., 1995) festgestellt werden. Bei allen untersuchten Embryonen handelte es sich um Keimbahnklone. Diese stammen von Müttern, deren Keimbahn homozygot für *RhoGEF2* war. Somit fehlt diesen Embryonen die maternale Komponente des Gens. Die zygotische Expression von wildtypischem *RhoGEF2* (durch das WT-Allel des Vaters) hat keinen Einfluß auf den Phänotyp in der Zellularisierung (nicht gezeigt). Demzufolge handelt es sich bei diesem Phänotyp um einen rein maternalen Effekt. Für alle nachfolgenden Versuche wurden Keimbahnklone von *RhoGEF2*^{l(2)04291} verwendet. Diese Genmutation beruht auf einer P-Element-Insertion im ersten Intron des Gens (<http://flybase.bio.indiana.edu>). Im Northern Blot mit isolierter RNA aus Embryonen dieser mutanten Fliegenlinie konnte kein Transkript nachgewiesen werden (Häcker & Perrimon, 1998). Um die vorgeschlagene amorphe Natur dieses Allels zu bestätigen, wurden mit Hilfe des von uns hergestellten *RhoGEF2*-Antikörpers die Proteinlevel in *RhoGEF2* und Wildtyp-Embryonen miteinander verglichen (Abb.4.2). Während *RhoGEF2* im Wildtyp wie erwartet am Furchungskanal lokalisiert (Abb.4.2 A), ist in *RhoGEF2*-Keimbahnklonen kein lokalisiertes Signal sichtbar (Abb.4.2 B). Im Western Blot konnte das *RhoGEF2* Protein anders als im Wildtyp in mutanten Embryonen nicht nachgewiesen werden (Abb.4.2 C). Demnach handelt es sich bei *RhoGEF2*^{l(2)04291} sehr wahrscheinlich um ein Null-Allel.

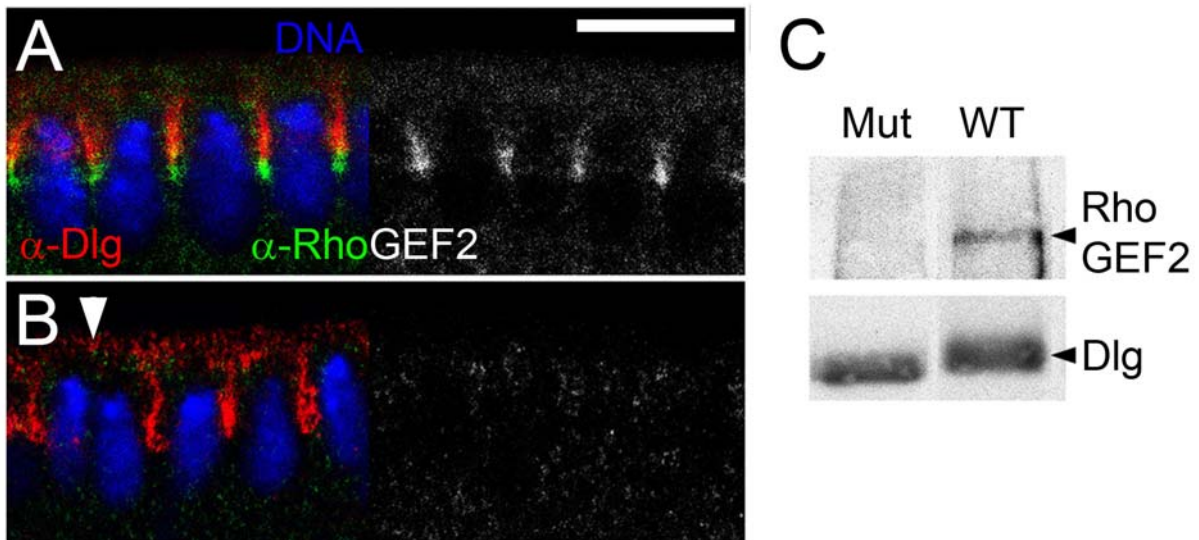


Abbildung 4.2:

Immunfärbung und Western Blot von *RhoGEF2⁽²⁾⁰⁴²⁹¹* Keimbahnklonen

RhoGEF2 Embryonen (B) wurden zusammen mit Wildtyp-Embryonen (A) fixiert und anschließend mit Antikörpern gegen RhoGEF2 (grün) und Dlg (rot) gefärbt (DNA-Färbung mit DAPI in blau). Die Unterscheidung erfolgte anhand des multinukleären Phänotyps (weißer Pfeil). Im Westernblot mit Proteinextrakten aus mutanten und Wildtypembryonen konnte das RhoGEF2 Protein nur im Wildtyp detektiert werden. Für die Ladekontrolle wurde wiederum der α -Dlg-Antikörper verwendet. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 10 μ m.

4.1.3 Kartierung der Lokalisationsdomäne von RhoGEF2

Nach dem von uns vorgeschlagenen und in der Einleitung beschriebenen Modell ist RhoGEF2 an der Rho1-abhängigen Aktinregulation am Beginn der Zellularisierung beteiligt. Demnach käme es durch die lokale Aktivierung von Rho1 am Furchungskanal zu einer Dia-abhängigen Aktinpolymerisierung. In diesem Modell bildet RhoGEF2 somit die Komponente, die durch ihre Lokalisierung die Aktivität anderer Faktoren bestimmt. Indem man untersucht, durch welchen Mechanismus RhoGEF2 selbst am Furchungskanal lokalisiert wird, sollte es demnach möglich sein, bessere Einblicke in die Prozesse zu gewinnen, die bei der Festlegung der Position des Furchungskanals und an der Morphogenese diese Struktur beteiligt sind.

Es gibt nun verschiedene Optionen nach solchen Faktoren zu suchen. Nach der klassischen genetischen Methode würde man in einem systematischen Mutagenese-Screen das Genom der Fliege nach Genmutationen durchsuchen, die eine veränderte RhoGEF2-Lokalisation zur Folge hätten. Diese Art von genetischen

Screens sind speziell für Prozesse im frühen Embryo sehr aufwendig, da man für jede Mutation Keimbahnklone untersuchen müsste. Ein solches Projekt würde den Rahmen dieser Arbeit bei weitem sprengen. Alternativ dazu kann man gezielt die RhoGEF2-Lokalisation in bekannten Zellularisierungsmutanten untersuchen. Das ist für eine Reihe dieser Mutanten wie *nullo*, *nuf*, *Abl*, *dah*, *sry- α* und *dia* gemacht worden, ohne dass deutliche Veränderungen zum Wildtyp festgestellt werden konnten (Grosshans et al., 2005 und unveröffentlichte Daten).

Eine anderer Ansatz ist, zunächst nach physikalischen Interaktionspartnern von RhoGEF2 zu suchen und interessante Kandidaten dann gezielt zu analysieren. Da es sich bei RhoGEF2 um ein sehr großes Protein mit mehreren funktionellen Domänen handelt und das Protein neben seiner Funktion bei der Zellularisierung auch an einer Reihe anderer Entwicklungs- und Morphogeneseprozesse beteiligt ist (Barrett et al., 1997; Simões et al., 2006; Kölsch et al., 2007), sollte zunächst untersucht werden, welcher Teil der Aminosäuresequenz die Lokalisation während der Zellularisierung vermittelt und ob diese Lokalisation essentiell für die Funktion des Proteins zu diesem Entwicklungszeitpunkt ist. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Fragmente der RhoGEF2 cDNA-Sequenz so kloniert, daß durch eine *in vitro* Transkription mRNA hergestellt und in Embryonen injiziert werden konnte. Da diese Konstrukte alle epitopmarkiert waren, konnte so durch Immunfärbung die Lokalisation der einzelnen Proteinfragmente analysiert werden (Abb.4.3). Um eine Kompetition der rekombinanten Fragmente mit dem endogenen RhoGEF2-Protein zu vermeiden, erfolgte die Injektion in *RhoGEF2* Embryonen. Zuerst wurde gezeigt, daß myc-RhoGEF2 *full length* nach mRNA Injektion im Embryo erfolgreich am Furchungskanal nachgewiesen werden kann (Abb.4.3 A). Von den vier danach getesteten Fragmenten zeigte nur myc-RhoGEF2/I eine korrekte Lokalisation (Abb.4.3 B). Fragment myc-RhoGEF2/II wies eine deutliche Kernlokalisierung auf (Abb.4.3 C), wohingegen die Fragmente myc-RhoGEF2/III und myc-RhoGEF2/IV diffus zytoplasmatisch verteilt waren (Abb.4.3 D und E). Um den für die Lokalisation von Fragment myc-RhoGEF2/I verantwortlichen Bereich weiter einzugrenzen, wurden zwei Subfragmente getestet, die sich im Bereich der PDZ-Domäne überlappen (nicht gezeigt). Beide Subfragmente zeigten die korrekte Lokalisation. Damit war der Teil von RhoGEF2, der ausreicht, um das Protein am Furchungskanal zu lokalisieren, auf den Bereich der PDZ-Domäne reduziert. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde zunächst eine einzelne Kopie der PDZ-Domäne ge-

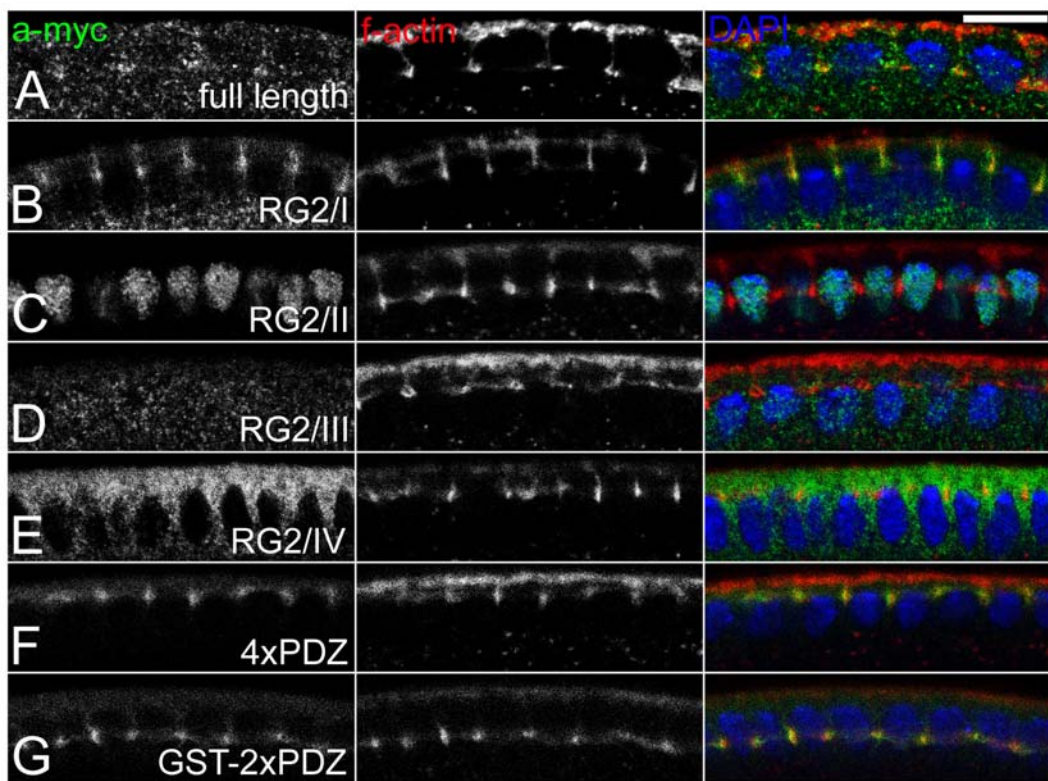
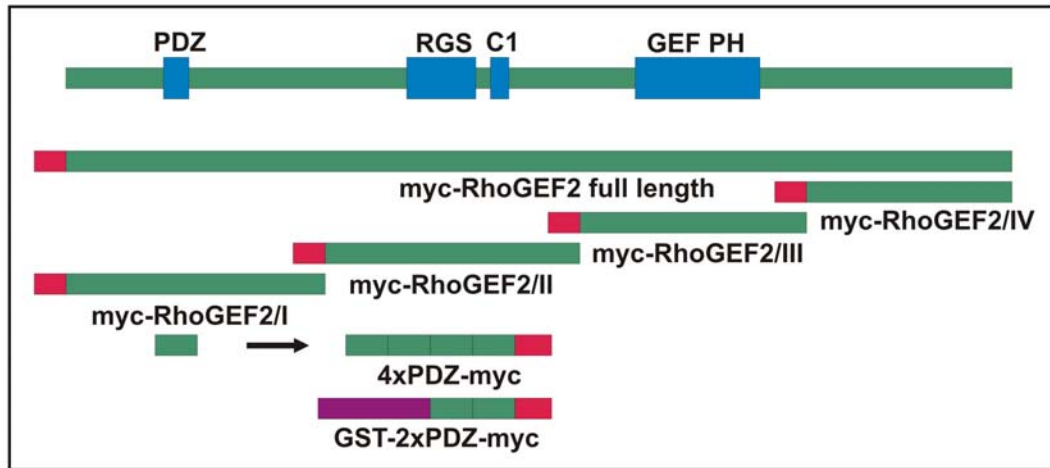


Abbildung 3:

Kartierung der Lokalisationsdomäne von RhoGEF2

Verschiedene epitopmarkierte Fragmente von RhoGEF2 wurden als mRNA in *RhoGEF2^{l(2)04291}* Embryonen injiziert und anschließend immungefärbt. Oben: maßstabsgerechte Darstellung von RhoGEF2 mit allen bekannten Domänen und allen im Injektionsassay untersuchten Proteinfragmenten. Vor der Injektion wurden alle mRNAs nach *in vitro* Translation im Retikulozytenlysat und anschließender SDS-PAGE getestet (nicht gezeigt). Unten: Immunfärbung von Embryonen, die zuvor mit der jeweils angegebenen mRNA injiziert worden waren. Linke Spalte: myc-Antikörperfärbung; Mitte: Phalloidin; Rechts: Überlagerung und DAPI-Färbung. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 10µm.

testet. Dieses Proteinfragment war hauptsächlich in den Zellkernen angereichert (nicht gezeigt). Mit einem berechneten Molekulargewicht von ca 28 kDa lag die Größe des Fragmentes unter der Ausschlußgrenze der Kernporen, was die Akkumulation im Zellkern erklären könnte. Um diesen Effekt zu umgehen und gleichzeitig die Affinität für eine Bindung an den Furchungskanal zu erhöhen, wurden Proteinfragmente mit 2 (nicht gezeigt) bzw. 4 (Abb.4.3 F) hintereinander liegenden PDZ-Domänen auf ihre Lokalisation untersucht. In beiden Fällen konnte eine Furchungskanallokalisierung nachgewiesen werden. Für das unter 4.1.8.2 beschriebene *GST pull down Assay* konnte zudem gezeigt werden, daß die Fusion der PDZ-Domäne an GST keinen Einfluß auf die Lokalisation am Furchungskanal hat (Abb.4.3 G).

4.1.4 Die PDZ Domäne ist notwendig um RhoGEF2 am Furchungskanal zu lokalisieren

Nachdem die PDZ Domäne von RhoGEF2 als der Teil des Proteins identifiziert werden konnte, der für die Lokalisation am Furchungskanal ausreichend ist, sollte nun geklärt werden, ob diese Domäne auch für die Lokalisation notwendig ist. PDZ Domänen sind ca 100 Aminosäuren umfassende globuläre Proteindomänen, die in einer Vielzahl von Proteinen in allen Eukaryoten und in verwandten Varianten auch in Prokaryoten vorkommen. Sie können sowohl Protein-Protein Interaktionen als auch Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Lipiden vermitteln (zusammengefaßt in Jelen et al., 2003; Zimmermann, 2006a; Zimmermann, 2006b). Typisch für PDZ Domänen sind Interaktionen mit kurzen C-terminalen Aminosäuresequenzen (in der Regel die letzten 4-5 Aminosäuren eines Polypeptids). PDZ-Bindemotive findet man oft an den cytoplasmatischen Enden von Transmembranproteinen aber auch in der AS-Sequenz von anderen Proteinen. Die Bindung des Peptid-Liganden erfolgt in der Regel antiparallel in eine hydrophobe Tasche zwischen β -Faltblatt B und α -Helix A nach dem Prinzip der " *β -strand-addition*" (Harrison, 1996). Es gibt C-terminale PDZ-Bindemotive der Klassen I, II und III, die sich jeweils in der Aminosäuresequenz der Positionen 0 und -2 unterscheiden. Die Bindestelle in der PDZ-Domäne ist konserviert und wird auch als "*carboxylate binding loop*" bezeichnet. Sie folgt der Konsensus-Sequenz R/K-XXX-G Φ G Φ (X-beliebiger Rest, Φ -hydrophober Rest). In Abb.4.4 A ist ein Alignment der AS-Sequenzen dieses Motivs der drei *Drosophila*-

PDZ-Proteine RhoGEF2, Dlg und Baz abgebildet. Für die Bindung an PDZ Liganden vom Typ I ist insbesondere der zweite der beiden hydrophoben Reste des $G\Phi G\Phi$ -Motivs von rPDZRhoGEF (...KDQHGFGF...) essentiell (Longhurst et al., 2006). Um mögliche Bindungen der PDZ Domäne von RhoGEF2 vollständig zu eliminieren, wurden deshalb die Aminosäuresubstitutionen Y266A und M268A vorgenommen. Für den Test wurden transgene Fliegenlinien etabliert, die mit myc-Epitopen markierte Varianten von RhoGEF2 unter Kontrolle des *sqh*-Promotors (*myosin regulatory light chain*) ektopisch exprimieren.

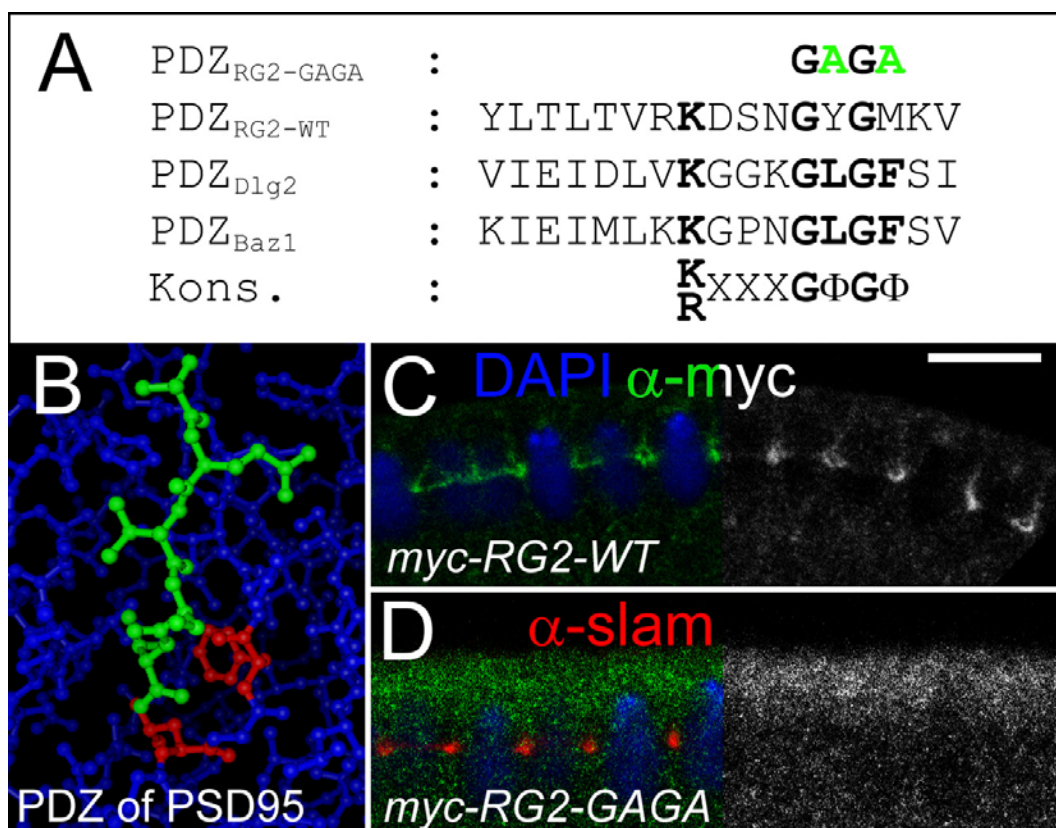


Abbildung 4:

Die Carboxylat-Bindetasche der PDZ-Domäne ist notwendig um RhoGEF2 am Furchungskanal zu lokalisieren

A: Sequenzalignment des konservierten Bindemotivs der PDZ Domänen von RhoGEF2, Dlg (PDZ 2) und Baz (PDZ 1). Die in myc-RG2-GAGA mutierten hydrophoben AS-Reste des $G\Phi G\Phi$ -Motivs sind grün markiert (Φ -hydrophober AS-Rest). B: Position der beiden mutierten AS-Reste am Beispiel der 3D-Struktur der 3. PDZ-Domäne von PSD95 (Doyle et al., 1996; PDB 1be9). (grün: Peptid-Ligand, rot: mutierte hydrophobe Reste der Carboxylat-Bindetasche (im Fall von PSD95 Leu und Phe), blau: PDZ-Domäne). C und D: Immunfärbung von myc-RG2-WT und myc-RG-GAGA im Wildtyp-Hintergrund mit α -myc-Antikörper (grün), α -slam-Antikörper (rot, nur in D) und DAPI (blau). Der weiße Balken entspricht einer Länge von 10 μ m.

Embryonen mit myc-RG2-WT (Abb.4C) und myc-RG2-GAGA (Abb. 4D) wurden fixiert und mit einem anti-myc-Antikörper gefärbt. Während die Färbung der myc-markierten Wildtypform von RhoGEF2 eine ähnliche Lokalisation zeigt wie das endogene Protein (vergleiche Abb.4.1 G), ist die mutierte Variante myc-RG2-GAGA nur diffus im Zytoplasma lokalisiert mit einer leichten Anreicherung im apikalen Bereich über den Zellkernen. Daraus folgt, daß die PDZ-Domäne sowohl ausreichend als auch notwendig ist, um RhoGEF2 am Furchungskanal zu lokalisieren. Die Bindung erfolgt dabei über eine Interaktion mit der Carboxylat-Bindetasche, was die Wechselwirkung mit einem Protein mit C-terminalen PDZ-Bindemotiv wahrscheinlich macht.

4.1.5 Dynamik der Lokalisation von 4xPDZ_{RG2}-RFP

Die Ergebnisse der beiden vorherigen Abschnitte belegen klar, daß die PDZ-Domäne von RhoGEF2 der Teil des Proteins ist, der die Assoziation mit der Membran des Furchungskanals während der Zellularisierung vermittelt. Dementsprechend sollten Untersuchungen zur Lokalisationsdynamik der isolierten PDZ-Domäne im Embryo auch Rückschlüsse auf das Verhalten des vollständigen Proteins erlauben. Zu diesem Zweck wurde analog zum in Abb.4.3 F getesteten PDZ-Konstrukt eine transgene Fliegenlinie mit einer *UAS-4xPDZ_{RG2}-RFP* P-Insertion hergestellt, die mit Hilfe des UAS/GAL4 Systems (Brand & Perrimon, 1993) und entsprechenden maternalen GAL4-Treiberlinien eine Expression von 4xPDZ_{RG2}-RFP während der frühen Embryonalentwicklung erlaubt. Auf diese Weise war es möglich, die Dynamik der Lokalisation des Fusionsproteins *in vivo* zu beobachten. In Abb.4.5 A-D sind Bilder aus einer entsprechenden Timelapse-Aufnahme gezeigt (siehe auch Film 4.1). Das PDZ-Fusionsprotein lokalisiert in den Interphasen zwischen den Teilungen 9-13 an den Zentrosomen und den von ihnen ausgehenden Mikrotubuli. Während der Mitosen findet man es zudem an der Spindel und zu einem gewissen Teil auch an den Pseudocleavagefurchen. Nach Beendigung von Mitose 13 ist es schließlich besonders an der Spitze der invaginierenden Membran, dem Furchungskanal, zu finden, wo es im typischen hexagonalen Muster der sich bildenden Zellen angeordnet ist. Während die Lokalisation an den Pseudocleavagefurchen und am Furchungskanal den Erwartungen entsprach, war die deutliche Assoziation mit den Zentrosomen und den Mikrotubuli der mitotischen Spindel überraschend, da das

vollständige Protein in Antikörperfärbungen von Embryonen zuvor nicht an den Zentrosomen oder den Mikrotubuli detektiert werden konnte. In *Drosophila* S2-Zellen ist zwar eine zentrosomale Lokalisation von endogenem RhoGEF2 beschrieben worden (Rogers et al., 2004), um aber auszuschließen, daß es sich bei den beobachteten Verhalten von 4xPDZ_{RG2}-RFP um ein Artefakt handelt, wurde die Lokalisation des vollständigen RhoGEF2-Proteins mit einem analog hergestellten *UAS-RFP-RhoGEF2* Konstrukt auf die gleiche Weise in transgenen Embryonen untersucht. Dabei ließen sich abhängig von der Stärke der verwendeten Treiberlinie und der Temperatur zum Teil schwere Defekte während der syncytialen Teilungen und in der Zellularisierung beobachten. So kam es zu unvollständigen Teilungen, verbunden mit einem Absinken von kortikalen Zellkernen in den Dotter. Die dominanten Effekte bei der Überexpression von *RFP-RhoGEF2* sind vermutlich auf eine Überaktivität von Rho1 zurückzuführen. Trotz der beschriebenen Probleme konnte RFP-RhoGEF2 jedoch am Zentrosom, an den mitotischen Spindeln und auch am Furchungskanal nachgewiesen werden (Abb.4.5 E-F). Das für 4xPDZ_{RG2}-RFP beobachtete Lokalisationsmuster konnte also auch für das vollständige Protein beobachtet werden. Aufgrund der vergleichbaren Lokalisation beider Fusionsproteine im frühen Embryo und der deutlich besseren Signalstärke bei der Mikroskopie mit 4xPDZ_{RG2}-RFP erscheint für weitere Versuche die Verwendung von 4xPDZ_{RG2}-RFP als Marker für die Lokalisation von RhoGEF2 zulässig.

In S2-Zellen ist für ein GFP-RhoGEF2-Fusionsprotein eine EB1-abhängige Assoziation mit den Plusenden wachsender Mikrotubuli beschrieben worden (Rogers, 2004). Dies konnte auch mit dem hier verwendeten RFP-RhoGEF2 reproduziert werden (siehe Film 4.2 A). Im Embryo war diese Assoziation jedoch nicht nachzuweisen. Neben den beschriebenen dominanten Effekten bei der Expression von RFP-RhoGEF2 liefert dieses Fusionsprotein in Zellen und im Embryo nur ein schwaches Signal, was die Mikroskopie zusätzlich erschwert. Das liegt zum einen an dem stärkeren zytoplasmatischen Hintergrund und zum anderen sicher auch an der Länge des Proteins (erfahrungsgemäß ist die Signalstärke von mit Chromophoren markierten Proteinen im frühen Embryo umso schwächer, je größer das Protein ist). Während es in S2-Zellen dennoch möglich war, die Bindung von RFP-RhoGEF2 an MT-Plusenden zu beobachten, war diese Assoziation im Embryo nicht detektierbar. Da aber EB1-GFP auch im Embryo am Beginn der Zellularisierung

deutlich an den Spitzen der Mikrotubuli sichtbar ist (nicht gezeigt), ist dennoch nicht auszuschließen, daß RhoGEF2 dies auch tut.

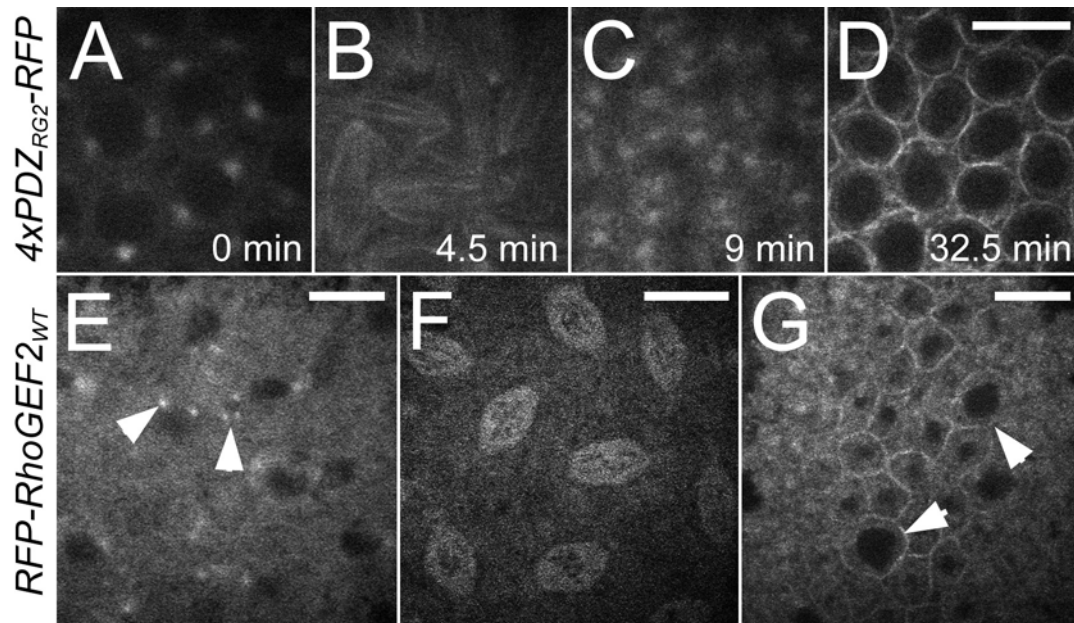


Abbildung 4.5:

Lokalisation von 4xPDZ_{RG2}-RFP und RFP-RhoGEF2 vor und während der Zellularisierung

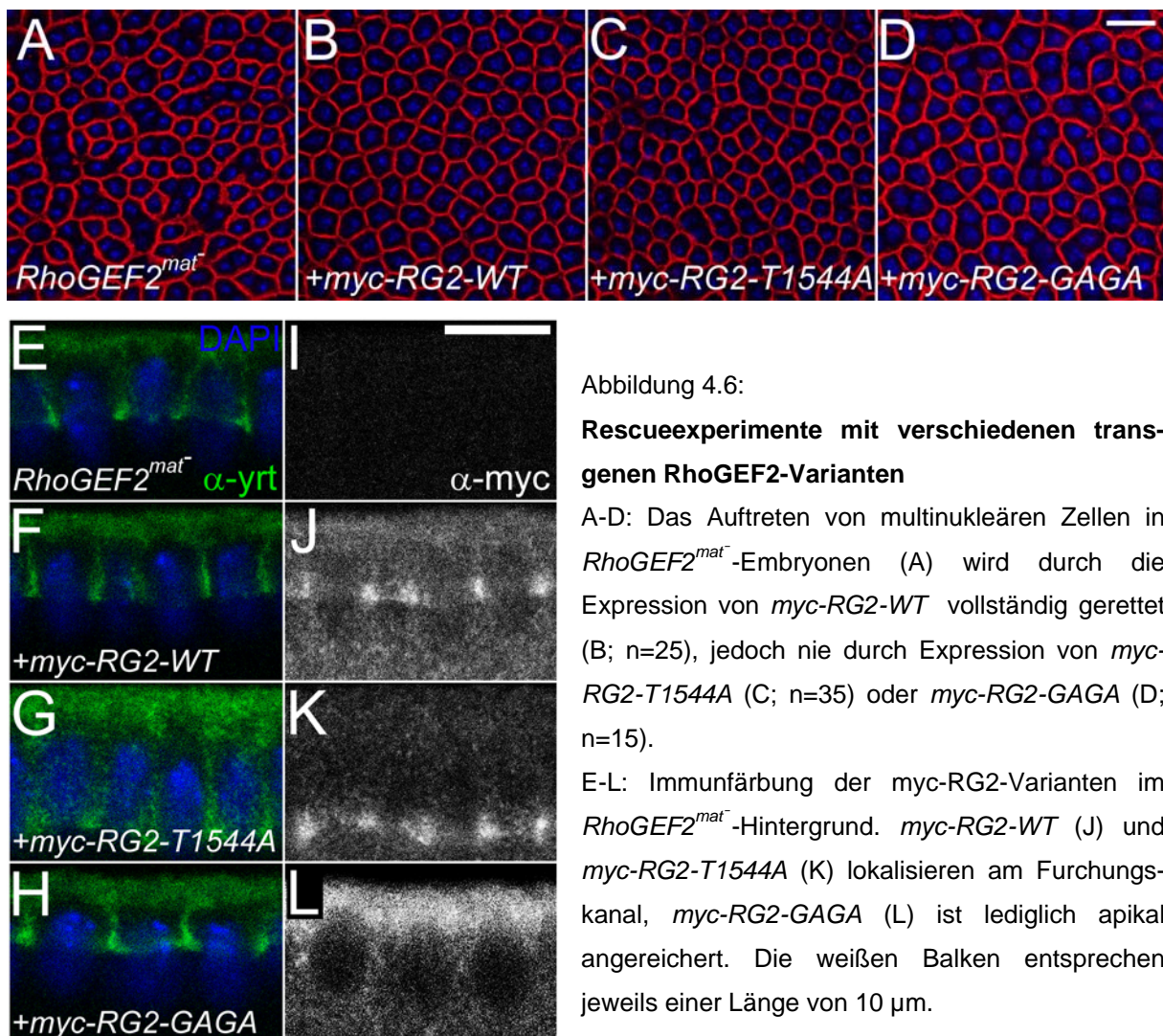
A-D: Bilderserie aus einer Timelapse-Aufnahme eines Embryos mit 4xPDZ_{RG2}-RFP. A: Prophase Zyklus 13, zentrosomale Lokalisation, B: Mitose 13, Lokalisation an den mitotischen Spindeln, C: Beginn Zellularisierung, D: Mitte Zellularisierung, deutliche Lokalisation am Furchungskanal (vergleiche auch Abb.4.9 E)

E-G: Bilder lebender Embryonen mit RFP-RhoGEF2-Expression. E: zentrosomale Lokalisation (Pfeile) erkennbar ist die irreguläre Anordnung der Zellkerne, verursacht durch den Verlust von Kernen als Folge gestörter syncytialer Teilungen, F: Assoziation mit der mitotischen Spindel, G: Lokalisation am Furchungskanal, die Pfeile markieren Zellen mit abnorm großen Kernen. Alle Bilder wurden am Spinning Disk Mikroskop aufgenommen. Der weiße Balken entspricht jeweils 10 µm.

4.1.6 Rettung des Zellularisierungsphänotyps mit myc-RhoGEF2

Um zu klären, ob die PDZ vermittelte Lokalisation von RhoGEF2 am Furchungskanal auch entscheidend für die Funktion des Proteins bei der Bildung des Furchungskanals ist, wurden mit den unter 3.2.11 beschriebenen myc-markierten Konstrukten Rettungsversuche durchgeführt. Dazu wurde jeweils eine Kopie von *myc-RG2-WT* bzw. *myc-RG2-GAGA* in den *RhoGEF2* Hintergrund gekreuzt und Keimbahnklone induziert. Die daraus resultierenden Embryonen haben von der Mutter kein endogenes RhoGEF2 Protein, dafür jedoch die jeweilige myc-markierte

Variante erhalten. Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Formen *myc-RG2-WT* und *myc-RG2-GAGA* wurde mit *myc-RG2-T1544A* auch ein Form des Proteins getestet, die eine Punktmutation in der GEF Domäne trug. Diese Mutation führt dazu, daß bei dem Substrat Rho1 der Austausch von GDP durch GTP nicht mehr katalysiert werden kann, was verhindert, daß Rho1 durch RhoGEF2 aktiviert wird (Zhu et al., 2000; Grosshans et al., 2005). Auf diese Weise würde bestätigt werden, daß für die Funktion von RhoGEF2 bei der Furchungskanalbildung die GEF-Aktivität des Proteins wichtig ist. Da unsere bisherigen Argumente für eine Beteiligung von Rho1 ausschließlich auf *in vitro* Daten beruhen, könnte man auf diese Weise auch ein überzeugendes genetisches Argument liefern. In Abbildung 4.6 sind die Ergebnisse der Versuche zusammengefasst. In *RhoGEF2* Keimbahnklonen lag der Anteil der Embryonen mit multinukleären Zellen bei 100% (Abb.4.6 A, n=25). Trug die Mutter zusätzlich eine Kopie des *myc-RG2-WT*-Transgens, wurde dieser Phäno-



typ vollständig gerettet (4.6 B, n=25). Handelte es sich jedoch um eine Kopie von *myc-RG2-T1544A* (4.6 C, n=35) oder *myc-RG2-GAGA* (4.6 D, n=15) traten die Defekte wiederum in allen Embryonen auf.

Um zu zeigen, daß die getesteten Embryonen auch über vergleichbare Level des jeweiligen transgenen Proteins verfügten, wurden sie mit einem anti-myc-Antikörper unter vergleichbaren Bedingungen gefärbt (Abb.4.6 E-L). Die mikroskopischen Aufnahmen wurden ebenfalls mit den selben Einstellungen vorgenommen, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Während in *RhoGEF2* Keimbahnklonen ohne Rettungskonstrukt keine myc-Färbung zu beobachten war, konnte sowohl *myc-RG2-WT* als auch *myc-RG2-T1544A* am Furchungskanal detektiert werden. Im Gegensatz dazu, aber konsistent mit den Ergebnissen aus Abb.4D lokalisiert *myc-RG2-GAGA* nicht am Furchungskanal, ist aber deutlich exprimiert. Als Resultat lässt sich somit feststellen, daß sowohl die Lokalisation von RhoGEF2 am Furchungskanal, als auch die GEF-Aktivität des Proteins essentiell für die Funktion bei der Bildung des Furchungskanals sind.

4.1.7. Expression von *RhoGEF2* in *Drosophila*-S2-Zellen

Vor der apikalen Konstriktion von Zellen, die der Invagination des Mesoderms während der Gastrulation vorausgeht, kommt es zu einer Relokalisation von RhoGEF2 vom basalen in den apikalen Bereich der Zelle (Grosshans et al., 2005; Kölsch et al., 2007). Ausgehend von der Beobachtung, daß RhoGEF2 in S2-Zellen mit den Plusenden wachsender Mikrotubuli (Rogers et al., 2004) assoziiert, wurde ein Modell vorgeschlagen, nachdem dieser mikrotubulibasierte Transport zur Akkumulation in der apikalen Zellregion beiträgt, indem RhoGEF2 an der Spitze von Mikrotubuli in die Nähe des Zellkortex gelangt, das Protein dann jedoch nur durch einen am apikalen Kortex lokalisierten Rezeptor dort verankert werden kann. Ein Problem dieses Modells ist, daß bisher nicht gezeigt werden konnte, daß die Dynamik des Wachstums von Mikrotubuli innerhalb einer solchen ventralen Zelle polarisiert (d.h. bevorzugt in die apikale Region der Zelle) abläuft. Da das Wachstum von Mikrotubuli auch durch die Diffusion der monomeren Tubulin-Untereinheiten zum jeweiligen Plusende limitiert ist, sollte sich auch die Geschwindigkeit mit der sich RhoGEF2 auf diese Weise innerhalb des Zytoplasmas fortbewegen kann nicht signifikant von der einer einfachen Diffusion unterscheiden. Dementsprechend wäre

der gleiche Effekt auch ohne die kompliziert erscheinende Mikrotubuliassoziation denkbar.

Bleibt die Frage, warum es sie dennoch gibt. Die Untersuchung der Lokalisierung von RhoGEF2 am Furchungskanal am Beginn der Zellularisierung könnte dazu beitragen, diese Frage zu beantworten. Um zu testen, ob die Mutationen in der PDZ Domäne, die dazu führen, daß das Protein nicht mehr am Furchungskanal lokalisiert, auch die Assoziation von RhoGEF2 mit den Plusenden von Mikrotubuli beeinträchtigt, wurden S2-Zellen mit RFP-RG2-WT bzw. RFP-RG2-GAGA transfiziert und in Timelapseaufnahmen untersucht (Film 4.2). Dabei wurde deutlich, daß die Bindung von RhoGEF2 an die MT-Plusenden nicht durch die Mutation der PDZ-Domäne beeinflußt wird. Auch in Zellen, die mit dem 4xPDZ_{RG2}-RFP Konstrukt transfiziert wurden, konnte genau wie im Embryo keine Plusend-Assoziation beobachtet werden (nicht gezeigt).

4.1.8 Suche nach physikalischen Interaktoren für die RhoGEF2-PDZ Domäne

4.1.8.1 *Yeast-Two-Hybrid Screen*

Durch die Kartierung der Lokalisationsdomäne von RhoGEF2 war es möglich genomweit nach Proteinen zu suchen, die physikalisch mit der isolierten PDZ-Domäne interagieren. Mit Hilfe des *Yeast-Two-Hybrid-Systems* (Fields & Song 1989) wurde ein Screen ausgeführt, in dem eine LexA-PDZ_{RG2}-Fusion als *bait* eingesetzt wurde. Die aus Ovarien isolierten cDNA-Fragmente der verwendeten *prey*-Bibliothek waren mit der DNA-Sequenz der transaktivierenden Domäne von Bx42 fusioniert (Grosshans et al., 1999). Es wurde eine Gesamtzahl von ca $1,5 \cdot 10^6$ transformierten Hefeklonen im *LEU*-Reporterassay getestet. 959 der dabei gefundenen positiven Klone wurden in einem zweiten Schritt im *lacZ*-Reporterassay untersucht. Hier konnten 176 positive Klone isoliert werden. Von diesen 176 Klonen konnten 140 nach PCR-Amplifikation und anschließender Sequenzierung des jeweiligen cDNA-Fragments eindeutig einem Gen zugeordnet werden. Insgesamt wurden so 44 verschiedene Gene identifiziert, die in Tabelle 4.1 zusammengefasst sind. Das mit Abstand am häufigsten gefundene Gen (40%) war ERp60, ein Enzym des endoplasmatischen Retikulums mit Disulfid-Isomerase-Aktivität. Der Anteil der Proteine mit einem bekannten PDZ-Bindemotiv am C-Terminus lag bei 75%. Somit

Tabelle 4.1:

Im Yeast-Two-Hybrid-Screen identifizierte Bindungspartner für die PDZ-Domäne von RhoGEF2

Proteine mit einem PDZ Bindemotiv der Klasse I, II oder III sind grau hinterlegt

Nr	Gen	Anzahl der Klone	C-Terminus	Annotation
1	ERp60	55	-KTEL	Disulfidisomerase, endopl. Reticulum
2	scf	9	-HDEF	DNA-Topoisomerase-Aktivität
3	CG8507	9	-HTEL	Alpha-2-macroglobulin-RAP
4	CG9066	6	-STDC	Heme/Steroid-Bindedomäne, Rezeptoraktivität
5	CG9795	5	-ITDL/-WLKT	unbekannt
6	CG1344	5	-VSTL	Proteinkinase-Aktivität
7	CG5053	5	-GVVW	Ras-Bindedom., Smc-Domäne
8	Actn	5	-ETDL	Aktin-Crosslinking, cytoskel. Verankerung
9	Rtnl1	4	-EKDK	Rezeptorsignaling-Akt., endopl. Retikulum
10	CG5362	4	-VSNL	L-Malat Dehydrogenase Aktivität; TCA-Zyklus
11	blot	4	-STEL	TM-Protein, Na/Ci-Neurotransmitter-Symporter
12	CG31961	3	-ISII	Tubulin-Chaperon, Membran
13	CG2918	3	-HSEL	Chaperon
14	Taf8	3	-KTNL	RNA Polymerase II Transkriptionsfaktor-Aktivität
15	Adam	3	-DDFM	Translations-Initiationsfaktor-Aktivität
16	yrt	3	-TTQL	FERM-protein, negativer Crumbs Regulator
17	CG6156(Mcc)	2	-ETTL	Zellzyklus, G1-S Übergang
18	Mec2	2	-KTNL	Mechanosensor, Zytoskelett, Membran
19	CG12375	2	-TSAL	Hydrolase-Aktivität
20	CG31012	2	-NWMF/-VTQV	SH3/SH2 Adapter-Aktivität, Rezeptorbindung
21	CG11098	2	-YSEV	Smc-Domäne, ATPase, Chromosomensegregation
22	Pros26.4	2	-GLYL	Proteasomkomplex
23	CG18745	1	-GTWL	Arrestin
24	Cp19	1	-SSGY	struktureller Bestandteil des Chorions
25	CG6856	1	-FLNG	unbekannt
26	CG17510	1	-KREK/-MARK	unbekannt, weniger als 100 AS
27	CG3638	1	-VTEL	TM-Protein, Homologie zu Ionenkanälen
28	Sry-beta	1	-VTFF	DNA-Bindung, Zinkionen-Bindung
29	CG8291	1	-TSVI	TM-Protein, Neurotransmitter:Na-Symporter-Akt.
30	CG5780	1	-TQYT	unbekannt
31	T48	1	-TTEL	TM-Protein, Funktion in Gastrulation
32	CG10413	1	-STTL	TM-Protein, Na:K:Cl Symporter Aktivität
33	CG30085	1	-SSNL	unbekannt, homolog zu Rap1/Rif1
34	fry	1	-VTNL	Morphogenese von Flügelhäuten, Dendriten
35	Nurf-38	1	-IHLK	Di-Phosphatase-Aktivität, Chromatin-Remodeling
36	PGRP-LE	1	-EEEQ	TM-Protein, Immunrezeptor
37	gukh	1	-ETAL/-STFL	interagiert mit Dlg u. PDZ-Domäne von Scribbled
38	CG30001	1	-VMFS	unbekannt
39	CG5740	1	-ITAV	SMC-Domäne, Chromosomensegregation
40	CG9641	1	-TCSL	unbekannt
41	Actr13E	1	-INQR	Actin related protein, Arp2/3-Komplex
42	Map60	1	-ELEQ	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
43	fs(1)K10	1	-IPNP	mRNA Lokalisation
44	l(2)35Bg	1	-KSDI	unbekannt

ist klar, daß der hier durchgeführte Screen gut geeignet ist, um potentielle PDZ-Bindepartner zu finden. Von den Proteinen, deren Aminosäuresequenz kein bekanntes PDZ-Bindemotiv am C-Terminus aufweist, ist denkbar, daß die beobachtete Interaktion mit der PDZ-Domäne von RhoGEF2 nicht über den C-Terminus vermittelt wird. Ein solches Bindungsverhalten ist für einige PDZ-Domänen beschrieben worden (Jelen et al., 2003).

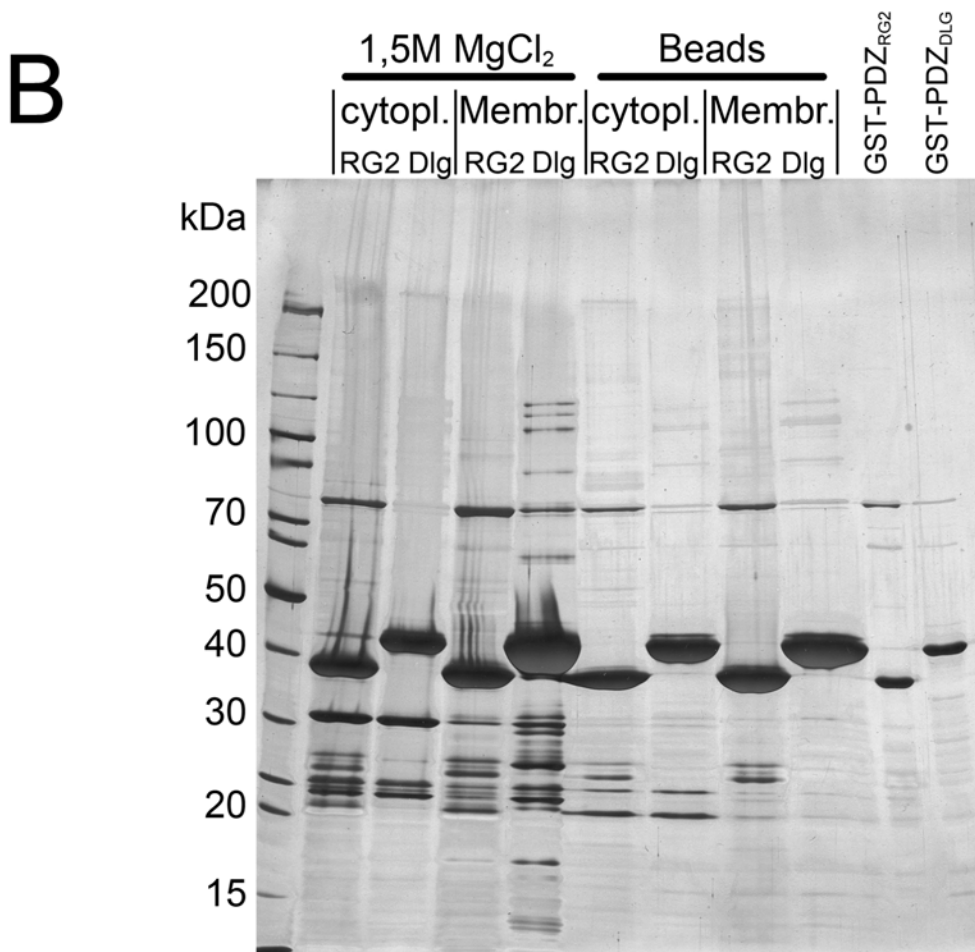
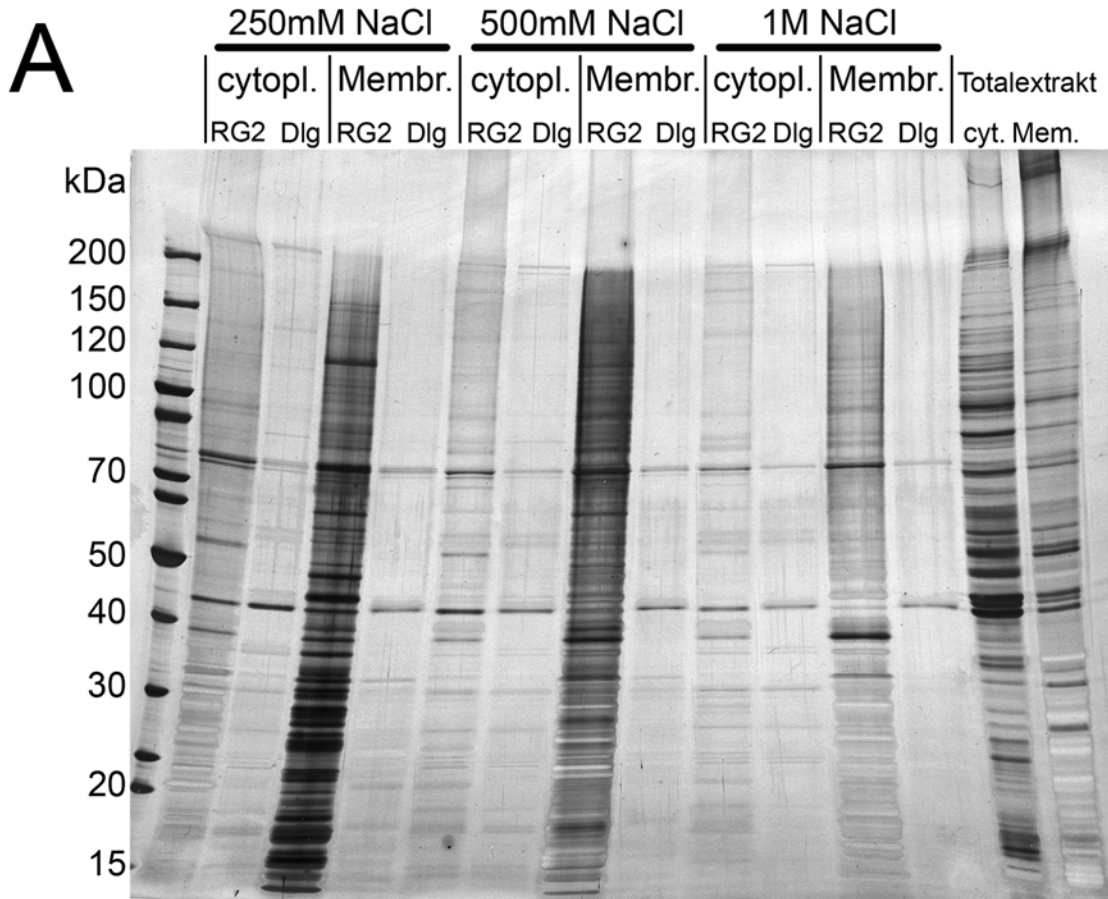
4.1.8.2 GST pull down Assay mit Embryonalextrakten

Bei der Suche nach physikalischen Interaktoren der RhoGEF2-PDZ Domäne wurde als Alternative zum *Yeast-Two-Hybrid-Screen* auch ein biochemischer Ansatz gewählt. Dazu wurden mögliche Bindepartner aus embryonalen Proteinextrakten isoliert und anschließend massenspektrometrisch identifiziert. Diese Methode bietet gegenüber dem *Yeast-Two-Hybrid-Screen* einige Vorteile. Zum einen ist es möglich, Extrakte aus Embryonen herzustellen, die sich im in Frage kommenden Entwicklungsstadium befinden. Speziell bei Proteinen wie RhoGEF2, die im Laufe der Entwicklung verschiedene Funktionen haben, kann man so gezielter nach Bindepartnern suchen, die für den zu untersuchenden Prozess tatsächlich relevant sein könnten. Zudem erlaubt diese Methode den direkten Vergleich mit anderen PDZ-Domänen, um solche Faktoren zu isolieren, die spezifisch an die PDZ-Domäne von RhoGEF2 binden. Ein solcher Spezifitätstest ist zwar auch im *Yeast-Two-Hybrid-System* möglich aber erheblich aufwendiger. Schließlich kann man den verwendeten Extrakt biochemisch fraktionieren und so beispielsweise Kernproteine, die vermutlich keine Rolle bei der Lokalisation von RhoGEF2 an der Membran des Furchungskanals spielen, ausschließen, indem man die intakten Zellkerne durch Zentrifugation vom übrigen Zellinhalt trennt. Der so erhaltene Extrakt kann dann wiederum in einen zytoplasmatischen Anteil, der alle löslichen Proteine enthält, und eine Membranfraktion, in der durch Einsatz von Detergenzien besonders membranassoziierte Polypeptide und Transmembranproteine angereichert sind, aufgetrennt werden. Da PDZ-Domänen häufig mit den C-terminalen Enden von Transmembranproteinen interagieren und eine Assoziation von RhoGEF2 mit einem Membranprotein am Beginn der Zellularisierung sehr plausibel erscheint, würde man die interessantesten potentiellen Bindepartner in genau dieser Membranfraktion erwarten.

Für den vorliegenden Versuch wurden GST-PDZ_{RG2}-6xHis (PDZ Domäne von RhoGEF2, AS 240...350) und GST-PDZ_{Dlg2}-6xHis (2. PDZ Domäne von Dlg, AS 126..293) in *E-coli* exprimiert und über eine Nickelaffinitätssäule gereinigt. Die Proteine wurden dann an Glutathion-Sepharose-Beads gebunden und jeweils mit den aus 2-3h alten WT-Embryonen hergestellten Proteinextrakten, die zuvor wie beschrieben fraktioniert worden waren, inkubiert. Danach wurden die Beads gewaschen, gebundene Proteine wurden zunächst mit steigenden NaCl-Konzentrationen, schließlich mit 1,5M MgCl₂ eluiert und auf einem Polyacrylamidgel analysiert. (Abb 4.7 A und B). Interessante Banden wurden aus einem speziell gefärbten Polyacrylamidgel ausgeschnitten (Abb. 4.7 C) und massenspektrometrisch identifiziert. Der gesamte Versuch wurde mehrere Male wiederholt. In Tabelle 4.2 sind alle dabei identifizierten Proteine aufgeführt.

Auffällig war, daß an die PDZ Domäne von RhoGEF2 sowohl aus der cytoplasmatischen Fraktion (vergleiche Abb 4.7 A Bahnen 1 und 2, 5 und 6, 9 und 10) als auch aus dem Membranextrakt (Bahnen 3 und 4, 7 und 8, 11 und 12) wesentlich mehr Proteine binden konnten als an die PDZ Domäne von Dlg. Da auch der Vergleich mit einer PDZ Domäne von Bazooka ein ähnliches Bild ergab (nicht gezeigt), bleibt festzustellen, daß die unspezifische Proteinbindeaffinität von RhoGEF2-PDZ deutlich erhöht ist, was die Identifizierung spezifischer Bindepartner erschwerte.

So konnten neben Chaperonen und ribosomalen Proteinen, mRNA bindenden Proteinen und Enzymen nur wenige aussichtsreiche Kandidaten gefunden werden. Obwohl aus den bereits genannten Gründen vorzugsweise Proteine aus der Membranfraktion für die Massenspektrometrie ausgewählt worden waren, konnte kein einziges Transmembranprotein und nur ein als membranassoziiert annotiertes Protein gefunden werden (CG11999). Die Qualität der angewendeten Fraktionierungsmethode war in einem Vorversuch getestet worden, indem Proben von cytoplasmatischer und Membranfraktion im Western-Blot mit einem Antikörper gegen das Transmembranprotein Neurotactin untersucht worden waren (nicht gezeigt). Dabei konnte Neurotactin fast ausschließlich in der Membranfraktion und nicht in der cytoplasmatischen Fraktion nachgewiesen werden. Von den 18 dennoch identifizierten Proteinen besitzen 8 (<50%) ein PDZ-Bindemotiv der Klasse I oder II am C-Terminus. Zudem konnten 5 Proteine, die zuvor bereits im Yeast-Two-Hybrid-Screen als Interaktionspartner der PDZ-Domäne von RhoGEF2 identifiziert worden



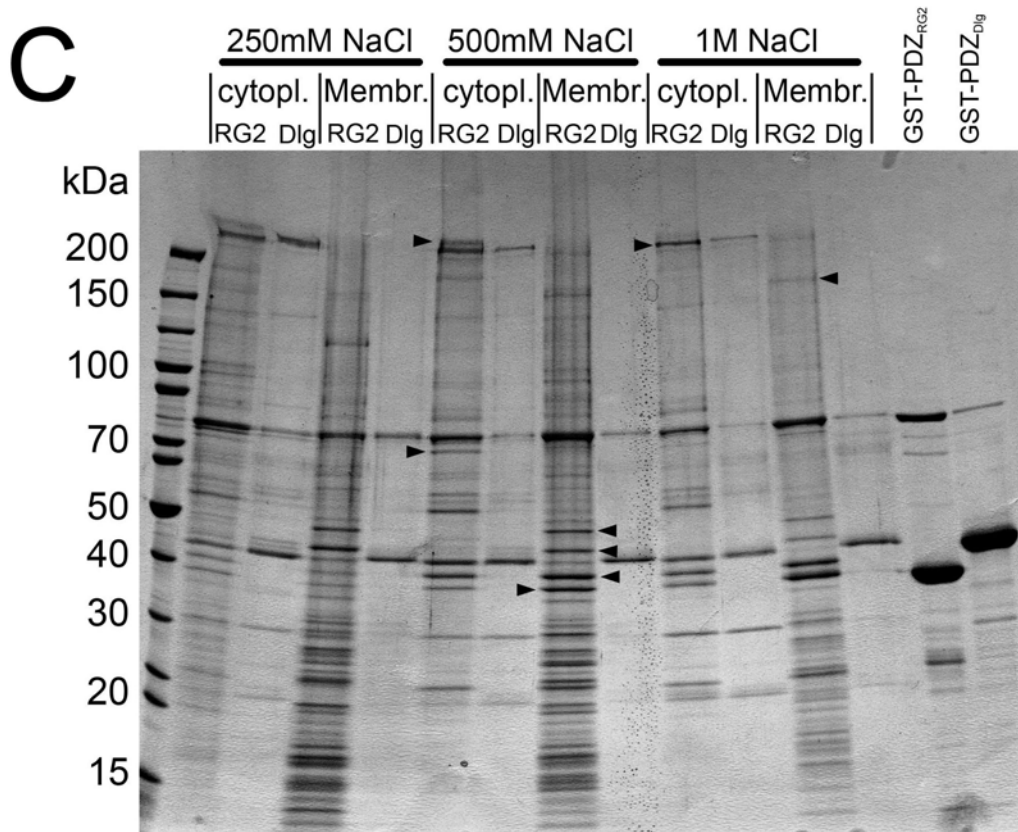


Abbildung 4.7:

Bindung von Proteinen aus fraktionierten Embryonalextrakten an die PDZ Domänen von RhoGEF2 und Dlg

GST-PDZ_{RG2} und GST-PDZ_{Dlg} wurden an Gluthathion-Sepharose-Beads gebunden und mit fraktioniertem Proteinextrakt aus 2-3h alten WT-Embryonen inkubiert. Die von den Beads nach dem Waschen eluierten Proteine wurden auf einem Polyacrylamid-Gradientengel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Silberfärbung sichtbar gemacht (A und B). Zunächst wurde mit steigenden NaCl-Konzentrationen eluiert (A), schließlich mit MgCl₂ (B). Danach noch an den Beads gebundene Proteine wurden mit Laemmli-Probenpuffer eluiert (B). In den letzten beiden Bahnen wurden Proben der eingesetzten fraktionierten Proteinextrakte (A) bzw. der gereinigten GST-PDZ Fusionsproteine (B) aufgetragen. Für die massenspektrometrische Identifizierung von Proteinbanden wurde das Gel mit Colloidal-Coomassie gefärbt (C). Die Belegung entspricht der von Gel A, mit dem Unterschied, daß in den letzten beiden Bahnen Proben von GST-PDZ_{RG2} und GST-PDZ_{Dlg} geladen wurden. Ausgeschnittene Banden sind mit kleinen Pfeilen markiert.

waren, auch aus den embryonalen Proteinextrakten isoliert werden. Alle 5 Proteine haben ein C-terminales PDZ-Bindemotiv.

Tabelle 4.2:

Durch Massenspektrometrie identifizierte Bindepartner der PDZ-Domäne von RhoGEF2

Proteine mit PDZ-Bindemotiv am C-Terminus sind grau hinterlegt. Bindepartner, die bereits im *Yeast-Two-Hybrid*-Screen gefunden wurden, sind zudem unterstrichen.

Nr.	Gen	C-Terminus	Funktion
1	CG4164	-YNGL	Chaperon
2	CG11999	-HSEL	MIR-Domäne, membranassoziiert
3	<u>CG2918</u>	-HSEL	Chaperon
4	CG5520	-HDEL	Chaperon
5	CG4147	-KDEL	Chaperon
6	<u>CG6156 (Mcc)</u>	-ETTL	Zellzyklus, G1-S Übergang
7	CG4863	-TTSA	ribosomales Protein
8	CG11844	-PTLC	mRNA bindend
9	CG5502	-AAKK	ribosomales Protein
10	<u>fry</u>	-VTNL	Borsten- und Dendritenmorphogenese
11	zip	-DSAN	<i>Myosin heavy chain</i> , Motorprotein
12	CG9805	-VKRR	Translations-Initiationsfaktor
13	Pep	-YNYR	bindet an Nukleinsäuren, mRNA Splicing
14	<u>CG1344</u>	-VSTL	bindet ATP, Proteinkinaseaktivität
15	<u>CG9641</u>	-TCSL	unbekannt
16	Top2	-DFNC	DNA Topoisomerase Typ II
17	Su(z)12	-CVGN/-YERR	Histon Lysin N-Methyltransferase
18	dFMR1	-NGTS/-RDTN	KH Domäne, bindet RNA, Translationsregulation

4.1.9 Untersuchung ausgewählter möglicher Bindepartner

Unter den 54 in den beiden vorherigen Abschnitten identifizierten möglichen Bindepartnern für die PDZ-Domäne von RhoGEF2 wurden einige aufgrund verschiedener Kriterien für eine weitergehende Analyse ausgewählt. So wurden bspw. Chaperone, Enzyme, Transkriptionsfaktoren, ribosomale Proteine und ER-Proteine aussortiert. Bei diesen ist eine Rolle bei der Rekrutierung von RhoGEF2 an den Furchungskanal unwahrscheinlich. Dahingegen kamen Transmembranproteine, zytoskelett- und membranassoziierte Faktoren sowie Proteine mit unbekannter Sequenz und Funktion für eine weitergehende Analyse in Betracht. Unter diesen wurde nach Begutachtung der jeweiligen Literatur weiter selektiert. Ein weiteres Kriterium war die Verfügbarkeit von Materialien wie Antikörpern, mutanten

Fliegenlinien usw. Soweit Antikörper zur Verfügung standen, wurde die Lokalisation des jeweiligen Proteins in der Zellularisierung untersucht. Auf einige Gene soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

fry

Eines der Proteine, die mit beiden Methoden als Bindepartner der PDZ-Domäne von RhoGEF2 isoliert werden konnten ist Fry. Bei Fry handelt es sich um ein großes konserviertes Protein ohne bekannte funktionelle Domänen, aber mit einem PDZ-Bindemotiv am C-Terminus. In *Drosophila* kontrolliert Fry zusammen mit der Kinase Trc die Ausbildung und Morphogenese der Flügelhärschen und die dendritische Verzweigung sensorischer Neuronen (Cong et al., 2001; Emoto et al., 2004). Die dem zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen liegen jedoch noch weitgehend im Dunkeln. Über die subzelluläre Lokalisation des Proteins ist wenig bekannt, man hat es bisher nur im Soma und in den Axonen und dendritischen Verzweigungen von sensorischen Neuronen des 3.Larvenstadiums nachgewiesen. Der dabei verwendete Antikörper konnte aber benutzt werden, um die Fry-Lokalisation im frühen Embryo zu untersuchen. Dabei konnte das Protein jedoch nicht detektiert werden (nicht gezeigt), was eine funktionelle Rolle in der Zellularisierung zwar nicht ausschließt, aber doch unwahrscheinlich macht.

yrt

Bei Yrt handelt es sich um ein Protein der FERM-Familie, das als negativer Regulator Teil des Crumbs-Komplexes ist und an der Etablierung epithelialer Zellpolarität beteiligt ist (Laprise et al., 2006). FERM Proteine dienen oft als Bindeglied zwischen der Plasmamembran und dem Aktin-Zytoskelett. Sie besitzen in der Regel eine FERM Domäne, die oft an Transmembranproteine mit einer FERM-Binde-Domäne (FBD) im cytoplasmatischen Teil binden. Zudem besitzen diese Proteine oft auch eine aktinbindende Domäne (die aktinbindende Domäne des FERM-Proteins moesin ist in dieser Arbeit zur Untersuchung von Aktindynamik eingesetzt worden). In der AS-Sequenz von Yrt findet sich jedoch nur eine FERM-Domäne im N-terminalen Teil des Proteins und ein PDZ-Binde-Motiv der Klasse 1 am C-Terminus. Das Protein war ein besonders interessanter Kandidat, weil bekannt war, daß es während der

Zellularisierung am Furchungskanal angereichert ist. Es lokalisiert jedoch auch entlang der gesamten basolateralen Membran.

Da es Mutanten gab, mit denen Keimbahnklone induziert werden konnten bestand die Möglichkeit, den Phänotyp von *yrt*-Embryonen während der Zellularisierung im Detail zu untersuchen. In DIC-Timelapseaufnahmen konnten anders als bei RhoGEF2-Mutanten keinerlei Abweichungen vom Wildtyp festgestellt werden (nicht gezeigt). In Phalloidinfärbungen fixierter *yrt*-Embryonen konnten keine Lücken in der hexagonalen Aktinlokalisierung beobachtet werden (nicht gezeigt). Schließlich wurden im *yrt*-Hintergrund auch keinerlei Unterschiede in der Furchungskanallokalisierung von RhoGEF2 oder 4xPDZ_{RG2}-RFP (nicht gezeigt) entdeckt. Da diese Analysen mit einem amorphen *yrt*-Allel durchgeführt wurden, scheint die physikalische Interaktion zwischen dem C-Terminus von Yrt und der PDZ-Domäne von RhoGEF2 für die Zellularisierung nicht relevant zu sein.

Map60

Map60 (auch CP60) ist ein mikrotubuliassoziiertes Protein, das keine Homologie zu MAPs anderer Spezies aufweist. Es konnte im Komplex mit CP190, einem ebenfalls mikrotubuli- und zentrosomenassoziiertem Protein, isoliert werden (Kellogg and Alberts, 1992). Map60 zeigt eine zellzyklusabhängige exklusive Lokalisation am Zentrosom und den Mikrotubuli. Während der Interphase ist es im Zellkern zu finden (Oegema et al., 1997). Da auch RhoGEF2 bzw. 4xPDZ_{RG2}-RFP außer am Furchungskanal am Zentrosom und an den Mikrotubuli der mitotischen Spindeln zu finden sind, bisher aber unklar ist, ob diese Lokalisation auch mit einer physiologischen Funktion verbunden ist, wurde die Lokalisation von RhoGEF2 und 4xPDZ_{RG2}-RFP in *Map60* mutanten Embryonen untersucht. Die dabei verwendete Mutation wird durch eine P-Element-Insertion in der codierenden Sequenz verursacht (<http://flybase.bio.indiana.edu>). Ein großer Teil der codierenden Sequenz bleibt dabei unversehrt, so daß eine eventuelle Restfunktion des Proteins erhalten bleiben könnte. Die Mutation ist homozygot lebensfähig und fertil. In Embryonen sind teilweise Defekte während der syncytialen Teilungen sichtbar. Dieser Phänotyp ist jedoch sehr variabel, was ein weiteres Argument für die hypomorphe Natur des P-Allels liefert. Die mit Immunfärbung untersuchte RhoGEF2-Lokalisation ist nicht verändert (Abb.4.8 B) und auch 4xPDZ_{RG2}-RFP lokalisiert weiterhin sowohl an den

Zentrosomen und den Spindelmikrotubuli als auch am Furchungskanal (nicht gezeigt). Somit ist wahrscheinlich, daß die Lokalisation von RhoGEF2 am Zentrosom und den Spindel-Mikrotubuli unabhängig von Map60 erfolgt.

T48

Bei T48 handelt es sich um ein Transmembranprotein mit C-terminalem PDZ I Bindemotiv. Das Protein weist keinerlei Sequenzhomologie zu bekannten Proteinen auf. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, daß T48 *in vitro* an die PDZ-Domäne von RhoGEF2 bindet (Kölsch et al., 2007). Das Protein ist darüber hinaus in der Lage RhoGEF2 in S2-Zellen und auch in frühen *Drosophila*-Embryonen an die Plasmamembran zu rekrutieren. Amorphe Mutationen in T48 sind homozygot lebensfähig und fertil. T48 defiziente Embryonen zeigen eine normale Zellularisierung und einen schwachen Phänotyp während der Invagination der mesodermalen Zellen in der Gastrulation. Die Expression des Gens bleibt auf das prospektive Mesoderm beschränkt. Das Protein lokalisiert apikal an der Plasmamembran. Obwohl für T48 eine Beteiligung an der RhoGEF abhängigen apikalen Konstriktion der mesodermalen Zellen während der Gastrulation gezeigt werden konnte, scheidet das Gen aufgrund des Phänotyps, des Expressionsmusters und der Proteinlokalisierung als potentieller Bindepartner von RhoGEF2 am Beginn der Zellularisierung aus.

blot

Von den hier getesteten potentiellen RhoGEF2 Bindepartnern ist auch *blot* ein interessanter Kandidat. Bei dem Genprodukt von *blot* handelt es sich um ein Transmembranprotein mit 12 Transmembrandomänen. Die AS-Sequenz weist Homologien zu Natrium- und Chlorid-abhängigen Neurotransmitter-Symportern von Vertebraten auf. Überraschenderweise ist für *blot* eine essentielle Funktion während des syncytialen Blastoderm-Stadiums beschrieben worden (Johnson et al., 1999). Über die Proteinlokalisierung ist nichts bekannt. Während die frühen syncytialen Teilungen in *blot*-Embryonen scheinbar normal ablaufen, zeigen sich Defekte kurz nachdem die Zellkerne die Peripherie des Embryos erreichen. Aktinkappen, Pseudocleavagefurchen und Furchungskanäle bilden sich nicht. Die Zellularisierung findet nicht statt. Bei Färbungen fixierter *blot*-Embryonen fällt auf, daß die Integrität

der Plasmamembran stark beeinträchtigt ist. Wie Blot als putativer Neurotransmitter eine solche Funktion im frühen Embryo haben kann ist unklar. Funktionen von Neurotransmittern außerhalb des Nervensystems sind bisher nicht beschrieben. Aufgrund des Phänotyps konnte die RhoGEF-Lokalisation während der Zellularisierung nicht untersucht werden.

CG9795

CG9795 ist ein Protein ohne bekannte funktionelle Domänen. Mit Hilfe des im *Yeast-Two-Hybrid* Screen isolierten cDNA Fragmentes, das die vollständige codierende Sequenz von CG9795 enthält, wurde ein Konstrukt hergestellt, in dem die codierende Sequenz am N-Terminus mit 3 Kopien des HA-Epitops fusioniert wurden. Die Lokalisation dieses epitopmarkierten Fusionsproteins wurde nach entsprechender mRNA Injektion im Embryo untersucht (Abb.4.8 A).

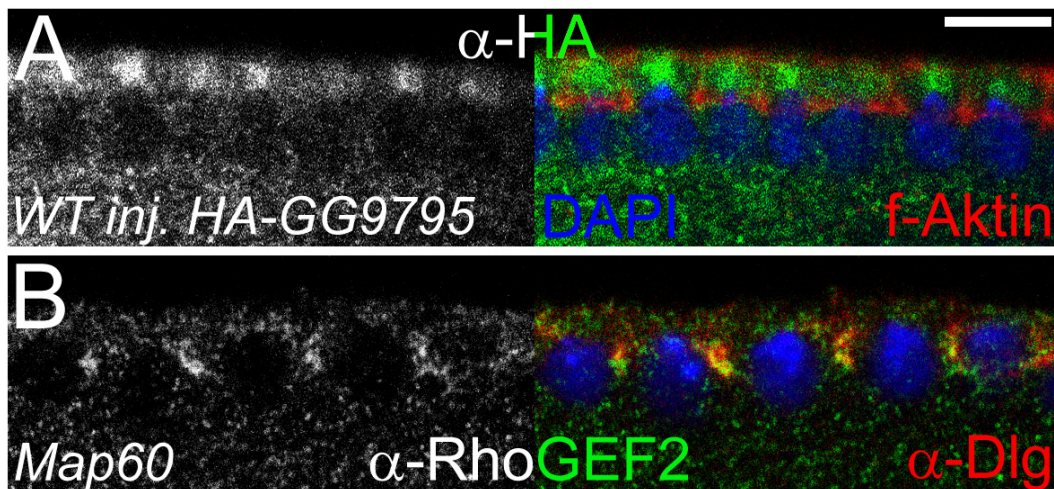


Abbildung 4.8

Lokalisation von HA-CG9795 nach mRNA Injektion in Wildtypembryonen und RhoGEF2 Lokalisation in *Map60* Embryonen

A: Immunfärbung von zuvor mit für HA-CG9795 codierender mRNA injizierten Wildtypembryonen. Das epitopmarkierte Protein ist pericentrosomal angereichtert. B: Die Furchungskanallokalisierung von RhoGEF2 ist in *Map60* Embryonen nicht beeinträchtigt. (weißer Balken = 10 µm)

Dabei wurde festgestellt, daß das Protein diffus perizentrosomal zwischen Kern und Plasmamembran, jedoch nicht am Furchungskanal angereichtert ist. Die Untersuchung von Mutanten ist nicht möglich, da das Gen zu nahe am Centromer liegt

und so das FLP/FRT System zur Generierung von Keimbahnklonen nicht eingesetzt werden konnte.

4.2 *in vivo* Analyse der Furchungskanalbildung mit Hilfe verschiedener fluoreszenzmarkierter Markerproteine

4.2.1 *in vivo* Marker

Ein großer Teil der gegenwärtigen Erkenntnisse über die Zellularisierung in *Drosophila* basiert auf der Analyse fixierter Embryonen. Um die bei der Initiation der Zellularisierung ablaufenden Prozesse mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung verfolgen zu können, wurden mit Hilfe des Spinning Disc Mikroskops Timelapseaufnahmen von verschiedenen transgenen Fliegenembryonen während der Zellularisierung gemacht. Zur Analyse der Furchungskanalbildung kamen dabei neben DE-cadherin-GFP auch moe-GFP/RFP sowie 4xPDZ_{RG2}-RFP als Marker für den Furchungskanal zum Einsatz. Abbildung 4.9 gibt einen Überblick über die Lokalisation der genannten Marker in fixierten Embryonen.

Als Transmembranprotein lokalisiert E-cadherin hauptsächlich an der Plasmamembran, wo es über die *Cadherin Repeats* des extrazellulären Teils homophile Bindungen mit anderen E-cadherin Molekülen eingehen kann und somit eine wichtige Rolle bei der Etablierung von Zell-Zell-Kontakten spielt. Während Slam nahezu ausschließlich am Furchungskanal lokalisiert, findet sich E-cadherin entlang der gesamten apikalen und basolateralen Membran mit einer Konzentrierung an den Stellen, an denen sich bildende benachbarte Zellen direkten Membrankontakt haben (Abb.4.9 C und D).

Die Verwendung der an GFP fusionierten, aktinbindenden Domäne von Moesin als Marker für f-Aktin ist eine etablierte Methode um Aktindynamiken zu untersuchen und bereits mehrfach angewendet worden (Kiehart et al., 2000). Filamentöses Aktin lokalisiert während der Interphase der syncytialen Teilungen 10-13 in apikalen Aktinkappen und während der Mitosen in den Pseudocleavagefurchen. Während der Zellularisierung lokalisiert f-Aktin am Furchungskanal, entlang der gesamten basolateralen Membran und in der apikalen Region (kortikales Aktin). In Abb.4.9 A und B ist zu sehen, daß die Färbungen von moe-GFP und Phalloidin vollständig

identisch sind. Die für diese Arbeit hergestellte moe-RFP Variante zeigte exakt das gleiche Färbeverhalten (nicht gezeigt).

Bei dem in Abb.4.9 E gezeigten 4xPDZ_{RG2}-RFP Konstrukt handelt es sich um eine Fudion von vier Kopien der PDZ-Domäne von RhoGEF2 mRFP. Dieses Fusionsprotein lokalisiert ähnlich wie Slam am Furchungskanal.

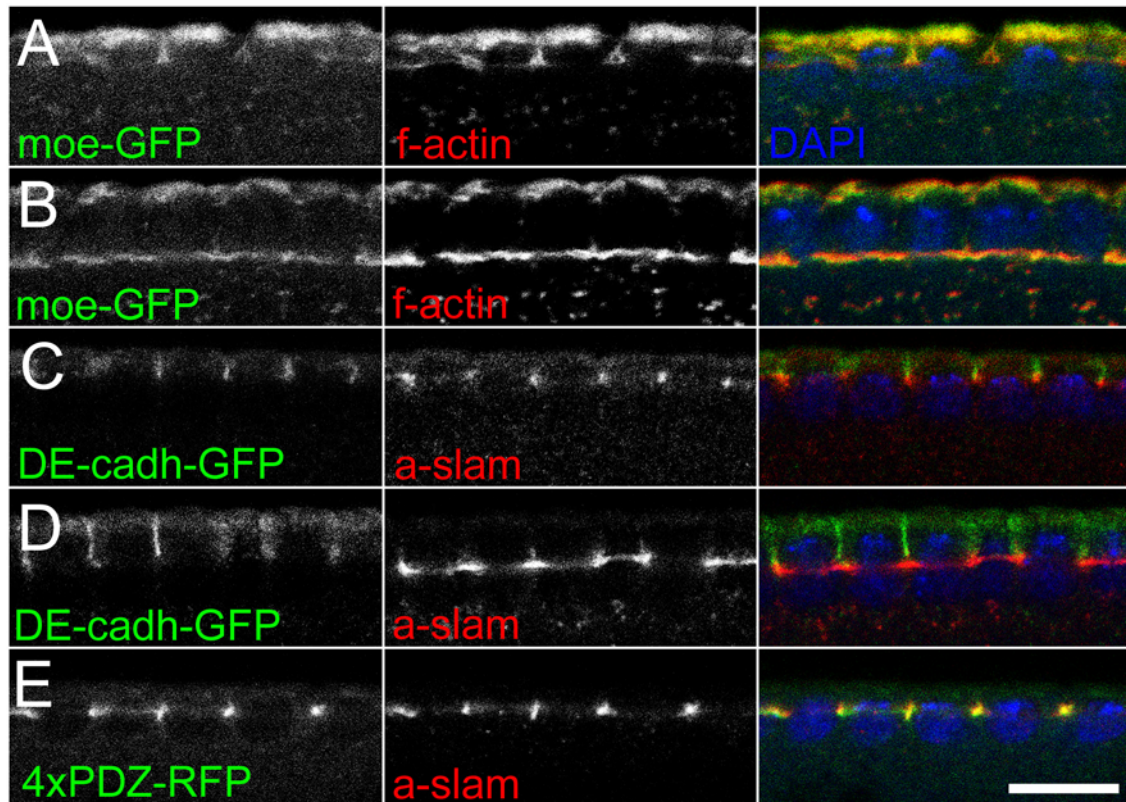


Abbildung 4.9:

Lokalisation der für die Mikroskopie von lebenden Embryonen verwendeten Markerproteine in fixierten Embryonen.

A und B: Färbung von moe-GFP (linke Spalte) Embryonen mit Phalloidin (Mitte) zu Beginn (A) und Mitte der Zellularisierung (B). C und D: Färbung von DE-cadherin-GFP Embryonen mit α -GFP-Antikörper (linke Spalte) und α -slam-Antikörper (Mitte) zu Beginn (C) und Mitte (D) der Zellularisierung; E: Färbung von 4xPDZ_{RG2}-RFP (links) Embryonen mit α -slam-Antikörper (Mitte)

4.2.2 E-cadherin als früher Marker für die Musterbildung in der Membran

Die Lokalisationsdynamiken von E-cadherin-GFP, moeGFP/RFP und 4xPDZ_{RG2}-RFP wurden mit Hilfe des Spinning Disc Mikroskops aufgenommen und quantifiziert. Dabei sollte vor allem geklärt werden, wie die zeitliche Abfolge bei der Entstehung

des Furchungskanals direkt nach dem Austritt aus der 13. syncytialen Kernteilung ist. Für dieses Experiment wurden durch Kreuzung Fliegenstämme hergestellt, die jeweils zwei Marker tragen, um einen direkten Vergleich zu ermöglichen. Folgende Kombinationen wurden untersucht: E-cadherin-GFP/moe-RFP (Abb.4.10 A-C, Film 4.3), E-cadherin-GFP/4xPDZ-RFP (Abb.4.10 D-F, Film 4.4) und moe-GFP/4xPDZ-RFP (Abb.4.10 G-I, Film 4.5). Für die Quantifizierung der Zeitabstände wurden die Zeitpunkte, an denen die jeweiligen Markerproteine an der invaginierenden Membran zwischen zwei benachbarten Zellkernen sichtbar wurden, für 10 verschiedene Stellen im Embryo ermittelt, ein Durchschnittswert und die Standardabweichung berechnet und in Abb.4.10 J dargestellt.

E-cadherin ist während Mitose 13 in den Pseudocleavagefurchen konzentriert, die die mitotischen Spindeln benachbarter Zellkerne voneinander trennen. Nach dem Austritt aus der Telophase ist das Protein zunächst uniform flächig verteilt (Abb. 4.10 B, Ausschnitt Pfeil). Bereits innerhalb von 2-3 Minuten kommt es jedoch zu einer Konzentration in der Mitte zwischen den Zellkernen und schließlich bildet sich ein scharfer Strich (Abb.4.10 B'). Somit wird die Stelle der Invagination in der Membran selbst bereits sehr früh nach dem Austritt aus Mitose 13 determiniert und durch die Lokalisation von E-cadherin-GFP sichtbar. Danach dauert es ca 5 Minuten, bis auch f-Aktin an den gleichen Stellen sichtbar wird (Abb.4.10 A'' und Diagramm in J).

Ein ähnliches Verhalten zeigt sich bei Vergleich zwischen E-cadherin-GFP und 4xPDZ_{RG2}-RFP. Wie bereits beschrieben lokalisiert 4xPDZ_{RG2}-RFP ähnlich wie Slam direkt am Furchungskanal. Dort wird es durchschnittlich 3 Minuten nach E-cadherin sichtbar. (Abb.4.10 E'' und J). Der Vergleich zwischen moe-GFP und 4xPDZ_{RG2}-RFP zeigt keine signifikanten Zeitunterschiede bei der Lokalisation beider Proteine (Abb.4.10 G',H',G'',H'' und J).

Somit läßt sich sagen, daß die Bildung des Furchungskanals in zeitlich voneinander unterscheidbaren Phasen abläuft. Zunächst beginnt die Membran an den Stellen zwischen den Zellkernen kleine lokale Einstülpungen auszubilden. Dies wird an der Lokalisation von E-cadherin-GFP sichtbar. In einer zweiten Phase werden dann Faktoren wie RhoGEF2 und f-Aktin rekrutiert.

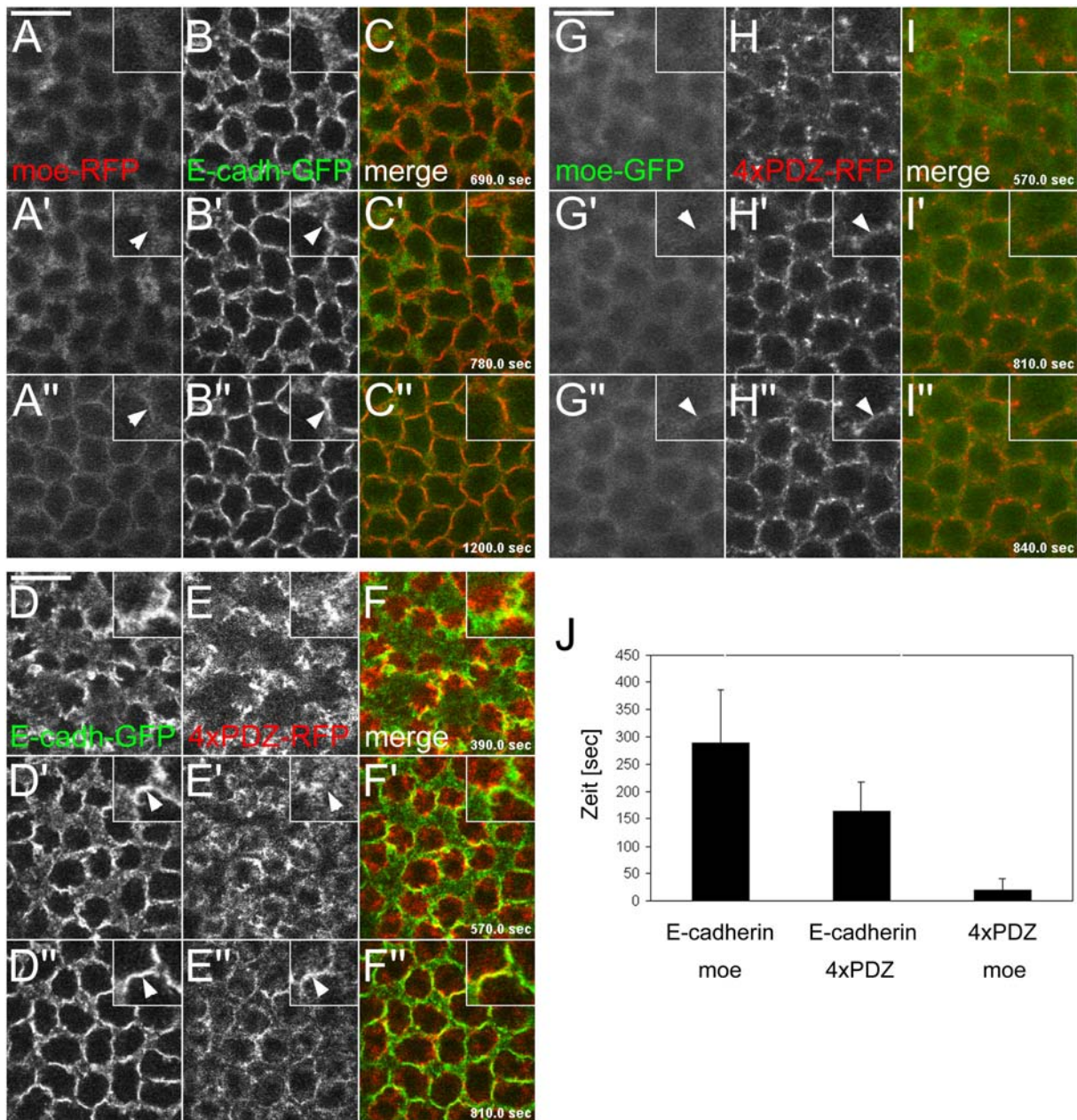


Abbildung 9:

Lokalisationsdynamik von E-cadherin-GFP, moe-GFP/RFP und 4xPDZ_{RG2}-RFP am Beginn der Zellularisierung

Bildfolgen aus Timelapse-Aufnahmen verschiedener Embryonen am Beginn der Zellularisierung. Oben rechts ist jeweils ein vergrößerter Teilbereich dargestellt (x1,75), der weiße Strich oben links entspricht einer Länge von 10 µm. A-C: Embryonen mit moe-RFP (A...A'') und E-cadherin-GFP (B...B'') sowie Überlagerung (C...C''), die weißen Pfeilspitzen markieren die Stellen, an denen sich der Furchungskanal bildet. D-F: E-cadherin-GFP (D...D''), 4xPDZ_{RG2}-RFP (E...E'') und Überlagerung (F...F''); G-I: moe-GFP (G...G''), 4xPDZ_{RG2}-RFP (H...H'') und Überlagerung (I...I''). J: Quantifizierung der Zeitabstände in der Lokalisation der verschiedenen Markerproteine am Furchungskanal

4.2.3 Membrandynamik in verschiedenen Zellularisierungsmutanten

Aus 4.2.2 geht klar hervor, daß es Unterschiede in der zeitlichen Reihenfolge der Lokalisation verschiedener Proteine am Furchungskanal gibt. E-cadherin-GFP als Transmembranprotein ist dabei früher detektierbar als 4xPDZ_{RG2}-RFP und moe-GFP/RFP. Ein typischer Phänotyp von mutanten Embryonen mit Defekten in der Zellularisierung ist das Auftreten multinukleärer Zellen als Folge einer teilweise gestörten Furchungskanalbildung. Es gibt eine Reihe von Mutanten, die solche Defekte aufweisen. Dazu zählen Mutationen in *RhoGEF2*, *dia*, *nullo*, *sry- α* , *nuf*, *rab11*, *dah* und *abl* (Grosshans et al., 2005; Postner & Wieschaus, 1994; Schweisguth et al., 1990; Rothwell et al., 1998; Riggs et al., 2003; Zhang et al., 1996; Grevengoed et al., 2003). Um zu untersuchen, was mit der Plasmamembran in diesen Mutanten passiert, wurde die Lokalisation von E-cadherin-GFP in entsprechenden Embryonen zu Beginn der Zellularisierung beobachtet und mit der im Wildtyp verglichen. In Abbildung 4.11 sind die Ergebnisse der Timelapseaufnahmen zusammengefasst. In der ersten Reihe (Abb.4.11 A1-F1) sind die Pseudocleavagefurchen von Mitose 13 sichtbar. In Wildtypembryonen haben sich nach 6 Minuten die neuen Zellkerne bereits gebildet, E-cadherin-GFP ist jedoch noch relativ flächig verteilt (Abb.4.11 A2). Drei Minuten später zeigt sich das typische hexagonale Muster, ein Beleg dafür, daß bereits eine Invagination der Plasmamembran stattgefunden hat und der Furchungskanal gebildet wurde (A3, A4). Die E-cadherin-GFP Lokalisation in *RhoGEF2* (Abb.4.11 B4), *nullo* RNAi (C4) und *dah* (D4) ist zu vergleichbaren Zeitpunkten ähnlich wie im Wildtyp (A3, A4). Das deutet darauf hin, daß das initiale Signal zur Anlage des Furchungskanals an der richtigen Stelle durch diese Mutationen nicht beeinflusst wird. Im Gegensatz dazu findet sich in *nuf* Embryonen nach dem Austritt aus der Mitose und der Auflösung der Pseudocleavagefurchen eine sehr stark reduzierte E-cadherin Lokalisation, so daß es schwer ist Aussagen darüber zu treffen, ob sich der Furchungskanal normal bildet oder nicht. Es ist bekannt, daß die Konzentration von Transmembranproteinen wie E-cadherin in der Plasmamembran einer Regulation durch das Recycling Endosom unterliegt (Langevin et al., 2005). Somit ist fraglich, ob E-cadherin-GFP als Marker für die Beobachtung der für *nuf* beschriebenen Defekte bei der Furchungskanalbildung geeignet ist. In *abl*-Mutanten gibt es einerseits frühe Defekte. So sind bereits unmittelbar nach dem Austritt aus Mitose 13 Lücken im regulären Muster zu

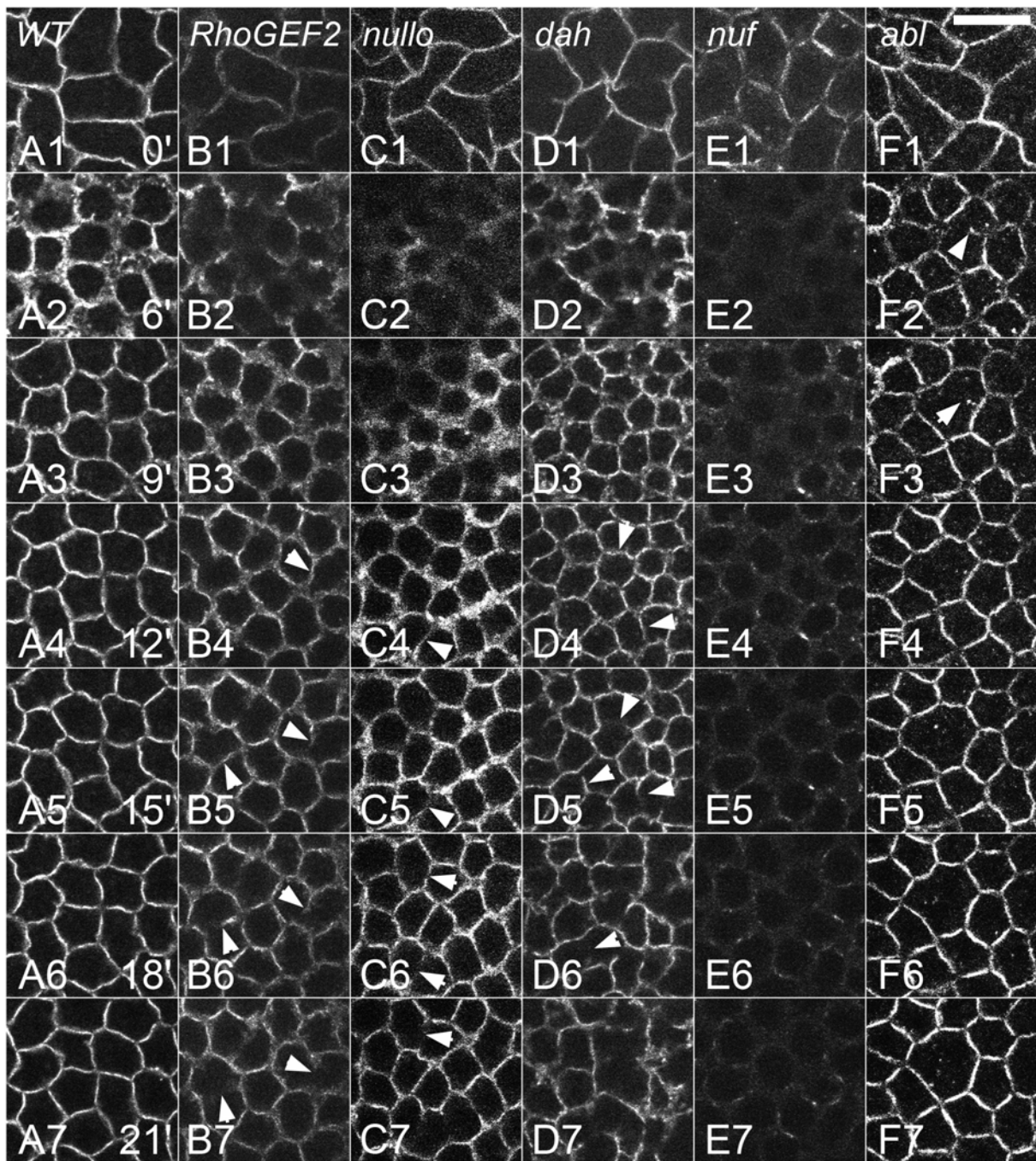


Abbildung 4.11:

Lokalisationsdynamik von E-cadherin-GFP in verschiedenen Zellularisierungsmutanten

Bildserien aus Timelapseaufnahmen, die mit Hilfe von E-cadherin-GFP im Wildtyp und verschiedenen Mutanten zu Beginn der Zellularisierung gemacht wurden. Der weiße Balken oben rechts entspricht einer Länge von 10 μm . Startpunkt ist jeweils die Metaphase von Mitose 13, sichtbar an den Pseudocleavagefurchen (oberste Reihe, Zeitpunkt 0). Die weißen Pfeilspitzen markieren Stellen, an denen sich der Furchungskanal nach initieller Bildung auflöst. A1-A7: Wildtyp, B1-B7: *RhoGEF2*, C1-C7: *nullo* (RNAi), D1-D7: *dah*, E1-E7: *nuf*, F1-F7: *abl*

erkennen (Abb.4.11 F2+F3). Andererseits gibt es auch Fälle in denen sich die Membran zwischen zwei benachbarten Zellen erst später (nach ca 25 Minuten, nicht gezeigt) auflöst. Die frühen Defekte resultieren möglicherweise aus einer gestörten Mitose. In fixierten und gefärbten *abl*-Embryonen waren in den Lücken der regulären hexagonalen E-cadh-Anordnung oft abnormal große Zellkerne zu beobachten (nicht gezeigt). Somit handelt es sich in solchen Fällen nicht um typische multinukleäre Zellen. Trotzdem kann man auch für Abl zumindest eine teilweise Funktion für die Stabilisierung des Furchungskanals annehmen.

4.2.4 Membrandynamik in *RhoGEF2/nullo* und *abl/nullo* Doppelmutanten

Wenn *RhoGEF2*, *nullo* und *abl*, wie die bisherigen Erkenntnissen vermuten lassen, eher eine stabilisierende Rolle bei der Furchungskanalbildung spielen und weniger eine Funktion bei der initiellen Festlegung seiner Position übernehmen, sollte dies auch in Doppelmutanten sichtbar werden. Zu diesem Zweck wurde doppelsträngige *nullo* RNA in *RhoGEF2* bzw. *abl* Embryonen injiziert und die Entwicklung dieser Embryonen in Timelapseaufnahmen mit Hilfe von E-cadherin-GFP verfolgt (Abb.4.12). Beide Doppelmutanten zeigen einen deutlich stärkeren Phänotyp während der Zellularisierung. In *RhoGEF2*-Embryonen invaginiert die Membran nach Austritt aus Mitose 13 zunächst normal und später zieht sie sich dann an einigen Stellen wieder zurück (Abb.4.12 A3, Pfeil in A5). Im Gegensatz dazu ist in der Doppelmutante der initielle Invaginationsprozess bereits deutlich gestört. Nach 15 Minuten sind nur klumpenähnliche Aggregate von E-cadherin besonders an den Eckpunkten des Gitters zu finden (B4). Dieser Phänotyp ist überraschend, da nach Untersuchung der *RhoGEF2* und *nullo* Mutanten in 4.2.3 eher von einer stabilisierenden Funktion beider Proteine ausgegangen worden war, so daß man in der Doppelmutante nicht unbedingt Probleme bei der initiellen Bildung erwartet hätte. In *abl/nullo* Doppelmutanten sind die Furchungskanäle nach 30 Minuten auch nahezu vollständig verschwunden (vergleiche C5 und D5), dies passiert jedoch erst nachdem sie sich wie in der Einzelmutante zunächst normal gebildet hatten (C2, D2). Die Tatsache, daß in beiden Doppelmutanten eine deutliche Verstärkung des Phänotyps zu beobachten war und es sich bei den verwendeten Allelen von *RhoGEF2* und *abl* um amorphe Mutationen handelte, erlaubt zudem den Schluß, daß

sowohl *RhoGEF2* und *nullo*, als auch *abl* und *nullo* jeweils in verschiedenen genetischen Signalwegen an der Furchungskanalbildung beteiligt sind.

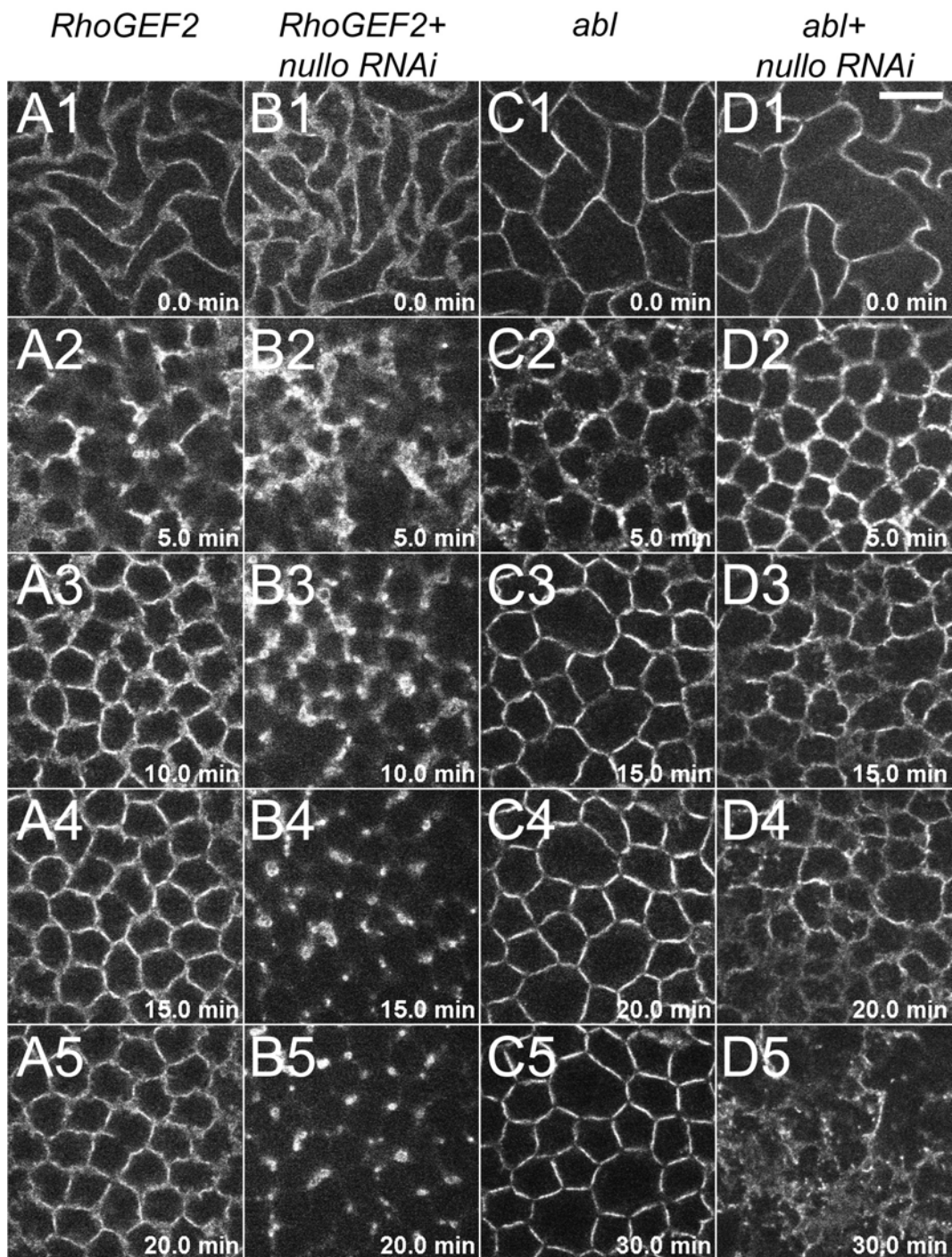


Abbildung 4.12:

Lokalisationsdynamik von E-cadherin-GFP in *RhoGEF2/nullo* und *abl/nullo* Doppelmutanten

Timelapseaufnahmen von E-cadherin-GFP markierten Embryonen des angegebenen Genotyps, unbehandelt oder nach Injektion mit *nullo* dsRNA. Startpunkt war jeweils Mitose 13. Der weiße Balken entspricht 10µm.

4.2.5 Einfluß von f-Aktin auf die Stabilität der invaginierenden Membran

Nach dem von uns vorgeschlagenen Modell führt die Lokalisation von RhoGEF2 am Furchungskanal zu einer Rho1 abhängigen Aktivierung von Dia und als Folge dessen zu einer verstärkten Polymerisierung von Aktin an dieser Stelle (Grosshans et al., 2005). Ist dieser Prozess gestört (wie in *RhoGEF2* oder *dia*-Mutanten), kommt es wie unter 4.1.1 gezeigt zu Veränderungen in der Morphologie und manchmal sogar zur vollständigen Auflösung des Furchungskanals. Offensichtlich spielt f-Aktin eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung dieser Struktur. Da die Mehrzahl der Furchungskanäle trotz der erwähnten Veränderungen dennoch gebildet wird, läuft die Zellularisierung in *RhoGEF2* Mutanten relativ normal ab. F-Aktin ist auch in *RhoGEF2* Mutanten noch am Furchungskanal lokalisiert und gegenüber dem Wildtyp nur leicht reduziert. Es gibt demnach *RhoGEF2*-unabhängige Wege, um die Polymerisierung von Aktin am Furchungskanal zu regulieren. Nun ist es möglich, durch die Injektion von Latrunculin A f-Aktin zu zerstören. Um den Effekt einer solchen Behandlung am Beginn der Zellularisierung zu untersuchen, wurden Embryonen verwendet, die mit E-cadh-GFP und moe-RFP sowohl einen Marker für die Plasmamembran, als auch einen für f-Aktin selbst besaßen. (Abb.4.13). Wenige Minuten nach Beendigung von Mitose 13 ist E-cadherin-GFP bereits lokalisiert und auch Aktin wird bereits am FC sichtbar (Abb.4.13 A1,B1). Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Injektion mit LatA in den posterioren Teil des Embryos. Unmittelbar nach der Injektion sind bereits deutliche Lücken in der regelmäßigen Anordnung der invaginierenden Membran sichtbar (A2). Moe-RFP ist zu diesem Zeitpunkt nur noch diffus im Zytoplasma lokalisiert (B2), was die Effizienz der Aktin-Depolymerisierung durch LatrunculinA belegt. Innerhalb von 6 Minuten löst sich die Membran nahezu vollständig auf und es bleiben nur noch unzusammenhängende Reste zurück (A3,A4), wodurch klar gezeigt ist, daß die Mikrofilamentorganisation ein essentieller Schritt bei der Stabilisierung der invaginierenden Plasmamembran ist.. Der Phänotyp LatrunculinA-behandelter Embryonen weist deutliche Ähnlichkeiten mit der in 4.2.4 getesteten *RhoGEF2/nullo* und auch mit der *abl/nullo* Doppelmutante auf (vergl. Abb.4.13 A4 mit Abb.4.12 B5 und D5). Obwohl man bisher keine Hinweise auf die molekulare Funktion von *nullo* hat, wäre es doch vorstellbar, daß dieses Protein direkt oder indirekt an der Aktinregulation beteiligt sein könnte.

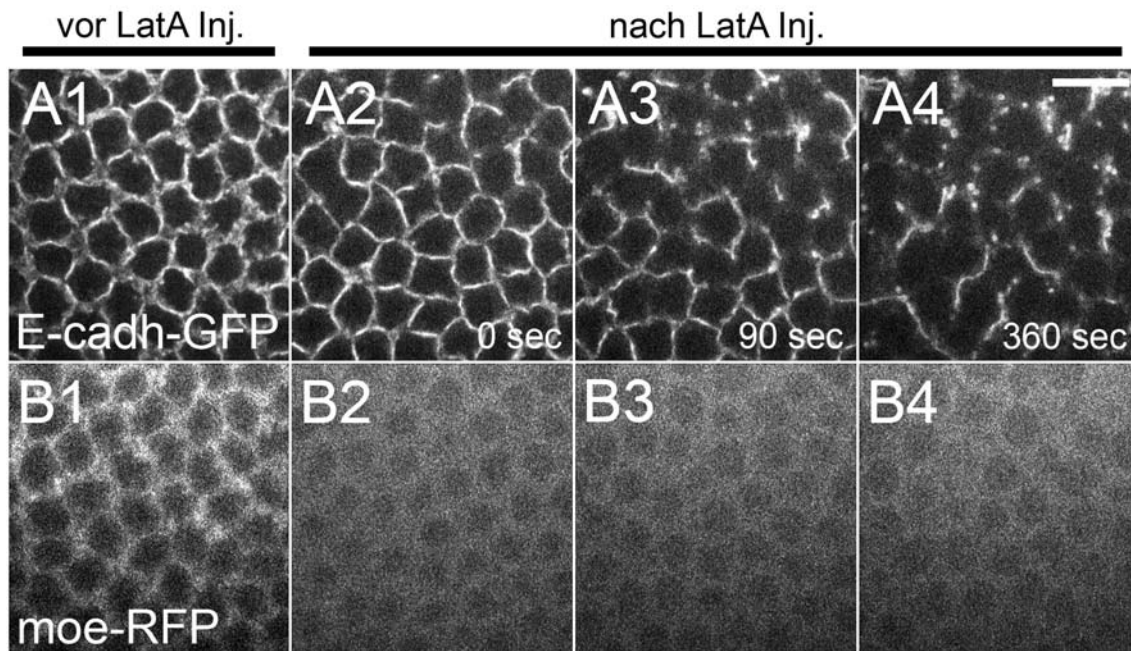


Abbildung 4.13:

Bedeutung von f-Aktin für die Stabilität der invaginierenden Furchungskanalmembran

E-cadh-GFP/moe-RFP markierte Wildtypembryonen wurden am Beginn der Zellularisierung mit LatA injiziert und anschließend in Timelapseaufnahmen beobachtet. Der weiße Balken entspricht 10 μm .

4.2.6 Rolle der Pseudocleavagesfurche für die Furchungskanalbildung

Aus den Experimenten der vorherigen Abschnitte geht hervor, daß die Furchungskanalbildung in Phasen abläuft. Sie beginnt mit einer frühen initiellen Phase, in der die Festlegung der Position für die Invagination der Plasmamembran zwischen den Zellkernen erfolgt. Dabei kommt es innerhalb der Plasmamembran zu deutlich sichtbaren lokalen Veränderungen in der Verteilung von Transmembranproteinen wie E-cadherin-GFP. Man kann hier auch von einer planaren Polarisierung der Membran sprechen. In einem zweiten Schritt können andere Faktoren wie beispielsweise f-Aktin die lokalen Unterschiede in den Eigenschaften der Plasmamembran als eine Art "Positionsmarkierung" nutzen, um den Invaginationsprozess durch eine Stabilisierung der Furchungskanalmembran zu unterstützen. Wie die beschriebene Polarisierung der Membran nach dem Austritt aus der Mitose initiiert wird ist nicht bekannt. Kleine initiale Veränderungen in der Protein- oder Lipidkomposition der Membran könnten ausreichen, um in einem selbstverstärkenden Prozess die Ausbildung verschiedener Membrandomänen zu ermöglichen. Dabei ist klar, daß entsprechende Veränderungen in der Membran von

den Vorgängen im kortikalen Zytoplasma und den dort befindlichen Zellkernen abhängen. Die planare Polarisierung der embryonalen Plasmamembran wiederholt sich während der letzten vier syncytialen Kernteilungen periodisch. Durch transiente Invaginationen der Membran kommt es während der Mitosen zur Bildung der Pseudocleavagefurchen, die benachbarte mitotische Spindeln voneinander separieren. Es gibt nun zwei mögliche Szenarien, wie die Positionen für die Bildung der Furchungskanäle nach Beendigung von Mitose 13 in der Membran definiert werden könnten (Abb.4.14). Zum einen wäre denkbar, daß die Polarisierung der Membran am Beginn von Zyklus 14 durch ein Signal aus dem Zytoplasma neu initiiert wird, wobei dieses Signal in Abhängigkeit von der Position der Zellkerne erfolgen müßte (Abb.14.4 A). Eine andere Möglichkeit wäre, daß die Positionen der Pseudocleavagefurchen in Mitose 13 als eine Art Markierung in der Membran erhalten bleibt (rot markierte Stellen in Abb.4.14 B). Da bei jeder Kernteilung zwei neue Zellkerne entstehen, müßte so nur die Position für die Invagination der neu zu bildenden Membran zwischen den Tochterkernen gefunden werden (gelbe Markierung in Abb.4.14 B).

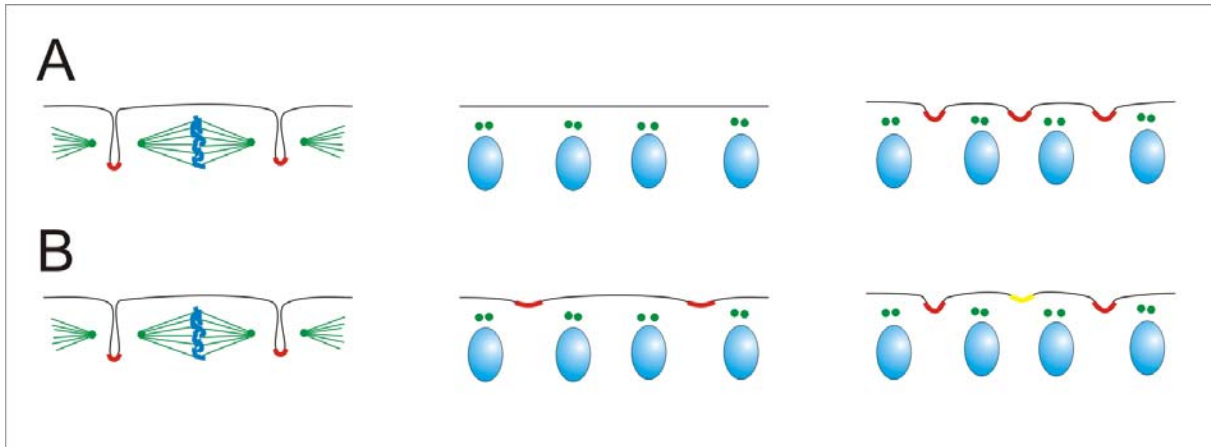


Abbildung 4.14:

Mögliche Modelle für die Positionsfindung der Invaginationen am Beginn der Zellularisierung

A: Die Positionen für die Einwanderung der Membran am Beginn der Zellularisierung werden unabhängig von den Position der Pseudocleavagefurchen in Mitose 13 festgelegt. B: Die Position der Pseudocleavagefurchen in Mitose 13 dient als Markierung für die Festlegung der Position der Invaginationen in der Interphase von Zyklus 14 (Zellularisierung). blau: Zellkerne, grün: Zentrosomen+Mikrotubuli, rot: "alte" Position der Pseudocleavagefurche, gelb: "neue" Position der Furchungskanäle

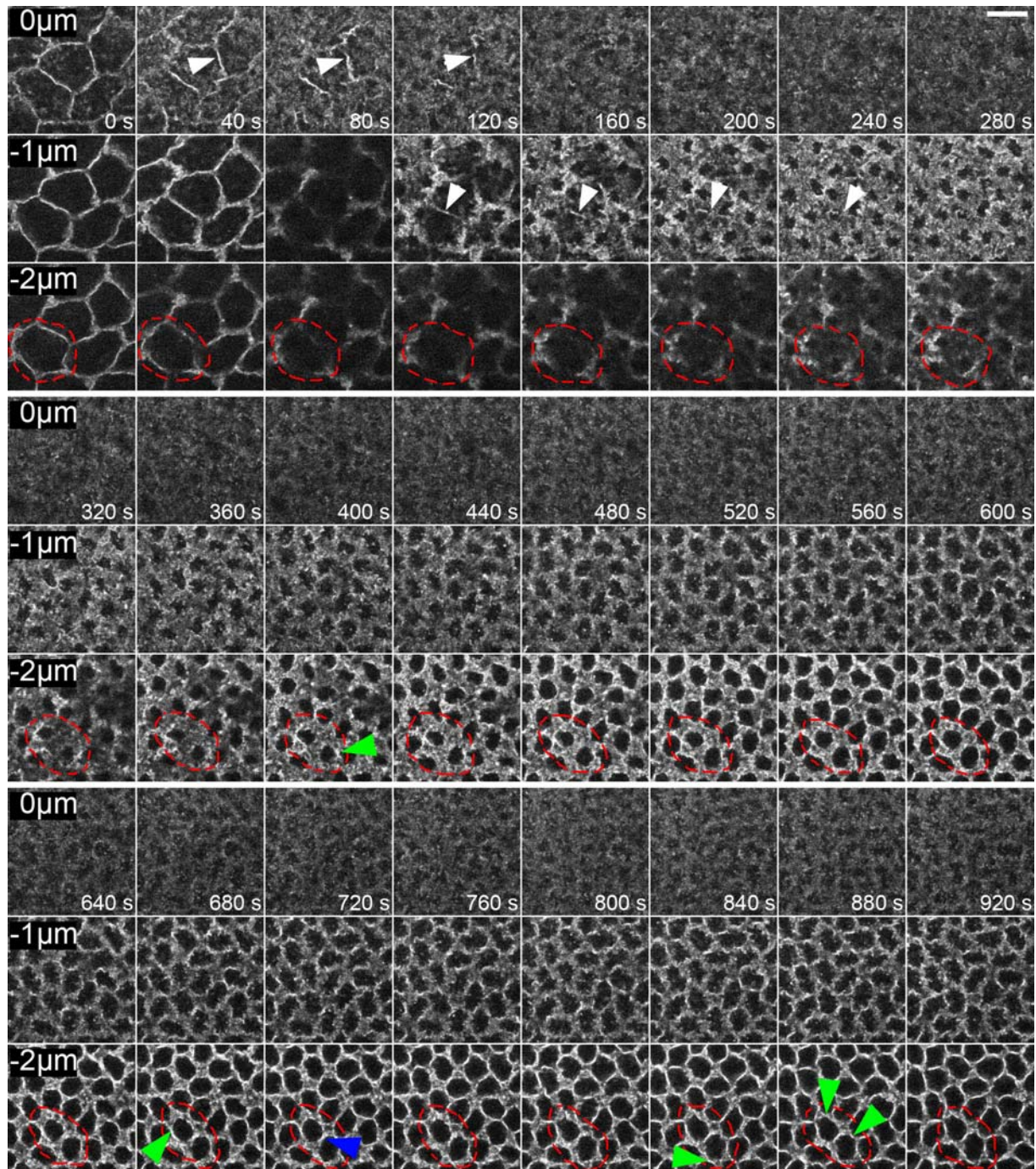


Abbildung 4.15:

Membrandynamik in WT-Embryonen während der Furchungskanalbildung

Bilderserie aus einer 4D-Timelapseaufnahme eines E-cadherin-GFP WT-Embryos. Für jeden Zeitpunkt sind jeweils drei z-Ebenen von apikal ($0\mu\text{m}$) nach basal ($-2\mu\text{m}$) dargestellt. Zum Startpunkt befinden sich die Zellkerne noch in Mitose 13 (sichtbar an den Pseudocleavagefurchen zum Zeitpunkt $t=0$). Es wird deutlich, daß sich die Metaphase-Furchen zunächst vollständig auflösen (markiert durch weiße Pfeilspitzen), bevor sich die Furchungskanäle bilden. Die Abfolge der Furchungskanalbildung an "alten" (grüne Pfeile) und "neuen" (blauer Pfeil) Invaginationsstellen erscheint zufällig. Der weiße Strich entspricht einer Länge von $10\mu\text{m}$.

Für ein Modell wie es in Abb.4.14 B vorgeschlagen wird, könnte man vermuten, daß es zu beobachtbaren zeitlichen Unterschieden bei der Invagination der Membran an "alten" und "neuen" Stellen kommen könnte. Um dies zu testen, wurden 4D-Timelapseaufnahmen von mit E-cadherin-GFP markierten Wildtypembryonen gemacht (Abb.4.15). Dabei konnte beobachtet werden, daß sich die Pseudocleavagesfurche nach dem Austritt aus Mitose 13 innerhalb von 2-3 Minuten nahezu vollständig zurückbildet (weiße Pfeile). Außerdem wurde deutlich, daß wenn man der Membraninvagination im Bereich von zwei Kernen folgt, die von ihren Nachbarkernen in Mitose 13 durch einen gemeinsamen Pseudocleavagesfurchenring getrennt waren (rot markierter Bereich in Abb. 14), die zeitliche Abfolge der Furchungskanalbildung keinem speziellen Muster folgt, sondern zufällig ist (grüne Pfeile: "alte" Invaginationsstellen, blauer Pfeil: "neue" Invaginationsstelle). Aufgrund dieser Beobachtungen kann man davon ausgehen, daß die Position der Pseudocleavagesfurche keinen unmittelbaren Einfluß auf die Furchungskanalbildung hat.

4.2.7 Einfluß von freien Zentrosomen auf die Furchungskanalbildung

Es ist demnach wahrscheinlich, daß die Position der Furchungskanäle unabhängig von der Position der Pseudocleavagesfurche aus Mitose 13 durch ein zytoplasmatisches Signal festgelegt wird. Ein mögliche Quelle für ein solches Signal stellen die Zentrosomen dar.

In *C.elegans* Embryonen wird die Polarität durch ein zentrosomenabhängiges Signal induziert (Cowan & Hyman, 2004). In kultivierten Hippocampus-Neuronen hängt die polarisierte Ausbildung von Axonen von den Zentrosomen ab (de Anda et al., 2005). In *Drosophila* ist es möglich, den Zyklus von Zentrosomenduplikation und Kernteilung in der frühen syncytialen Phase der Embryonalentwicklung beispielsweise durch UV-Behandlung zu entkoppeln (Togashi & Okada, 1984). Als Folge dessen wandern freie Zentrosomen an die Peripherie des Embryos und können dort sowohl die Bildung von Aktkappen als auch die Polzellbildung induzieren (Raff & Glover, 1988; Yasuda et al., 1991). Um zu testen, ob Zentrosomen auch Einfluß auf die Bildung des Furchungskanals haben, wurden Embryonen mit genetisch generierten "freien" Zentrosomen während der Zellularisierung untersucht (Abb.4.16). Dazu wurden Embryonen einer transgenen Fliegenlinie verwendet, die das an GFP fusionierte

zentrosomale Protein Sas6 unter Kontrolle des Ubiquitin-Promotors exprimieren. Die Expression von Sas6-GFP ist ausreichend, um im frühen Embryo zusätzliche Runden der Zentriolenduplikation zu initiieren (Peel et al., 2007). Dabei entstehen Zentrosomen, die nicht mit einem Zellkern assoziiert sind. Wie aus Abbildung 4.16 ersichtlich wird, sind die freien Zentrosomen mit kleinen zellähnlichen Strukturen assoziiert. Dies wird sowohl nach Färbung mit Phalloidin (Abb.4.16 B), als auch in 4xPDZ_{RG2}-RFP markierten Embryonen deutlich (4.16 E). Freie Zentrosomen sind darüber hinaus in der Lage Mikrotubuli zu organisieren (nicht gezeigt). Es läßt sich also feststellen, daß freie Zentrosomen die membranassoziierte Lokalisation von Faktoren, die auch bei der regulären Furchungskanalbildung in ähnlicher Weise lokalisieren wie 4xPDZ_{RG2}-RFP und f-Aktin, induzieren können. Somit scheint das Signal, das die Ausbildung unterschiedlicher Membrandomänen am Beginn der Zellularisierung induziert, von den Zentrosomen auszugehen.

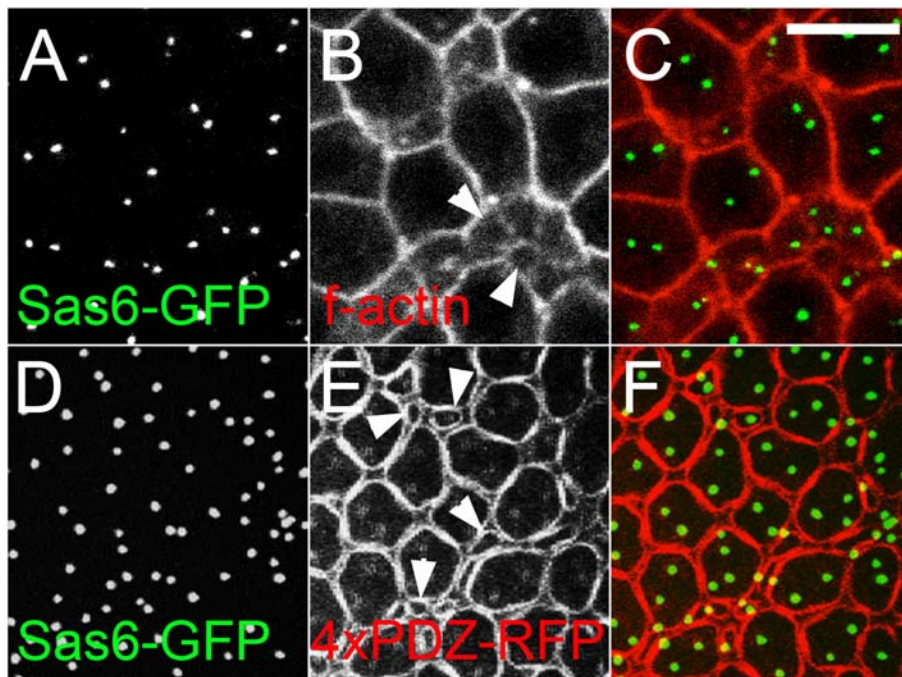


Abbildung 4.16:

Einfluß von freien Zentrosomen auf die Furchungskanalbildung zu Beginn der Zellularisierung

Embryonen mit ektopischer Sas6-GFP Expression (A, D) wurden fixiert und mit Phalloidin (B) gefärbt. D-F: z-Stack-Projektion eines mit Sas6-GFP und 4xPDZ_{RG2}-RFP markierten lebenden Embryos. Die Pfeile markieren Stellen, an denen freie Zentrosomen die Lokalisation von f-Aktin bzw. 4xPDZ_{RG2}-RFP in zellähnlichen Strukturen induziert haben. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 10 µm.

4.2.8 Rolle der Mikrotubuli bei der Entstehung des Furchungskanals

Nachdem gezeigt werden konnte, daß zusätzliche freie Zentrosomen in der Lage sind, die Bildung von kleinen "Pseudozellen" am Beginn der Zellularisierung zu initiieren, sollte geklärt werden, ob diese organisierende Funktion der Zentrosomen von den von ihnen ausgehenden Mikrotubuli abhängt. Aus Versuchen in *C.elegans* ist bekannt, daß Zentrosomen bei der Polarisierung der Oocyte eine essentielle Rolle spielen, es gibt jedoch kontroverse Ansichten darüber, ob diese Eigenschaft der Zentrosomen von Mikrotubuli abhängig ist oder nicht (Cowan & Hyman, 2004; Tsai & Ahringer, 2007). Für den *Drosophila*-Embryo wäre denkbar, daß Faktoren, die wichtig für die bereits erwähnte Membranpolarisierung an der späteren Invaginationsstelle sind, über die von den Zentrosomen ausgehenden astralen Mikrotubuli hierher gelangen und nachfolgende Prozesse regulieren könnten. Dabei könnte es sich um einen mikrotubuliabhängigen aktiven Transport durch Motorproteine oder auch um Plusend-assoziierte Proteine handeln, die auf diese Weise lokal angereichert werden würden (Abb.4.17). Denkbar ist auch, daß nach dem selben Prinzip eine mikrotubuliabhängige bevorzugte Insertion von sekre-

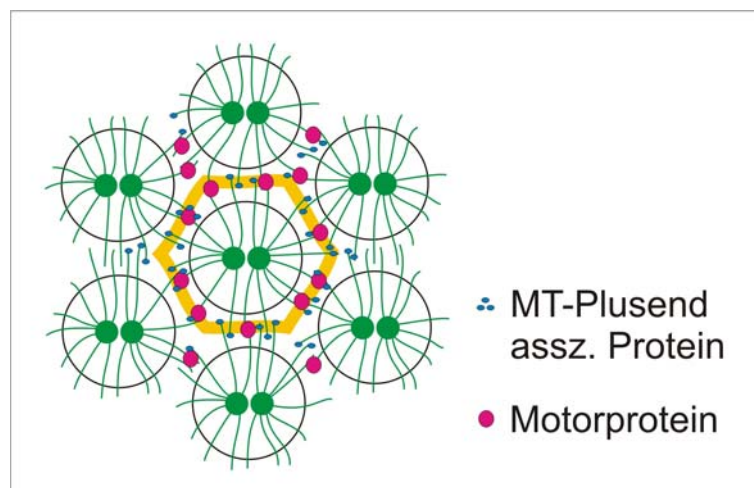


Abbildung 4.17:

Mögliche Rolle astraler Mikrotubuli bei der Furchungskanalbildung

Über die von den Zentrosomen ausgehenden astralen Mikrotubuli könnten Faktoren nach Transport durch Motorproteine oder über die Assoziation mit MT-Plusenden im Bereich der späteren Membraninvagination (gelbes Hexagon) angereichert werden und nach Interaktion mit der Plasmamembran die Ausbildung verschiedener Membrandomänen initiieren.

torischen Membranvesikeln im Bereich der späteren Furchungskanalbildung zur Ausbildung distinkter Membrandomänen beiträgt. Um also die Rolle von Mikrotubuli zu testen, sollte die Dynamik der Lokalisation von 4xPDZ_{RG2}-RFP am Beginn der Zellularisierung nach Zerstörung der Mikrotubuli mit Colcemid untersucht werden. Um ein Zellzyklusarrest zu vermeiden, mußte dabei darauf geachtet werden, daß Colcemid nicht zu früh zu injizieren. Durch die Injektion in Embryonen, die außer mit 4xPDZ_{RG2}-RFP auch mit α -Tubulin-GFP markiert waren, konnte die Wirkung von Colcemid direkt beobachtet werden. In Abb.4.18 sind die Ergebnisse aus diesem Experiment zusammengefaßt. Der Startpunkt ist jeweils die Metaphase von Zyklus 13 (Abb.4.18 A1-F1). Die Colcemid-Injektion erfolgte bereits zu diesem Zeitpunkt, da es einige Minuten dauert, bis die Wirkung in der kortikalen Region einsetzt. Etwa 4-5 Minuten später kann man bereits deutlich sehen, daß sich das Tub-GFP-Signal im injizierten Embryo auf die Zentrosomen beschränkt (vergleiche Abb.4.18 D2 und A2). Die Mikrotubuli werden abgebaut und nach weiteren 2 Minuten ist nur noch das zentrosomale Signal sichtbar. Während 4xPDZ_{RG2}-RFP bei der nichtinjizierten Kontrolle bereits 6-7 Minuten nach dem Austritt aus Mitose 13 beginnt, sich zwischen den Kernen anzureichern (4.18 B3), konzentriert sich das Signal im injizierten Embryo mehr auf die Zentrosomen (E3). Erst deutlich später kommt es zu einer Anreicherung in ringähnlichen Strukturen um die Kerne, die jedoch im Vergleich zur Kontrolle selten direkten Kontakt miteinander haben. (vergleiche B4 und E4). Darüber hinaus ist das Signal am Furchungskanal des Kontrollembryos deutlich stärker als im injizierten Embryo. Während der Furchungskanal im Kontrollembryo schließlich ins Innere wandert (B5), findet die Einwanderung der Membranfront im colcemidbehandelten Embryo nicht statt. Somit wurde klar gezeigt, daß die Mikrotubuli an der Furchungskanalbildung beteiligt sind. Aufgrund der experimentellen Einschränkung gibt es ein Zeitfenster von ca. 5 Minuten nach der Metaphase von Mitose 13, in der die Mikrotubuli noch nicht vollständig zerstört sind. Diese Phase könnte ausreichen, um die zwar eingeschränkte aber dennoch sichtbare Lokalisation von 4xPDZ_{RG2}-RFP (sichtbar in Abb.4.18 E4) zu ermöglichen.

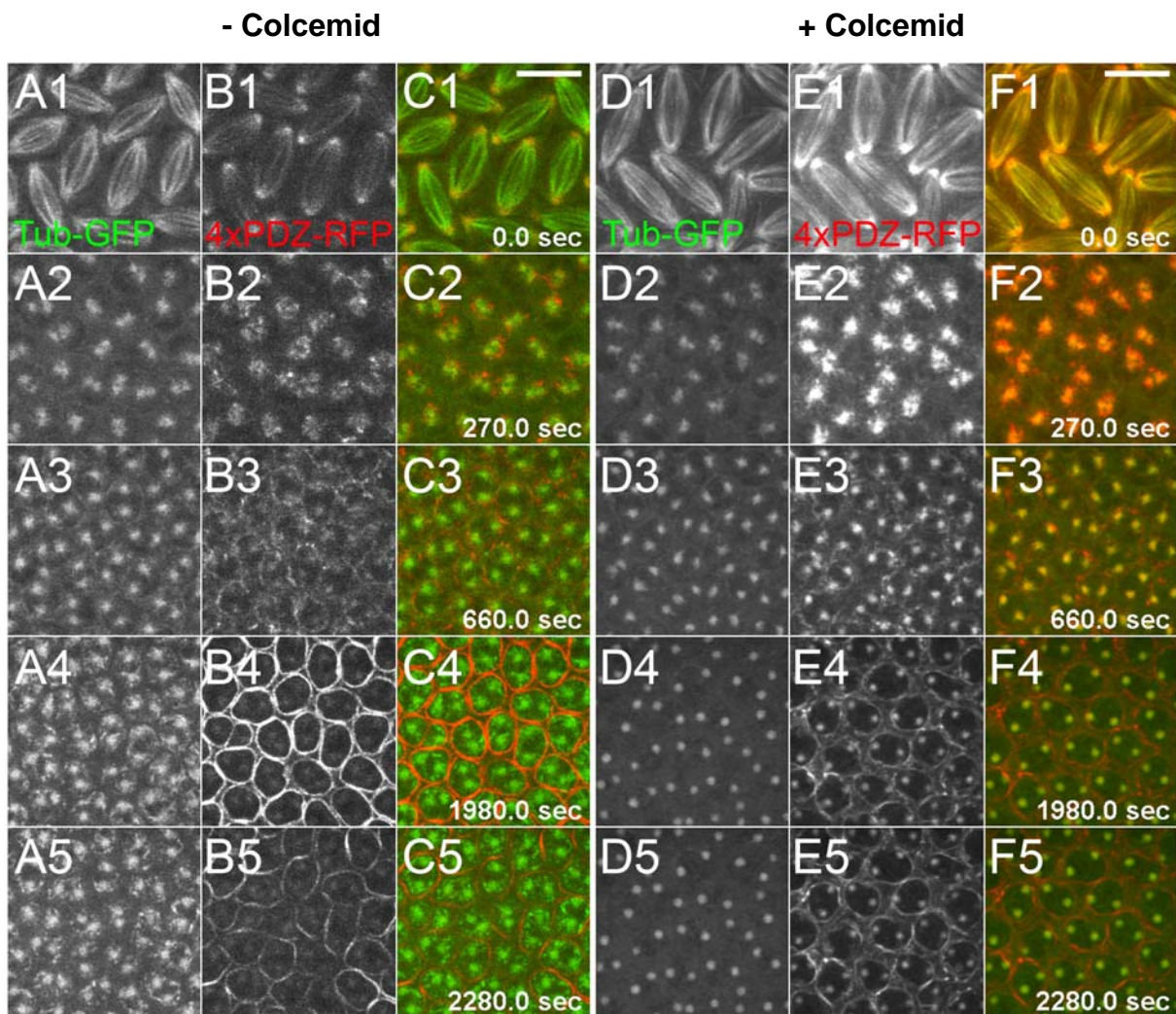


Abbildung 4.18:

Die Furchungskanallokalisierung von 4xPDZ_{RG2}-RFP hängt von Mikrotubuli ab

Bildfolgen aus Timelapseaufnahmen von α -Tub-GFP/4xPDZ_{RG2}-RFP-Embryonen in unbehandelten Zustand (A-C) und nach Injektion von Colcemid (D-F). Die Injektion erfolgte so, daß Mitose 13 nicht beeinflusst wurde. Ein deutlicher Abbau der Mikrotubuli war ca 6 Minuten nach Austritt aus der Telophase sichtbar. (Maßstab 10 μ m)

A1-F1: Metaphase Mitose 13; A2-F2: Austritt Telophase; A3-C3: 4xPDZ_{RG2}-RFP beginnt am Furchungskanal zu lokalisieren D3-F3: deutlicher Abbau der Mikrotubuli wird sichtbar, das α -Tub-GFP-Signal am Zentrosom bleibt stabil, A4-C4 und A5-C5: Furchungskanal wandert ins Innere des Embryos, D4-F4 und D5-F5: im Vergleich zum unbehandelten Embryo ist die Furchungskanallokalisierung von 4xPDZ_{RG2}-RFP deutlich schwächer, eine Einwanderung ist nicht zu beobachten.

5. Diskussion

5.1 RhoGEF2, Rho1 und Dia regulieren die lokale Polymerisation von f-Aktin am Furchungskanal

Durch die Analyse von mutanten Embryonen konnten wir für *RhoGEF2* einen neuen Phänotyp während der Zellularisierung beobachten. Zusätzlich zu den bekannten Defekten bei der Invagination des Mesoderms am Beginn der Gastrulation ist in *RhoGEF2* Embryonen die Ausbildung des hexagonalen Netzwerkes, das zunächst von den Furchungskanälen gebildet wird und die Spitze der später einwandernden Membranfront bildet, gestört. Als Folge kommt es zur Bildung multinukleärer Zellen. Trotz dieser Beeinträchtigung bildet sich das hexagonale Netzwerk an vielen Stellen scheinbar normal, auch die Kinetik der Membraninvagination unterscheidet sich in *RhoGEF2* Mutanten nicht von der in Wildtypembryonen. Das Auftreten multinukleärer Zellen und die damit verbundenen Lücken im System der invaginierenden Membran weisen auf Probleme bei der Ausbildung und/oder der späteren Stabilisierung der Furchungskanäle hin. Ähnliche Phänotypen lassen sich in einer Reihe weiterer Mutanten beobachten. So ist die Furchungskanalbildung beispielsweise auch in *nullo*, *sry- α* , und *bnk* Mutanten nur an einigen Stellen gestört (Postner & Wieschaus, 1994; Schweisguth et al., 1990; Schejter & Wieschaus, 1993). Dies deutet darauf hin, daß eine Reihe von Faktoren in redundanter Weise an der Furchungskanalbildung beteiligt sind.

Bei der Untersuchung der Ultrastruktur von *RhoGEF2* Mutanten wurde festgestellt, daß die gebildeten Furchungskanäle zum Teil stark vergrößert sind und oft zytoplasmatische Einschlüsse enthalten, was die Vermutung zulässt, daß diese Furchungskanäle weniger kompakt sind als im Wildtyp. Bei dem Furchungskanal handelt es sich um eine Membrandomäne (Lecuit & Wieschaus, 2000), die sich in ihren Eigenschaften von denen der lateralen und apikalen Membranbereiche unterscheidet. Als Ursache für die veränderte Morphologie der Furchungskanäle in *RhoGEF2* Embryonen kommen somit sowohl Veränderungen im membranassoziierten Zytoskelett, als auch Störungen in der dynamischen Reorganisation der Membran selbst in Frage.

RhoGEF2 ist ein Austauschfaktor für Guaninnukleotide, der *in vitro* spezifisch den Austausch von GDP durch GTP für die GTPase Rho1 katalysiert (Grosshans et al,

2005). Rho1 lokalisiert im Wildtyp am Furchungskanal und entlang der lateralen Membran. In *RhoGEF2* Embryonen ist die Bindung von Rho1 speziell im Bereich des Furchungskanals reduziert (Padash Barmchi et al, 2005). Bei Untersuchungen mit einem Konstrukt, das spezifisch an aktiviertes Rho1 bindet, wurden auch Unterschiede zwischen Wildtyp und *RhoGEF2* Embryonen festgestellt (Yang, unveröffentlicht). Demnach scheint die Aktivität von RhoGEF2 die Aktivität von Rho1 am Furchungskanal zu kontrollieren. Rho-GTPasen regulieren das Zytoskelett über eine Reihe von Effektorproteinen. Einer dieser Effektoren ist das Formin Diaphanous. Aufgrund der ähnlichen Lokalisation von Dia und aufgrund des vergleichbaren Zellularisierungsphänotyps entsprechender Mutanten war es naheliegend zu vermuten, daß RhoGEF2, Rho1 und Dia zusammen an der Polymerisierung von f-Aktin während der Initiationsphase der Zellularisierung beteiligt sind. Unterstützt wurde diese Vermutung sowohl durch die Tatsache, daß Rho1 *in vitro* an Dia binden kann, als auch durch die Beobachtung, daß die Aktivität von Dia in einem *in vitro* Aktin-Polymerisationsassay durch Zugabe von konstitutiv aktivem Rho1 gesteigert werden konnte (Grosshans et al, 2005). Darüber hinaus kann der Phänotyp von *RhoGEF2* Mutanten zu 100% durch ein *myc-RhoGEF2-WT* Transgen, nicht aber durch ein analoges Konstrukt mit einer Punktmutation in der DH-Domäne gerettet werden (diese Arbeit).

In *RhoGEF2* defizienten Embryonen ist die Furchungskanallokalisierung von Dia beeinträchtigt. Diese funktionelle Abhängigkeit wurde jedoch nur in der frühen Phase der Zellularisierung beobachtet und war in Embryonen mit dem Allel *RhoGEF2*^{1.1} sehr viel deutlicher, als in Embryonen mit dem amorphen Allel *RhoGEF2*⁽²⁾⁰⁴²⁹¹. Die Natur der Mutation in *RhoGEF2*^{1.1} ist nicht bekannt, so daß man über die Ursache dieser Diskrepanz nur spekulieren kann. Ein Argument dafür, daß RhoGEF2 und Dia gemeinsam an der Aktinpolymerisation am Furchungskanal beteiligt sind, ist aber, daß nach Phalloidin-färbungen in *RhoGEF2* und *dia* Embryonen ein im Vergleich zum Wildtyp reduziertes Signal am Furchungskanal beobachtet werden konnte (Grosshans et al., 2005). Um zu testen, ob die beobachteten Defekte in *RhoGEF2* Embryonen letztlich auf einer reduzierten Dia-Aktivität beruhen, könnte man versuchen, den *RhoGEF2* Phänotyp mit einem chimären Konstrukt aus der Lokalisationsdomäne von RhoGEF2 und der aktinpolymerisierenden FH1/FH2 Domäne von Dia zu retten. Die Klonierung eines solchen Konstruktes sollte prinzipiell möglich sein, da sich, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, einerseits mit Hilfe

der PDZ-Domäne von RhoGEF2 gezielt Proteine wie GST oder RFP an den Furchungskanal rekrutieren lassen und andererseits die ektopische Expression der isolierten FH1/FH2 Domäne von Dia im Embryo nachweislich zu verstärkter Aktinpolymerisierung führt (eigene Beobachtung).

5.2 Die Rolle von Aktin bei der Furchungskanalbildung

Kortikales Aktin beeinflusst die Form und Stabilität der Plasmamembran. Mit Hilfe der dynamischen Reorganisation von Aktin am Zellkortex kann die Plasmamembran vielfältige Projektionen wie Filopodien oder Lamellipodien bilden, was Zellen dazu befähigt sich fortzubewegen. Durch die Ausbildung von Axonen und die Wanderung ihrer Wachstumskegel sind neuronale Zellen in der Lage über weite Entfernungen neuronale Verbindungen zu formen. Auch dieser Prozess hängt von der Fähigkeit zur dynamischen Reorganisation des Aktinzytoskeletts im Wachstumskegel ab.

Während der Zellularisierung läßt sich Aktin entlang der gesamten Plasmamembran mit einer besonderen Anreicherung am Furchungskanal nachweisen. Dabei gewährleistet Aktin die Stabilität der Haarnadelstruktur des Furchungskanals während des Invaginationsprozesses. Dies wird insbesondere dann deutlich, wenn die Funktion von Teilen des zur Etablierung von filamentösem Aktin benötigten Apparates gestört ist. Genau das passiert sowohl in *RhoGEF2* und *dia* Mutanten, als auch nach Injektion mit Latrunculin A.

Der Phänotyp von LatA behandelten Embryonen ist jedoch sehr viel stärker, als der von *dia* oder *RhoGEF2* Mutanten. Die Integrität der Membran wird stark beeinträchtigt. Die bereits invaginierte Membran scheint sich an einigen Stellen wieder zurückzuziehen und es kommt zu einer teilweisen Membrandefragmentierung. Zerstört man das Aktinzytoskelett in *Drosophila* S2-Zellen durch Zugabe von LatA, hat das auf die Integrität der Plasmamembran keinen sichtbaren Effekt. Die Zelle kann diese Behandlung recht lange ohne dramatische Veränderung ihrer äußeren Form überleben. (eigene Beobachtung). Man muß sich also fragen, warum die Struktur der Membran im Embryo so dramatisch von Aktin abhängt. Eine Antwort darauf könnte in der Bedeutung von Endo- und Exocytoseprozessen für die Reorganisation der Plasmamembran während der Zellularisierung liegen, auf die bereits in der Einleitung hingewiesen worden ist. Aktinpolymerisation spielt eine wichtige Rolle bei der Clathrin vermittelten Endozytose (Lamaze et al., 1997;

zusammengefasst in Lanzetti, 2007). Auch das Verhalten von Endosomen wird durch Aktin beeinflusst. In humanen Kulturzellen lokalisiert RhoB auf der cytoplasmatischen Seite endosomaler Membranen. Werden solche Zellen mit einer konstitutiv aktiven Form von RhoB transfiziert, kommt es zu einer Rekrutierung von mDia1 und zur Bildung einer endosomalen Aktinhülle. Solche Endosomen werden dann an der Zellperipherie vermutlich über Interaktionen mit dem kortikalen f-Aktin der Plasmamembran zurückgehalten und der endosomale Transport wird verlangsamt (Fernandez-Borja et al., 2005). Die lokale Polymerisierung von f-Aktin ist darüber hinaus auch an Exozytoseprozessen beteiligt (Sokac et al., 2003; Alberts et al., 2006).

Durch die Injektion von LatA wird demzufolge nicht nur die mechanische Stabilität der Plasmamembran verändert, auch der bidirektionale Transport von Membranvesikeln zwischen der Plasmamembran und zytoplasmatischen Membrankompartimenten wird beeinträchtigt. So ist es nicht überraschend, wenn die Inhibierung jeglicher Aktinpolymerisation in einem Prozess mit hoher Membranaktivität wie der Zellularisierung sehr viel stärkere Auswirkungen hat, als in einem weniger aktiven System.

5.3 Die Furchungskanallocalisation von RhoGEF2 wird durch die PDZ-Domäne vermittelt

In dem von uns vorgeschlagenen Modell ist RhoGEF2 der Faktor, der die Aktivität von Rho1 und Dia räumlich kontrolliert. Durch die Untersuchung des Mechanismus, der der Lokalisation von RhoGEF2 am Furchungskanal zugrunde liegt, sollte versucht werden, einen besseren Einblick in die Initiation der Furchungskanalbildung zu bekommen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die PDZ Domäne des Proteins ausreichend und notwendig für seine Lokalisierung ist. Nach Einführung zweier Punktmutationen in die Carboxylat-Bindeschleife der PDZ-Domäne von RhoGEF2 konnte das Protein nicht mehr am Furchungskanal lokalisieren. Die Assoziation mit den Zentrosomen und den Spindelmikrotubuli im Embryo wurde durch diese Mutationen nicht beeinflusst (nicht gezeigt). Auch die Assoziation mit den Plusenden wachsender Mikrotubuli in S2-Kulturzellen war nicht beeinträchtigt. PDZ vermittelte Protein-Protein-Interaktionen spielen eine wichtige Rolle bei der Etablierung der Membranpolarität in sich bildenden Epithelien. Der typische PDZ-

Ligand ist ein Transmembranprotein mit einem aus 4 Aminosäuren bestehenden C-terminalen PDZ-Bindemotiv. Die Bindung zwischen Ligand und PDZ-Protein erfolgt in der Carboxylat-Bindeschleife. Die Tatsache, daß diese hydrophobe Tasche auch die Lokalisation von RhoGEF2 vermittelt, läßt vermuten, daß das Protein über eine solche konventionelle Bindung an der Membran im Bereich des Furchungskanals lokalisiert. Dies würde im einfachsten Modell bedeuten, daß ein Transmembranprotein existiert, das innerhalb der Membran in den Bereichen konzentriert ist, an denen sich der Furchungskanal bildet. Ein solches Verhalten kann man zeitweilig für E-cadherin-GFP beobachten. Da die Lokalisation von E-cadherin-GFP auch zeitlich der von 4xPDZ-RFP vorausgeht und E-cadherin am C-Terminus ein PDZ-Bindemotiv der Klasse II besitzt, wäre es ein guter Kandidat, um die Lokalisation von RhoGEF2 zu vermitteln. Im *Yeast-Two-Hybrid* System bindet die PDZ-Domäne von RhoGEF2 jedoch nicht an den intrazellulären Teil von E-cadherin (nicht gezeigt). Man kann natürlich nicht ausschließen, daß RhoGEF2 über ein peripheres Membranprotein mit PDZ-Bindemotiv indirekt an die Membran des Furchungskanals rekrutiert wird. Auch eine Bindung an ein Sequenzmotiv, das nicht die Kriterien der konventionellen C-terminalen Motive der Klassen I-III erfüllt ist möglich, zumal solche Interaktionen in dem in dieser Arbeit beschriebenen *Yeast-Two-Hybrid-Screen* gefunden wurden. Eine weitere Möglichkeit ist eine Protein-Lipid Interaktion. Es gibt Arbeiten, in denen gezeigt wurde, daß PDZ-Domänen direkt an Phospholipide binden können. So können die PDZ-Domänen von Syntenin-1 and Syntenin-2 an Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) binden (Zimmerman et al., 2002). Bei der Kartierung der kritischen Aminosäurereste für die Interaktion der PDZ Domäne 2b von PTP-Bas mit PIP₂ und Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) konnte nachgewiesen werden, daß die Lipidbindestelle teilweise in den Bereich der Carboxylat Bindeschleife, die normalerweise für die Bindung von Peptidliganden verantwortlich ist, fällt (Kachel et al., 2003). Um zu testen, ob Phospholipide eine Rolle bei der Lokalisation von RhoGEF2 spielen könnten, müßte man zunächst *in vitro* Bindetests mit der isolierten PDZ-Domäne machen. Darüber hinaus kann man die Verteilung und die Dynamik von PIP₂ bzw. PIP₃ in der Plasmamembran am Beginn der Zellularisierung mit Hilfe entsprechender GFP-markierter Sensoren sichtbar machen (Stefan et al., 2002).

5.4 Wie kommt RhoGEF an den Furchungskanal?

Bei den Untersuchungen zur Lokalisation von RhoGEF2 im lebenden Embryo wurde sowohl für das vollständige Protein, als auch für die isolierte PDZ-Domäne eine Assoziation mit den Zentrosomen und den Mikrotubuli beobachtet. Diese Beobachtung war unerwartet, da endogenes RhoGEF2 nach Antikörperfärbungen an diesen Stellen im Embryo zuvor nicht nachgewiesen werden konnte. In *Drosophila* S2-Zellen ist für RhoGEF2 eine Kolo­kalisierung mit γ -Tubulin am Zentrosom beschrieben worden (Roger et al., 2004). In diesen Zellen assoziiert RhoGEF2 auch mit den Plusenden von Mikrotubuli. Diese Bindung hängt von EB1 ab und wird nach Expression einer konstitutiv aktiven Form von Concertina aufgehoben. Aufgrund dieser Beobachtungen hat man für die Funktion von RhoGEF2 bei der apikalen Konstriktion von Mesodermzellen am Beginn der Gastrulation ein Modell vorgeschlagen, wie RhoGEF2 diese Konstriktion reguliert (Abb.5.1). Danach wird RhoGEF2 permanent über die Plusenden von Mikrotubuli aus dem Zytoplasma an den Zellkortex transportiert. An der apikalen Zellmembran wird von den Zellen des prospektiven Mesoderm das Protein Fog (codiert von *folded gastrulation*) über eine *twist* abhängige Expression synthetisiert und in den Perivitellinraum sekretiert. Fog bindet an einen unbekannt­en Membranrezeptor, der schließlich das $G\alpha$ -Protein Concertina (*cta*) aktiviert. Über eine Interaktion mit der RGS Domäne von RhoGEF2 könnte diese Aktivierung im apikalen Bereich der Zelle dazu führen, daß die Bindung von RhoGEF2 an die Mikrotubuli aufgehoben wird. Das nun freie Protein könnte über eine PDZ vermittelte Interaktion mit T48, einem Transmembranprotein mit apikaler Lokalisation, am Zellkortex stabilisiert und angereichert werden. In der Folge kommt es hier zu einer verstärkten Rho1 Aktivierung. Dies führt schließlich über die Rho Kinase ROCK zur Aktivierung von Myosin und zur apikalen Konstriktion der Zellen. Es stellt sich die Frage, ob dieses Modell auch für die Lokalisation von RhoGEF2 am Beginn der Zellularisierung gültig sein könnte. Dazu muß man zunächst anmerken, daß mit dem in dieser Arbeit verwendeten RFP-RhoGEF2 Fusionsprotein die Lokalisation in S2-Zellen zwar bestätigt werden konnte, eine entsprechende Assoziation mit Mikrotubuli-Plusenden im Embryo bisher jedoch nicht beschrieben ist und auch in dieser Arbeit nicht beobachtet werden konnte. Ursachen hierfür könnten zum einen in der vergleichsweise schwachen Signalstärke und zum anderen im relativ hohen Hintergrund bei der Expression im Embryo sein. Es gibt jedoch keinen

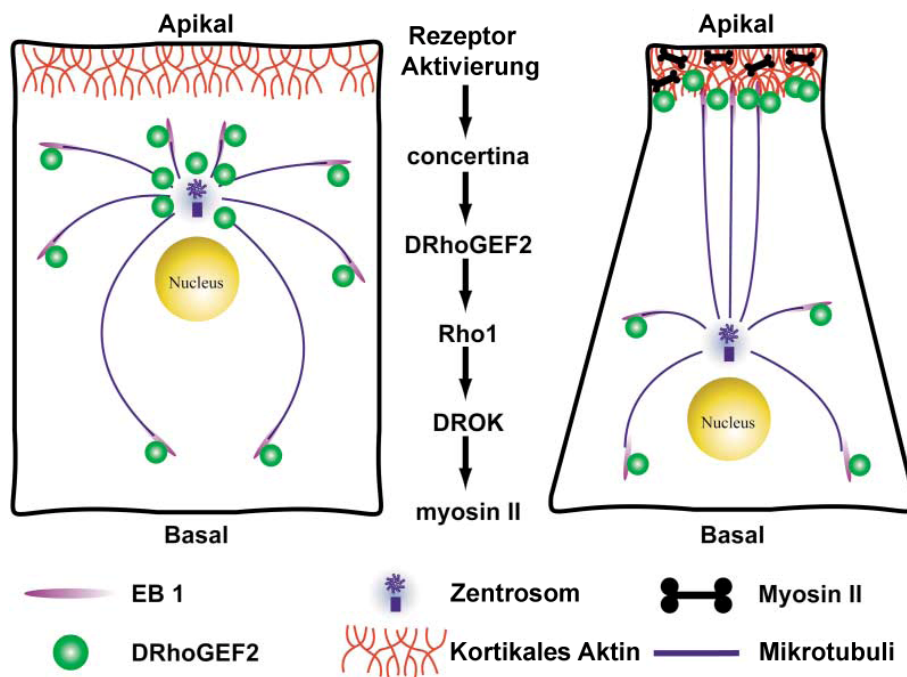


Abbildung 5.1:

Modell zur mikrotubuliabhängigen Akkumulation von RhoGEF2 am apikalen Zellkortex in Mesodermzellen (modifiziert nach Rogers et al., 2005)

Grund anzunehmen, daß sich RhoGEF2 im Hinblick auf die Bindung an Plusenden im Embryo anders verhält, als in Kulturzellen, zumal EB1 in beiden Systemen gleich lokalisiert.

Die Assoziation des Proteins mit den Plusenden von Mikrotubuli würde eine plausible Antwort auf die Frage liefern, wie das Protein an die Stellen in der Membran, an denen später der Furchungskanal gebildet wird, gelangen könnte (Abb.5.2 A). So könnte RhoGEF2 am Beginn der Zellularisierung mit Hilfe von astralen Mikrotubuli in den Bereichen, in denen sich die Mikrotubuli benachbarter Zellkerne überlappen und in denen später die Membran invaginiert, angereichert werden. Regionen mit überlappenden astralen Mikrotubuli lassen sich *in vivo* mit Hilfe von α -Tubulin-GFP beobachten (Kanesaki, unveröffentlicht). Einmal dort angereichert, könnte das Protein dann über eine von der PDZ-Domäne vermittelte Protein-Protein oder Protein-Lipid Interaktion an der Membran stabilisiert werden und die lokale Aktivierung von Rho1 vermitteln. Es ist auch denkbar, daß ähnlich wie für die Gastrulation vorgeschlagen, das Ablösen des Proteins von den Mikrotubuli durch Interaktionen der RGS-Domäne mit einem G-Protein analog zur Funktion von Cta

forciert werden könnte. Für Cta Mutanten ist jedoch kein Phänotyp in der Zellularisierung beschrieben worden, was eine Beteiligung dieses Proteins unwahrscheinlich macht. Auch T48 spielt in der Zellularisierung sicher keine Rolle, da es nur im prospektiven Mesoderm und auch erst zu einem späteren Zeitpunkt exprimiert wird und die Zellularisierung in entsprechenden Mutanten normal abläuft. Die MT-Plusend-Assoziation von RhoGEF2 und die Affinität des Proteins für die Membrandomäne des Furchungskanals könnten auch dazu beitragen, daß die Enden von wachsenden Mikrotubuli durch RhoGEF2 bevorzugt mit der Membran des Furchungskanals interagieren, was beispielsweise die gerichtete Insertion von sekretorischen Vesikeln erlauben würde. Ein ähnlicher Mechanismus führt zum gerichteten Einbau von Connexin Hemikanälen im Bereich der *Gap Junctions* von HeLa Zellen (Shaw et al., 2007). Bisher wird jedoch angenommen, daß die Membrandomäne des Furchungskanals relativ inaktiv ist und der Einbau neuer Membran im Verlauf der Zellularisierung eher im Bereich der apikalen und lateralen Membrandomäne stattfindet (Lecuit & Wieschaus, 2000).

Es ist jedoch auch denkbar, daß die Lokalisation von RhoGEF2 am Furchungskanal unabhängig von einer möglichen Assoziation mit den Plusenden von Mikrotubuli durch direkte PDZ-vermittelte Bindung des Proteins aus einem zytoplasmatischen Pool an einen entsprechenden Liganden in oder an der Plasmamembran erfolgt (5.2 B). Es wäre daher wünschenswert, eine mögliche Bedeutung der Plusendlokalisation im Embryo zu klären. Dazu müßte man zunächst den Bereich von RhoGEF2 kartieren, der für die entsprechende Lokalisation in S2-Zellen verantwortlich ist. Die Bedeutung von Mutationen, die zum Verlust der Plusend-Bindung in Kulturzellen führen, könnte dann speziell mit dem in dieser Arbeit etablierten Verfahren in Rettungs- und Lokalisationsexperimenten direkt im Embryo untersucht werden.

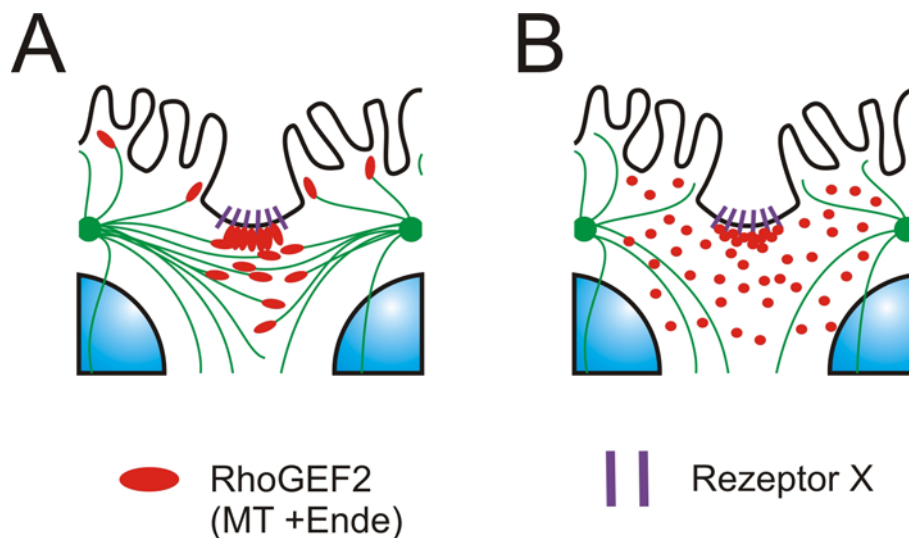


Abbildung 5.2:

Mögliche Szenarien für die Anreicherung von RhoGEF2 in der Region zwischen benachbarten Zellkernen am Beginn der Zellularisierung

A: mikrotubuliabhängiger Transport über Plusend-Assoziation und Bindung an Membranrezeptor X; B: diffusionabhängige direkte Bindung an Rezeptor X aus einem zytoplasmatischen Pool

5.5 Bedeutung der neu identifizierten PDZ_{RG2}-Interaktionspartner für die Lokalisation von RhoGEF2 im Embryo

Mit Hilfe des *Yeast-Two-Hybrid* Systems und nach Bindung von Faktoren aus embryonalen Proteinextrakten an GST-PDZ_{RG2} konnten in dieser Arbeit potentielle Interaktionspartner für RhoGEF2 ermittelt werden, die in der Lage sind, an die PDZ-Domäne des Proteins zu binden. Bei der Mehrheit der so gefundenen Interaktoren handelt es sich um Proteine mit bekannten C-terminalen PDZ-Bindemotiven, was die prinzipielle Eignung des gewählten experimentellen Ansatzes unterstreicht. Aufgrund der recht großen Anzahl möglicher Bindepartner konnten jedoch nicht alle interessant erscheinenden Proteine im Rahmen dieser Arbeit auf eine mögliche Relevanz für die Bindung RhoGEF2s an den Furchungskanal untersucht werden. Eine weitergehende Beurteilung war auch nur in solchen Fällen möglich, in denen Materialien wie Antikörper oder mutante Fliegenstämme zur Verfügung standen. Während man für *yrt*, *Map60* und *T48* eine Rolle bei der Lokalisation von RhoGEF2 während der Furchungskanalbildung definitiv ausschließen kann, ist diese Aussage für *CG9795*, *blot* und *fry* zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich.

CG9795 ist ein nichtkonserviertes Protein ohne bekannte funktionelle Domänen. Das entsprechende Transkript kann im frühen Embryo ubiquitär nachgewiesen werden (<http://flybase.bio.indiana.edu>). Interessant und ein Hinweis auf eine mögliche Funktion im frühen Embryo ist aber, daß CG9795 physikalisch mit Sry- α interagieren kann. Diese Interaktion besteht in beiden Richtungen (Giot et al.; 2003). Im mRNA Injektionsassay ist keine Lokalisation am Furchungskanal zu beobachten. Die Ergebnisse aus solchen Experimenten sind jedoch nicht immer verlässlich. Um deshalb die Lokalisation des endogenen Proteins genauer zu analysieren, wäre die Herstellung eines spezifischen Antikörpers hilfreich. Den Phänotyp von CG9795 defizienten Embryonen während der Zellularisierung kann man aufgrund der proximalen Lage des Gens auf Chromosomenarm 3R nicht mit Hilfe von Keimbahnklonen untersuchen. Eine Alternative dazu könnte die Injektion genspezifischer doppelsträngiger RNA darstellen. Im Gegensatz zu zygotisch exprimierten Genen funktioniert das Ausschalten der Funktion von maternalen Genprodukten durch RNAi jedoch eher selten, vermutlich weil in vielen Fällen nicht nur mRNA, sondern auch Protein von der Mutter im Ei deponiert wird.

In Embryonen aus Keimbahnklonen mit homozygoter *blot*-Mutation findet keine Zellularisierung statt. Hier treten bereits Defekte während der syncytialen Teilungen auf. Die Ausbildung von Aktkappen und Pseudocleavagefurchen ist stark beeinträchtigt. Aufgrund dessen konnte nicht getestet werden, ob die Lokalisation von RhoGEF2 in *blot* Mutanten verändert ist. Sollte Blot aber als Rezeptor die Lokalisation von RhoGEF2 am Fuchungskanal beeinflussen, muß das Protein darüber hinaus noch andere Funktionen während der synytialen Teilungen haben, da diese Teilungen in *RhoGEF2* Embryonen nahezu normal ablaufen. Einen Hinweis auf eine dennoch mögliche funktionelle Verbindung beider Proteine könnte die Untersuchung der Lokalisation von Blot im Embryo liefern. Bei dem Genprodukt von *blot* handelt es sich um ein Transmembranprotein mit PDZ-Bindemotiv der Klasse I. Das erstaunliche ist, das dieses Protein als Natrium- und Chlorid-abhängiger Neurotransmitter-Symporter annotiert ist und eine entsprechende Sequenzhomologie aufweist. Für solche Proteine sind Funktionen außerhalb des Nervensystems bisher nicht bekannt.

5.6 Die Rolle von Zentrosomen, Mikrotubuli und Pseudocleavagefurchen bei der Initiation der Zellularisierung

Die Bildung des Furchungskanals am Beginn der Zellularisierung erfordert eine Polarisierung der embryonalen Plasmamembran. Im Verlauf dieses Polarisierungsprozesses, bilden sich Membrandomänen mit verschiedenen Eigenschaften (Lecuit & Wieschaus., 2002). Dazu muß es eine Information oder ein Signal geben, das festlegt, an welchen Stellen sich diese Membrandomänen bilden. In der regulären Zytokinese kommt das Signal für die Bildung der Teilungsfurche je nach Zelltyp von der mitotischen Spindel und/oder den astralen Mikrotubuli. Im *C.elegans* Embryo induziert ein Signal vom Zentrosom des Spermiums die Polarisierung des Zellkortexes. Auch hier spielen vermutlich Mikrotubuli eine Rolle.

Zentrosomen und astrale Mikrotubuli sind auch im syncytialen *Drosophila* Embryo gute Kandidaten, um die Information über die Position der Zellkerne an die Membran weiterzuleiten und so sicherzustellen, daß in der Zellularisierung jeder Zellkern von Membran umschlossen wird. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Zentrosomen neben ihrer Eigenschaft die Bildung von Aktinkappen und Polzellen zu induzieren, auch in der Lage sind, Aspekte der Furchungskanalbildung zu initiieren, indem eine Reihe von Faktoren, die am Furchungskanal lokalisieren, auch von zusätzlichen freien Zentrosomen in kleinen "Pseudozellen" organisiert werden können. Dabei scheinen die von den Zentrosomen ausgehenden Mikrotubuli eine wichtige Rolle zu spielen, da bei Zerstörung dieser Mikrotubuli durch Colcemid am Beginn von Zyklus 14 die Lokalisation von am Furchungskanal lokalisierenden Proteinen wie 4xPDZ_{RG2}-RFP beeinträchtigt wird.

Die Position der Pseudocleavagefurchen, die sich während Mitose 13 bilden, hat hingegen offenbar keinen Einfluß auf die Lage und Ausbildung der Furchungskanäle. Mit Hilfe von E-cadherin-GFP konnten wir zeigen, daß sich die Pseudocleavagefurchen komplett zurückziehen, bevor es zu einer erneuten Akkumulation des Proteins in den Regionen zwischen den Kernen kommt. Zudem läßt sich auch kein Unterschied in der zeitlichen Abfolge der Bildung "alter" und "neuer" Furchen beobachten. Somit scheinen die Positionen, an denen es am Beginn der Zellularisierung zur Bildung der Furchungskanäle kommt, weniger durch bereits festgelegte Markierungen in der Membran, als vielmehr durch die organisierende Aktivität der Zentrosomen neu festgelegt zu werden. Dies wird auch durch die

Tatsache unterstützt, daß in Mutanten mit Defekten bei der Ausbildung der Furchungskanäle diese nicht automatisch zu einer gestörten Furchungskanalbildung an den betroffenen Stellen führen.

5.7 Die Bildung des Furchungskanals verläuft in zwei Phasen

Durch die Beobachtung der Initiationsphase der Zellularisierung im lebenden Embryo mit Hilfe verschiedener fluoreszenzmarkierter Markerproteine konnten wir nachweisen, daß die Bildung des Furchungskanals nach dem Austritt aus der Telophase von Mitose 13 in zwei Phasen abläuft (Abb.5.3). Dabei kommt es vermutlich durch ein von den Zentrosomen ausgehendes Signal zunächst innerhalb von Minuten nach dem Austritt aus der Telophase von Mitose 13 (Abb.5.3 A) und der Rekonstitution der Kernhüllen zu einer Akkumulation von E-cadherin-GFP an den Stellen, an denen sich der Furchungskanal bildet (5.3 B). Diese erste Phase zeichnet sich durch eine erhöhte Aktivität in der dynamischen Umstrukturierung der Membran

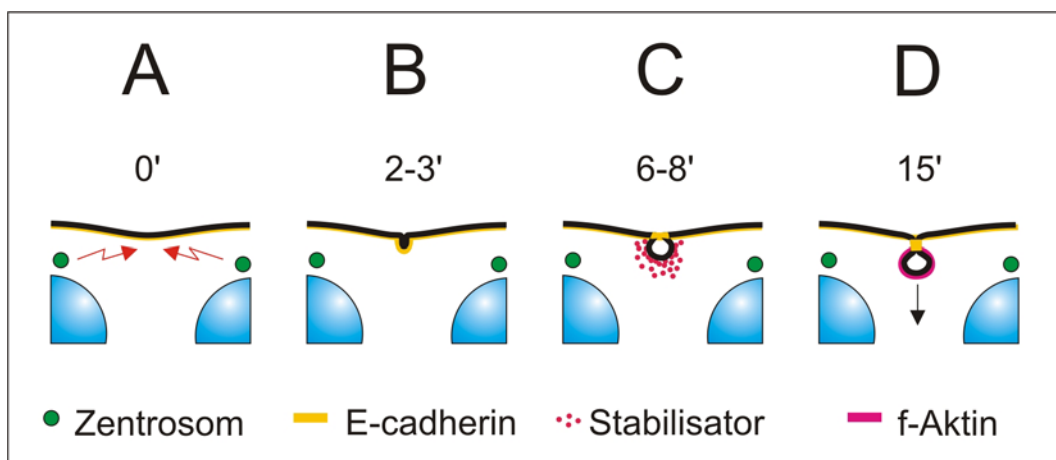


Abbildung 5.3:

Modell für den Ablauf der Furchungskanalbildung

Die Bildung des Furchungskanals verläuft in zwei Phasen. A und B: Nach dem Austritt aus der Telophase von Mitose 13 wird durch ein zentrosomales Signal eine Anreicherung von E-cadherin an der Invaginationsstelle initiiert. C: stabilisierende Faktoren wie RhoGEF2 und Aktin werden rekrutiert. D: der mit einer Aktinhülle ummantelte Furchungskanal beginnt schließlich, ins Innere des Embryos zu wandern.

aus. Sichtbar wird das daran, daß die Level von E-cadherin-GFP in der Membran von Mutanten mit beeinträchtigter Funktion des Recycling Endosoms im Vergleich zu den

Pseudocleavagefurchen der Metaphase von Mitose 13 drastisch reduziert sind. Dies läßt sich sowohl in *nuf*, als auch in *rab11* Embryonen beobachten. Faktoren wie RhoGEF2 und f-Aktin sind erst einige Minuten nach dieser ersten Phase an den gleichen Stellen detektierbar (5.3 C) und sorgen eventuell durch die Verleihung mechanischer Festigkeit für die Stabilisierung der Struktur des Furchungskanals, der dann beginnt ins Innere des Embryos zu wandern (5.3 D).

Dieses Modell wird durch den Phänotyp von *RhoGEF2* Embryonen unterstützt. In solchen Embryonen verläuft die erste Phase nicht anders als im Wildtyp. Unregelmäßigkeiten werden erst nach ca 5-10 Minuten sichtbar. Dann beginnen sich an einigen Stellen die bereits gebildeten Membranverbindungen zwischen benachbarten Zellkernen wieder zurückzuziehen. Diese Rückbildung beginnt in etwa zu dem Zeitpunkt, an dem beispielsweise 4xPDZ_{RG2}-RFP am Furchungskanal sichtbar wird. Mit Hilfe der Analyse entsprechender Mutanten lassen sich außer für *RhoGEF2* und *dia* auch für *nullo* und *dah* Funktionen in dieser zweiten stabilisierenden Phase zuordnen. Mutationen in *abl* betreffen beide Phasen, was ein Hinweis auf eine komplexere Funktion dieses Proteins im von uns untersuchten Prozess ist.

In *RhoGEF2/nullo* Doppelmutanten ist im Gegensatz zu den Einzelmutanten bereits die hexagonale Anreicherung von E-cadherin-GFP in Phase 1 stark beeinträchtigt. Dies scheint im Widerspruch mit der postulierten stabilisierenden Wirkung beider Proteine in Phase 2 zu stehen. Eine mögliche Erklärung könnte sein, daß beide Faktoren in gradueller Weise wirken. Dabei ist ihr jeweiliger Beitrag in Phase I aber gering, so daß in den Einzelmutanten diese nicht beeinträchtigt ist. Erst das Ausschalten beider Genfunktionen führt zu sichtbaren Problemen in der ersten Phase.

In *abl* Mutanten entstehen Lücken in der hexagonalen Membranorganisation sowohl sehr früh unmittelbar nach Austritt aus der Telophase von Mitose 13, als auch zu einem deutlich späteren Zeitpunkt durch Zurückbildung bereits invaginierter Membranabschnitte. Das Protein hat zusätzlich zu seiner stabilisierenden Funktion im späteren Verlauf der Zellularisierung auch eine Funktion in Mitose 13. Dies wird bei Färbungen fixierter *abl* Embryonen deutlich. In solchen Embryonen enthalten Lücken im regulären hexagonalen Gitter oft übergroße Zellkerne, was auf Mitosedefekte hindeutet (nicht gezeigt). In der *abl/nullo* Doppelmutante verläuft nun anders als in *RhoGEF2/nullo* Embryonen die erste Phase der Furchungskanalbildung

ähnlich wie in *abl* Einzelmutanten. Die Membraninvaginationen beginnen sich hier erst in Phase 2 aufzulösen. Dies unterstreicht, daß Abl während der Zellularisierung hauptsächlich zur Stabilisierung der einwandernden Membran beiträgt.

5.8 Modell für die genetische Kontrolle der Zellularisierung

Aus der Analyse der Doppelmutanten kann man ableiten, daß sowohl *RhoGEF2* und *nullo*, als auch *abl* und *nullo* die Furchungskanalbildung in verschiedenen Signalwegen kontrollieren. Dies wird am jeweils verstärkten Phänotyp der Doppelmutante deutlich. Ähnliches läßt sich aus der *RhoGEF2/bnk* Doppelmutante schlußfolgern (Padash Barmchi et al., 2005).

Ausgehend von diesen Beobachtungen läßt sich ein Modell für die genetische Regulation von Furchungskanalbildung und Zellularisierung aufstellen (Abb.5.3).

Danach induzieren die Zentrosomen unter Beteiligung der von ihnen ausgehenden astralen Mikrotubuli über einen unbekanntem Mechanismus eine Polarisierung in der Membran, die in einer ersten Phase zur beginnenden Akkumulation von verschiedenen Faktoren in den Bereichen zwischen den Zellkernen führt. Einer dieser Faktoren ist E-cadherin-GFP. Die Anreicherung von E-cadherin-GFP wird von Genen, die für Komponenten des Recycling Endosoms wie *nuf* und *rab11* kodieren, kontrolliert, was die besondere Bedeutung von endo- und exocytotischen Transportprozessen während dieser Phase unterstreicht. Es ist wahrscheinlich, daß auch die Verteilung anderer Membranproteine, wie z.B. die eines potentiellen Bindepartners für RhoGEF2, auf diese Weise in der Membran dynamisch reguliert wird. Dies ist konsistent mit der Beobachtung, daß die Lokalisation von 4xPDZ_{RG2}-RFP sowohl in *nuf*, wie auch in *rab11* Mutanten stark beeinträchtigt ist (nicht gezeigt). In einer zweiten Phase werden cytoplasmatische Faktoren wie RhoGEF2, Bnk, Nullo, Dah und Abl über Protein-Protein Interaktionen rekrutiert. Die Bindung von RhoGEF2 führt zu einer lokalen Aktivierung von Rho1 und Dia. Mit Hilfe von Dia wird f-Aktin an der Membran des Furchungskanals akkumuliert und stabilisiert diese. Die Lokalisation von Dia am Furchungskanal wird nur zum Teil von RhoGEF2 kontrolliert. Auch *nullo* reguliert über einen unbekanntem Mechanismus die Organisation von f-Aktin am Furchungskanal. Dies sichert dort eventuell die Effizienz endozytotischer Prozesse und könnte somit auch die lokale Aktivität des Recycling Endosoms beeinflussen, was wiederum die korrekte Lokalisation von Komponenten der

Zelladhärenzverbindung wie E-cadherin, Armadillo und α -catenin in dieser Membranregion beeinflusst (Sokac & Wieschaus, in Vorbereitung). Endo- und Exozytosevorgänge werden zudem durch weitere Faktoren wie Dynamin und Syntaxin gesteuert. Auch *dah* kontrolliert über einen unbekanntenen Mechanismus Aktinlevel und

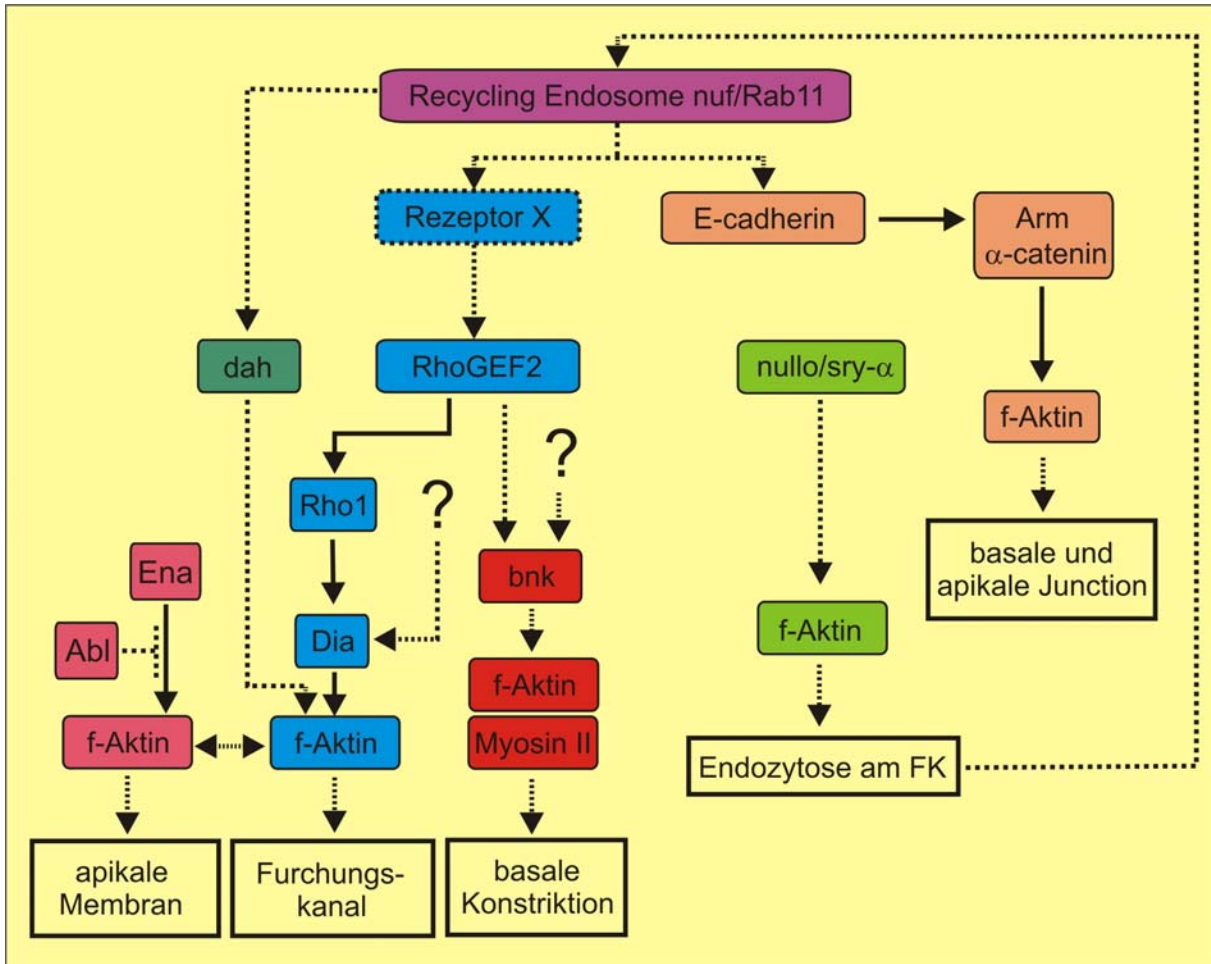


Abbildung 5.4:

Modell zur genetischen Regulation der Zellularisierung

Erläuterungen im Text. Nachgewiesene direkte physikalische Interaktionen sind mit durchgehenden Pfeillinien gekennzeichnet, alle anderen mit gestrichelten Linien. Die Existenz von Rezeptor X ist nicht bewiesen, darum wurde die entsprechende Box gestrichelt umrandet.

Stabilität des Furchungskanals. Die Kontrolle der aktomyosinabhängigen basalen Konstriktion der Zellen ist Aufgabe von *bnk*, dessen Lokalisation zum Teil von RhoGEF2 abhängt. Die bevorzugte Polymerisation langer unverzweigter Aktinfilamente durch Ena wird durch Abl besonders in der apikalen Membranregion negativ reguliert. Darüber werden indirekt auch die Aktinlevel am Furchungskanal beeinflusst.

Die Ausdehnung der in dieser Arbeit begonnenen Analyse der Lokalisationsdynamiken verschiedener beteiligter Faktoren sollte es ermöglichen, die Lücken im hier vorgestellten Modell zur genetischen Regulation von Zellularisierung und Furchungskanalbildung zu schließen und so unser Verständnis für diesen Prozess zu verbessern.

6. Literaturverzeichnis

- Alberts, P., Rudge, R., Irinopoulou, T., Danglot, L., Gauthier-Rouviere, C. and Galli, T.** (2006). "Cdc42 and actin control polarized expression of TI-VAMP vesicles to neuronal growth cones and their fusion with the plasma membrane." *Mol Biol Cell* 17(3): 1194-203.
- Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y. and Kaibuchi, K.** (1996). "Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase)." *J Biol Chem* 271(34): 20246-9.
- Barrett, K., Leptin, M. and Settleman, J.** (1997). "The Rho GTPase and a putative RhoGEF mediate a signaling pathway for the cell shape changes in *Drosophila* gastrulation." *Cell* 91(7): 905-15.
- Bear, J.E., Svitkina, T.M., Krause, M., Schafer, D.A., Loureiro, J.J., Strasser, G.A., Maly, I.V., Chaga, O.Y., Cooper, J.A., Borisy, G.G. and Gertler, F.B.** (2002). "Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility." *Cell* 109(4): 509-21.
- Beronja, S., Laprise, P., Papoulas, O., Pellikka, M., Sisson, J. and Tepass, U.** (2005). "Essential function of *Drosophila* Sec6 in apical exocytosis of epithelial photoreceptor cells." *J Cell Biol* 169(4): 635-46.
- Bradford, M.M.** (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Brand, A.H. and Perrimon, N.** (1993). "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes." *Development* 118(2): 401-15.
- Burgess, R.W., Deitcher, D.L. and Schwarz, T.L.** (1997). "The synaptic protein syntaxin1 is required for cellularization of *Drosophila* embryos." *J Cell Biol* 138(4): 861-75.
- Burridge, K. and Wennerberg, K.** (2004). "Rho and Rac take center stage." *Cell* 116(2): 167-79.
- Campbell, R.E., Tour, O., Palmer, A.E., Steinbach, P.A., Baird, G.S., Zacharias, D.A. and Tsien, R.Y.** (2002). "A monomeric red fluorescent protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(12): 7877-82.
- Chou, T.B. and Perrimon, N.** (1996). "The autosomal FLP-DFS technique for generating germline mosaics in *Drosophila melanogaster*." *Genetics* 144(4): 1673-9.
- Cong, J., Geng, W., He, B., Liu, J., Charlton, J. and Adler, P.N.** (2001). "The furry gene of *Drosophila* is important for maintaining the integrity of cellular extensions during morphogenesis." *Development* 128(14): 2793-802.
- Cowan, C.R. and Hyman, A.A.** (2004). "Centrosomes direct cell polarity independently of microtubule assembly in *C. elegans* embryos." *Nature* 431(7004): 92-6.
- Crawford, J.M., Harden, N., Leung, T., Lim, L. and Kiehart, D.P.** (1998). "Cellularization in *Drosophila melanogaster* is disrupted by the inhibition of rho activity and the activation of Cdc42 function." *Dev Biol* 204(1): 151-64.
- D'Avino, P.P., Savoian, M.S. and Glover, D.M.** (2005). "Cleavage furrow formation and ingression during animal cytokinesis: a microtubule legacy." *J Cell Sci* 118(Pt 8): 1549-58.
- de Anda, F.C., Pollarolo, G., Da Silva, J.S., Camoletto, P.G., Feiguin, F. and Dotti, C.G.** (2005). "Centrosome localization determines neuronal polarity." *Nature* 436(7051): 704-8.

- Doyle, D.A., Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M. and MacKinnon, R.** (1996). "Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ." *Cell* 85(7): 1067-76.
- Emoto, K., He, Y., Ye, B., Grueber, W.B., Adler, P.N., Jan, L.Y. and Jan, Y.N.** (2004). "Control of dendritic branching and tiling by the Tricornered-kinase/Furry signaling pathway in *Drosophila* sensory neurons." *Cell* 119(2): 245-56.
- Fernandez-Borja, M., Janssen, L., Verwoerd, D., Hordijk, P. and Neefjes, J.** (2005). "RhoB regulates endosome transport by promoting actin assembly on endosomal membranes through Dia1." *J Cell Sci* 118(Pt 12): 2661-70.
- Fielding, A.B., Schonteich, E., Matheson, J., Wilson, G., Yu, X., Hickson, G.R., Srivastava, S., Baldwin, S.A., Prekeris, R. and Gould, G.W.** (2005). "Rab11-FIP3 and FIP4 interact with Arf6 and the exocyst to control membrane traffic in cytokinesis." *Embo J* 24(19): 3389-99.
- Fields, S. and Song, O.** (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interactions." *Nature* 340(6230): 245-6.
- Foe, V.E. and Alberts, B.M.** (1983). "Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis." *J Cell Sci* 61: 31-70.
- Foe, V.E., Odell, G.M. and Edgar, B.A.** (1993). "Mitosis and Morphogenesis in the *Drosophila* Embryo: Point and Counterpoint. The Development of *Drosophila melanogaster*. Vol.I." Cold Spring Harbor Laboratory Press 149-300.
- Fox, D.T. and Peifer, M.** (2007). "Abelson kinase (Abl) and RhoGEF2 regulate actin organization during cell constriction in *Drosophila*." *Development* 134(3): 567-78.
- Fujimoto, L.M., Roth, R., Heuser, J.E. and Schmid, S.L.** (2000). "Actin assembly plays a variable, but not obligatory role in receptor-mediated endocytosis in mammalian cells." *Traffic* 1(2): 161-71.
- Fullilove, S.L. and Jacobson, A.G.** (1971). "Nuclear elongation and cytokinesis in *Drosophila montana*." *Dev Biol* 26(4): 560-77.
- Gawlinski, P.** (2007). "Molecular characterization of the *Drosophila* mitotic inhibitor Frühstart." Dissertation, University of Heidelberg, Germany.
- Giot, L., Bader, J.S., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., Hao, Y.L., Ooi, C.E., Godwin, B., Vitols, E., Vijayadamar, G., Pochart, P., Machineni, H., Welsh, M., Kong, Y., Zerhusen, B., Malcolm, R., Varrone, Z., Collis, A., Minto, M., Burgess, S., McDaniel, L., Stimpson, E., Spriggs, F., Williams, J., Neurath, K., Ioime, N., Agee, M., Voss, E., Furtak, K., Renzulli, R., Aanensen, N., Carrola, S., Bickelhaupt, E., Lazovatsky, Y., DaSilva, A., Zhong, J., Stanyon, C.A., Finley, R.L., Jr., White, K.P., Braverman, M., Jarvie, T., Gold, S., Leach, M., Knight, J., Shimkets, R.A., McKenna, M.P., Chant, J. and Rothberg, J.M.** (2003). "A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*." *Science* 302(5651): 1727-36.
- Grevengoed, E.E., Fox, D.T., Gates, J. and Peifer, M.** (2003). "Balancing different types of actin polymerization at distinct sites: roles for Abelson kinase and Enabled." *J Cell Biol* 163(6): 1267-79.
- Grevengoed, E.E., Loureiro, J.J., Jesse, T.L. and Peifer, M.** (2001). "Abelson kinase regulates epithelial morphogenesis in *Drosophila*." *J Cell Biol* 155(7): 1185-98.
- Grosshans, J., Schnorrer, F. and Nusslein-Volhard, C.** (1999). "Oligomerisation of Tube and Pelle leads to nuclear localisation of dorsal." *Mech Dev* 81(1-2): 127-38.

- Grosshans, J., Wenzl, C., Herz, H.M., Bartoszewski, S., Schnorrer, F., Vogt, N., Schwarz, H. and Muller, H.A.** (2005). "RhoGEF2 and the formin Dia control the formation of the furrow canal by directed actin assembly during *Drosophila* cellularisation." *Development* 132(5): 1009-20.
- Häcker, U. and Perrimon, N.** (1998). "DRhoGEF2 encodes a member of the Dbl family of oncogenes and controls cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*." *Genes Dev* 12(2): 274-84.
- Harrison, S.C.** (1996). "Peptide-surface association: the case of PDZ and PTB domains." *Cell* 86(3): 341-3.
- Hunter, C. and Wieschaus, E.** (2000). "Regulated expression of nullo is required for the formation of distinct apical and basal adherens junctions in the *Drosophila* blastoderm." *J Cell Biol* 150(2): 391-401.
- Ishizaki, T., Morishima, Y., Okamoto, M., Furuyashiki, T., Kato, T. and Narumiya, S.** (2001). "Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1." *Nat Cell Biol* 3(1): 8-14.
- Jantsch-Plunger, V. and Glotzer, M.** (1999). "Depletion of syntaxins in the early *Caenorhabditis elegans* embryo reveals a role for membrane fusion events in cytokinesis." *Curr Biol* 9(14): 738-45.
- Jelen, F., Oleksy, A., Smietana, K. and Otlewski, J.** (2003). "PDZ domains - common players in the cell signaling." *Acta Biochim Pol* 50(4): 985-1017.
- Johnson, K., Knust, E. and Skaer, H.** (1999). "bloated tubules (blot) encodes a *Drosophila* member of the neurotransmitter transporter family required for organisation of the apical cytocortex." *Dev Biol* 212(2): 440-54.
- Kachel, N., Erdmann, K.S., Kremer, W., Wolff, P., Gronwald, W., Heumann, R. and Kalbitzer, H.R.** (2003). "Structure determination and ligand interactions of the PDZ2b domain of PTP-Bas (hPTP1E): splicing-induced modulation of ligand specificity." *J Mol Biol* 334(1): 143-55.
- Kellogg, D.R. and Alberts, B.M.** (1992). "Purification of a multiprotein complex containing centrosomal proteins from the *Drosophila* embryo by chromatography with low-affinity polyclonal antibodies." *Mol Biol Cell* 3(1): 1-11.
- Kiehart, D.P., Galbraith, C.G., Edwards, K.A., Rickoll, W.L. and Montague, R.A.** (2000). "Multiple forces contribute to cell sheet morphogenesis for dorsal closure in *Drosophila*." *J Cell Biol* 149(2): 471-90.
- Kölsch, V., Seher, T., Fernandez-Ballester, G.J., Serrano, L. and Leptin, M.** (2007). "Control of *Drosophila* gastrulation by apical localization of adherens junctions and RhoGEF2." *Science* 315(5810): 384-6.
- Lamaze, C., Fujimoto, L.M., Yin, H.L. and Schmid, S.L.** (1997). "The actin cytoskeleton is required for receptor-mediated endocytosis in mammalian cells." *J Biol Chem* 272(33): 20332-5.
- Langevin, J., Morgan, M.J., Sibarita, J.B., Aresta, S., Murthy, M., Schwarz, T., Camonis, J. and Bellaiche, Y.** (2005). "*Drosophila* exocyst components Sec5, Sec6, and Sec15 regulate DE-Cadherin trafficking from recycling endosomes to the plasma membrane." *Dev Cell* 9(3): 355-76.
- Lanzetti, L.** (2007). "Actin in membrane trafficking." *Curr Opin Cell Biol* 19(4): 453-8.
- Laprise, P., Beronja, S., Silva-Gagliardi, N.F., Pellikka, M., Jensen, A.M., McGlade, C.J. and Tepass, U.** (2006). "The FERM protein Yurt is a negative regulatory component of the Crumbs complex that controls epithelial polarity and apical membrane size." *Dev Cell* 11(3): 363-74.

- Lecuit, T., Samanta, R. and Wieschaus, E.** (2002). "slam encodes a developmental regulator of polarized membrane growth during cleavage of the *Drosophila* embryo." *Dev Cell* 2(4): 425-36.
- Lecuit, T. and Wieschaus, E.** (2000). "Polarized insertion of new membrane from a cytoplasmic reservoir during cleavage of the *Drosophila* embryo." *J Cell Biol* 150(4): 849-60.
- Longhurst, D.M., Watanabe, M., Rothstein, J.D. and Jackson, M.** (2006). "Interaction of PDZRhoGEF with microtubule-associated protein 1 light chains: link between microtubules, actin cytoskeleton, and neuronal polarity." *J Biol Chem* 281(17): 12030-40.
- Merrill, P.T., Sweeton, D. and Wieschaus, E.** (1988). "Requirements for autosomal gene activity during precellular stages of *Drosophila melanogaster*." *Development* 104(3): 495-509.
- Minestrini, G., Harley, A.S. and Glover, D.M.** (2003). "Localization of Pavarotti-KLP in living *Drosophila* embryos suggests roles in reorganizing the cortical cytoskeleton during the mitotic cycle." *Mol Biol Cell* 14(10): 4028-38.
- Murthy, M. and Schwarz, T.L.** (2004). "The exocyst component Sec5 is required for membrane traffic and polarity in the *Drosophila* ovary." *Development* 131(2): 377-88.
- Oda, H. and Tsukita, S.** (2001). "Real-time imaging of cell-cell adherens junctions reveals that *Drosophila* mesoderm invagination begins with two phases of apical constriction of cells." *J Cell Sci* 114(Pt 3): 493-501.
- Oegema, K., Marshall, W.F., Sedat, J.W. and Alberts, B.M.** (1997). "Two proteins that cycle asynchronously between centrosomes and nuclear structures: *Drosophila* CP60 and CP190." *J Cell Sci* 110 (Pt 14): 1573-83.
- Padash Barmchi, M., Rogers, S. and Häcker, U.** (2005). "DRhoGEF2 regulates actin organization and contractility in the *Drosophila* blastoderm embryo." *J Cell Biol* 168(4): 575-85.
- Palazzo, A.F., Cook, T.A., Alberts, A.S. and Gundersen, G.G.** (2001). "mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules." *Nat Cell Biol* 3(8): 723-9.
- Papoulas, O., Hays, T.S. and Sisson, J.C.** (2005). "The golgin Lava lamp mediates dynein-based Golgi movements during *Drosophila* cellularization." *Nat Cell Biol* 7(6): 612-8.
- Peel, N., Stevens, N.R., Basto, R. and Raff, J.W.** (2007). "Overexpressing centriole-replication proteins *in vivo* induces centriole overduplication and de novo formation." *Curr Biol* 17(10): 834-43.
- Pelissier, A., Chauvin, J.P. and Lecuit, T.** (2003). "Trafficking through Rab11 endosomes is required for cellularization during *Drosophila* embryogenesis." *Curr Biol* 13(21): 1848-57.
- Pilot, F., Philippe, J.M., Lemmers, C., Chauvin, J.P. and Lecuit, T.** (2006). "Developmental control of nuclear morphogenesis and anchoring by charleston, identified in a functional genomic screen of *Drosophila* cellularisation." *Development* 133(4): 711-23.
- Postner, M.A. and Wieschaus, E.F.** (1994). "The nullo protein is a component of the actin-myosin network that mediates cellularization in *Drosophila melanogaster* embryos." *J Cell Sci* 107 (Pt 7): 1863-73.
- Poulson, D.F.** (1940). "The effects of certain X-chromosome deficiencies on the embryonic development of *Drosophila melanogaster*." *J. exp. Zool.* 83: 271-325.
- Prokopenko, S.N., Brumby, A., O'Keefe, L., Prior, L., He, Y., Saint, R. and Bellen, H.J.** (1999). "A putative exchange factor for Rho1 GTPase is required for initiation of cytokinesis in *Drosophila*." *Genes Dev* 13(17): 2301-14.

- Prokopenko, S.N., Chia, W** (2007). "Enabled and its kinase Abelson provide a secondary input into the Pebble/Rho1/Profilin pathway initiating cytokinesis." *Europ. Dros. Res. Conf.* 20 : F025.
- Raff, J.W. and Glover, D.M.** (1988). "Nuclear and cytoplasmic mitotic cycles continue in *Drosophila* embryos in which DNA synthesis is inhibited with aphidicolin." *J Cell Biol* 107(6 Pt 1): 2009-19.
- Ridley, A.J.** (2006). "Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking." *Trends Cell Biol* 16(10): 522-9.
- Riggs, B., Rothwell, W., Mische, S., Hickson, G.R., Matheson, J., Hays, T.S., Gould, G.W. and Sullivan, W.** (2003). "Actin cytoskeleton remodeling during early *Drosophila* furrow formation requires recycling endosomal components Nuclear-fallout and Rab11." *J Cell Biol* 163(1): 143-54.
- Rogers, S.L., Wiedemann, U., Häcker, U., Turck, C. and Vale, R.D.** (2004). "*Drosophila* RhoGEF2 associates with microtubule plus ends in an EB1-dependent manner." *Curr Biol* 14(20): 1827-33.
- Rørth, P.** (1998). "Gal4 in the *Drosophila* female germline." *Mech Dev* 78(1-2): 113-8.
- Rose, L.S. and Wieschaus, E.** (1992). "The *Drosophila* cellularization gene *nullo* produces a blastoderm-specific transcript whose levels respond to the nucleocytoplasmic ratio." *Genes Dev* 6(7): 1255-68.
- Rothwell, W.F., Fogarty, P., Field, C.M. and Sullivan, W.** (1998). "Nuclear-fallout, a *Drosophila* protein that cycles from the cytoplasm to the centrosomes, regulates cortical microfilament organization." *Development* 125(7): 1295-303.
- Rothwell, W.F., Zhang, C.X., Zelano, C., Hsieh, T.S. and Sullivan, W.** (1999). "The *Drosophila* centrosomal protein Nuf is required for recruiting Dah, a membrane associated protein, to furrows in the early embryo." *J Cell Sci* 112 (Pt 17): 2885-93.
- Rubin, G.M. and Spradling, A.C.** (1982). "Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors." *Science* 218(4570): 348-53.
- Rupp, R.A., Snider, L. and Weintraub, H.** (1994). "Xenopus embryos regulate the nuclear localization of XMyoD." *Genes Dev* 8(11): 1311-23.
- Schejter, E.D. and Wieschaus, E.** (1993). "bottleneck acts as a regulator of the microfilament network governing cellularization of the *Drosophila* embryo." *Cell* 75(2): 373-85.
- Schweisguth, F., Lepesant, J.A. and Vincent, A.** (1990). "The serendipity alpha gene encodes a membrane-associated protein required for the cellularization of the *Drosophila* embryo." *Genes Dev* 4(6): 922-31.
- Scriba, M.E.L.** (1964). "Beeinflussung der frühen Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster* durch Chromosomenaberrationen." *Zool. Jb. Anat.* 81: 435-490.
- Shaw, R.M., Fay, A.J., Puthenveedu, M.A., von Zastrow, M., Jan, Y.N. and Jan, L.Y.** (2007). "Microtubule plus-end-tracking proteins target gap junctions directly from the cell interior to adherens junctions." *Cell* 128(3): 547-60.
- Simoes, S., Denholm, B., Azevedo, D., Sotillos, S., Martin, P., Skaer, H., Hombria, J.C. and Jacinto, A.** (2006). "Compartmentalisation of Rho regulators directs cell invagination during tissue morphogenesis." *Development* 133(21): 4257-67.
- Simpson, L. and Wieschaus, E.** (1990). "Zygotic activity of the *nullo* locus is required to stabilize the actin-myosin network during cellularization in *Drosophila*." *Development* 110(3): 851-63.

- Sisson, J.C., Field, C., Ventura, R., Royou, A. and Sullivan, W.** (2000). "Lava lamp, a novel peripheral golgi protein, is required for *Drosophila melanogaster* cellularization." *J Cell Biol* 151(4): 905-18.
- Sokac, A.M., Co, C., Taunton, J. and Bement, W.** (2003). "Cdc42-dependent actin polymerization during compensatory endocytosis in *Xenopus* eggs." *Nat Cell Biol* 5(8): 727-32.
- Spradling, A.C., Stern, D.M., Kiss, I., Roote, J., Laverty, T. and Rubin, G.M.** (1995). "Gene disruptions using P transposable elements: an integral component of the *Drosophila* genome project." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(24): 10824-30.
- Stefan, C.J., Audhya, A. and Emr, S.D.** (2002). "The yeast synaptojanin-like proteins control the cellular distribution of phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate." *Mol Biol Cell* 13(2): 542-57.
- Stevenson, V., Hudson, A., Cooley, L. and Theurkauf, W.E.** (2002). "Arp2/3-Dependent Pseudocleavage Furrow Assembly in Syncytial *Drosophila* Embryos." *Current Biology* 12: 705-711.
- Sullivan, W., Fogarty, P. and Theurkauf, W.** (1993). "Mutations affecting the cytoskeletal organization of syncytial *Drosophila* embryos." *Development* 118(4): 1245-54.
- Togashi, S. and Okada, M.** (1984). "Arrest of intravitelline mitoses in *Drosophila* embryos by u.v. irradiation of the egg surface." *J Embryol Exp Morphol* 80: 43-61.
- Tsai, M.C. and Ahringer, J.** (2007). "Microtubules are involved in anterior-posterior axis formation in *C. elegans* embryos." *J Cell Biol* 179(3): 397-402.
- van Dam, E.M. and Stoorvogel, W.** (2002). "Dynamin-dependent transferrin receptor recycling by endosome-derived clathrin-coated vesicles." *Mol Biol Cell* 13(1): 169-82.
- Wallar, B.J. and Alberts, A.S.** (2003). "The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton." *Trends Cell Biol* 13(8): 435-46.
- Wen, Y., Eng, C.H., Schmoranzler, J., Cabrera-Poch, N., Morris, E.J., Chen, M., Wallar, B.J., Alberts, A.S. and Gundersen, G.G.** (2004). "EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration." *Nat Cell Biol* 6(9): 820-30.
- Wieschaus, E. and Sweeton, D.** (1988). "Requirements for X-linked zygotic gene activity during cellularization of early *Drosophila* embryos." *Development* 104(3): 483-93.
- Wong, K., Van Keymeulen, A. and Bourne, H.R.** (2007). "PDZRhoGEF and myosin II localize RhoA activity to the back of polarizing neutrophil-like cells." *J Cell Biol* 179(6): 1141–1148.
- Yasuda, G.K., Baker, J. and Schubiger, G.** (1991). "Independent roles of centrosomes and DNA in organizing the *Drosophila* cytoskeleton." *Development* 111(2): 379-91.
- Zhang, C.X., Lee, M.P., Chen, A.D., Brown, S.D. and Hsieh, T.** (1996). "Isolation and characterization of a *Drosophila* gene essential for early embryonic development and formation of cortical cleavage furrows." *J Cell Biol* 134(4): 923-34.
- Zhang, X.M., Ellis, S., Sriratana, A., Mitchell, C.A. and Rowe, T.** (2004). "Sec15 is an effector for the Rab11 GTPase in mammalian cells." *J Biol Chem* 279(41): 43027-34.
- Zhu, K., Debreceni, B., Li, R. and Zheng, Y.** (2000). "Identification of Rho GTPase-dependent sites in the Dbl homology domain of oncogenic Dbl that are required for transformation." *J Biol Chem* 275(34): 25993-6001.
- Zimmermann, P.** (2006). "PDZ domain-phosphoinositide interactions in cell-signaling." *Verh K Acad Geneesk Belg* 68(4): 271-86.

Zimmermann, P. (2006). "The prevalence and significance of PDZ domain-phosphoinositide interactions." *Biochim Biophys Acta* 1761(8): 947-56.

Zimmermann, P., Meerschaert, K., Reekmans, G., Leenaerts, I., Small, J.V., Vandekerckhove, J., David, G. and Gettemans, J. (2002). "PIP(2)-PDZ domain binding controls the association of syntenin with the plasma membrane." *Mol Cell* 9(6): 1215-25.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich in erster Linie bei Dr. Jörg Grosshans für die Möglichkeit bedanken, meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe am ZMBH anzufertigen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Bernhard Dobberstein für seine Bereitschaft, als Zweitgutachter zu fungieren.

Darüber hinaus gilt mein Dank allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Forschungsgruppe Grosshans, insbesondere Yvonne Kussler-Schneider, Dr. Fani Papagiannouli, Dr. Paweł Gawliński und Dr. Sławek Bartoszewski für viele praktische Tips besonders während meiner Anfangszeit und natürlich für die großartigen Kuchen. Bei Hungwei möchte ich mich für seine große Hilfsbereitschaft (besonders bei diversen Hitzeschocks am Wochenende und in den Ferien!) bedanken.

Natürlich danke ich auch den Frauen aus der Spülküche des 2. OGs und allen studentischen Hilfskräften, ohne die meine Fliegen jämmerlich verhungert wären. Kiran von der FG Dobberstein danke ich für viele wertvolle Tips zum GST pull down Assay und Ute von der FG Bujard dafür, daß sie immer gerade die Enzyme hatte, die bei uns nicht zu finden waren.

Schließlich möchte ich mich auch bei meiner Familie bedanken, die zwar nicht weiß, was ich in den letzten viereinhalb Jahren gemacht habe, aber trotzdem immer ein großer Rückhalt war.