Philipps Universität Marburg

Myosin heavy chain like (Mhcl) agiert während der Embryonalentwicklung und Myogenese von *Drosophila melanogaster* in Redundanz zu Zipper, die Funktion des C2-Domänen-Proteins CG10737-P während der Muskelentwicklung bleibt unklar

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

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Bettina Bonn
aus Aschaffenburg

Marburg/Lahn 2010

Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am angenommen

Erstgutachterin: Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Monika Hassel

Tag der mündlichen Prüfung am:

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung 1

2. Einleitung 3

2.1 Die Muskulatur von *Drosophila melanogaster* ist ein geeignetes Modell zur Untersuchung der Muskelentwicklung im Allgemeinen 3

2.2 Die larvale Muskulatur von *D. melanogaster* entwickelt sich durch Fusion zweier unterschiedlicher Zelltypen 4

2.2.1 Im sich entwickelnden Mesoderm werden Founderzellen und fusionskompetente Myoblasten spezifiziert 4

2.2.2 Die Fusion erfolgt in zwei distinkten, voneinander unterscheidbaren Phasen 4

2.2.3 Während der zweiten Fusionsphase werden Unterschiede auf ultrastruktureller Ebene sichtbar 6

2.2.4 Das Protein Kettin stellt eine wichtige Komponente der Sarkomere dar 6

2.2.5 Die viszerale Muskulatur besteht aus ineinander verwobenen Muskeln, welche teilweise durch unvollständig fusionierende Myoblasten entstehen 7

2.3 Für den erfolgreichen Ablauf der somatischen Myogenese werden Proteine mit unterschiedlichen Funktionen benötigt 8

2.3.1 Proteine der Immunglobulin-Superfamilie bewerkstelligen die Erkennung und Adhäsion der Myoblasten 8

2.3.2 Das Multidomänenprotein Rols7/Ants übt im wachsenden Muskel eine essentielle Funktion für die Fusion aus 9

2.3.3 In beiden Zelltypen sind mehrere zytoplasmatische Proteine an der Weiterleitung des Fusionssignals von der Membran zum Aktinzytoskelett beteiligt 10

2.3.4 Durch komplexe Umstrukturierungen des Aktinzytoskeletts kommt es zur Öffnung der Fusionspore und der Integrierung der Myoblaste in den wachsenden Muskel 11

2.4 An der Fusionsstelle wird eine Struktur (FuRMAS) etabliert, die den Bereich der Membranauflösung räumlich begrenzt 13

2.5 Die Beteiligung des unkonventionellen Myosins Mhcl an der Myogenese erscheint plausibel 14

2.6 C2-Domänen-Proteine regulieren Zell-Zell- und Zell-Vesikel-Fusionen 17

2.7 Fragestellung 18

3. Material 19

3.1 Geräte 19

3.2 Chemikalien 19

3.3 Enzyme 20

3.4 Molekularbiologische Reagenzien und Reagenziensätze 20

3.5 Sonstige Materialien 21

3.6 Nähr-und Zuchtmedien 21
3.7 Antikörper und Seren 21
3.8 Fliegenstämme (*Drosophila melanogaster*) 23
3.8.1 Balancerstämme 23
3.8.2 Defizienzen 23
3.8.3 Mutanten 24
3.8.4 P-Element-Insertionen 24
3.8.5 UAS- und GAL4-Linien 24
3.8.6 Reporterstämme 25
3.8.7 Sonstige 25
3.9 Bakterienstämme (*Escherischia coli*) 25
3.10 Plasmide 25
3.11 cDNAs 26
3.12 synthetische Oligonukleotide und damit erstellte Konstrukte 26
3.12.1 Primer 26
3.12.2 Konstrukte 29
3.13 Zell-Linien 30
3.14 Auftragsarbeiten 30
3.15 benutzte Internetseiten 30
4. Methoden 31
4.1 Molekulargenetische Arbeiten 31
4.1.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen 31
4.1.2 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen 31
4.1.3 Transformation chemisch kompetenter Bakterien 32
4.1.4 Transformation elektrokompetenter Zellen 32
4.1.5 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* 32
4.1.5.1 Plasmid-Isolierung im analytischen Maßstab (Mini-Präparation) 32
4.1.5.2 Plasmid-Isolierung im präparativen Maßstab (Midi-Präparation) 33
4.1.6 Gelelektrophorese von DNA in Agarosegelen 33
4.1.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten 34
4.1.7.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen nach der Jetsorb-Methode 34
4.1.7.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen nach der GFX-Methode 34
4.1.8 Präparation von Nukleinsäuren 35
4.1.8.1 Isolation genomischer DNA aus adulten *Drosophilae* mittels Stahlkugeln 35
4.1.8.2 Isolation von RNA aus adulten *Drosophila*-Fliegen 35

4.1.8.3 Aufreinigung von polyA$^+$-RNA (mRNA) 35
4.1.9 Photometrische Konzentrationsbestimmung 36
4.1.10 Konzentrationsabschätzung von DNA mittels Agarosegelelektrophorese 36
4.1.11 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) 36
4.1.12 Reverse Transkriptions-(RT-)PCR 37
4.1.13 Klonierung von PCR-Produkten in TOPO®-Vektoren 37
4.1.14 Enzymatische Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen 38
4.1.15 DNA-Fällung mit Ethanol 38
4.1.16 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren 38
4.1.17 Rekombination von Vektoren des Gateway-Systems 39
4.1.18 Markierung von RNA-Sonden mittels *in vitro*-Transkription 39
4.2 Arbeiten mit *Drosophila melanogaster* 39
4.2.1 Stammhaltung und Zucht von *Drosophila melanogaster* 39
4.2.2 *D. melanogaster*-Kreuzungen 40
4.2.3 Gewinnung von *D. melanogaster*-Embryonen 40
4.2.4 Fixierung von Fliegenembryonen 40
4.2.4.1 Fixierung mit Paraformaldehyd 41
4.2.4.4 Hitzefixierung 41
4.2.5 Präparation von *D. melanogaster*-Geweben 41
4.2.6 P-Element Keimbahntransformationen von *D. melanogaster* 41
4.2.6.1 Vorbereitung der Embryonen 42
4.2.6.2 Mikroinjektion 42
4.2.6.3 Selektion transformierter Fliegen 42
4.2.7 Das UAS-GAL4-System 43
4.2.8 Allelietest 43
4.3 Histologische Methoden an *Drosophila melanogaster*-Embryonen 44
4.3.1 Antikörperfärbung nach der „Avidin-Biotinylated Enzyme Complex“-Methode (ABC-Methode) 44
4.3.2 Immunfluoreszenzfärbung 45
4.3.3 Verstärkung mit dem TSA-System 45
4.3.4 *in situ*-Hybridisierung an fixierten *D. melanogaster*-Embryonen 45
4.3.5 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung 46
4.4 Methoden der Zellkultur 46
4.4.1 Kultivierung von *Drosophila* Schneider-Zellen (SL2) 46
4.4.2 Transfektion von SL2-Zellen 47
4.5 Präparation und Analyse von Proteinen 47

4.5.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen 47
4.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE) 47
4.5.3 Western-Blot-Analyse 48
4.5.4 Ponceau S-Färbung 49
4.5.5 „Strippen“ von Nitrozellulosemembranen 49
4.5.6 Ektopische Expression eines Fusionsproteins in *E. coli* 49
4.5.6.1 Test auf Expression des Proteins 49
4.5.6.2 Aufreinigung ektopisch exprimierten Fusionsproteins aus *E. coli* 49
4.5.7 Aufreinigung eines Fusionsproteins mit His-Anhang per Ni-NTA-Agarose 50
4.5.8 Dialyse 50
4.5.9 Spaltung von Fusionsproteinen mittels rekombinanter Enterokinase 50
4.5.10 Aufreinigung von Immunseren mittels Protein-A-Sepharose 51
4.5.11 Aufreinigung von Immunseren mittels NHS-aktivierter Sepharose 51
4.5.12 Gewinnung von Proteinextrakten aus Embryonen 52
4.5.13 Gewinnung von Proteinextrakten aus SL2-Zellen 52
4.5.14 Co-Immunopräzipitation 53
5. Ergebnisse 54
5.1 Mhcl 54
5.1.1 Nachweis der *Mhcl*-mRNA in *D. melanogaster*-Embryonen 54
5.1.1.1 *Mhcl* besitzt keine maternale Komponente, eine Expression im ZNS kann zudem ausgeschlossen werden 54
5.1.1.2 Die *Mhcl*-Expression scheint auf die FCs beschränkt zu sein 55
5.1.1.3 Die *Mhcl*-Expression ist im somatischen Mesoderm von DMef2 abhängig 57
5.1.1.4 Die *Mhcl*-Expression in Embryonen, welche eine Mutation in fusionsrelevanten Genen tragen, erscheint wildtypisch 58
5.1.2 Die Analyse einer erzeugten *Mhcl*-defizienten Fligenlinie legte in allen analysierten Geweben keine Auffälligkeiten offen 59
5.1.2.1 Die Expression von *Mhcl* wird weder von einem 85 bp stromaufwärts des vorhergesagten Leserahmens inserierten P-Elements noch durch dessen unpräzise Entfernung gestört 59
5.1.2.2 Die Analyse einer mittels FLP/FRT-Systems generierten Deletion von *Mhcl* zeigte in allen untersuchten Geweben keine Auffälligkeiten 61
5.1.3 Ein gegen ein Mhcl-Fragment generierter Antikörper detektiert im *Drosphila*-Embryo unspezifisch die Muskelanheftungsstellen 64
5.1.4 Die ektopische Expression mehrerer UAS-*Mhcl*-Konstrukte ist im *D. melanogaster*-Embryo nicht nachweisbar 67
5.1.5 Die Interaktion zwischen Mhcl und Rols7 konnte nicht verifiziert werden 67

5.1.5.1 Gendosisexperimente mit *rols7*- und *ΔMhcl*-defizienten Embryonen weisen nicht auf eine Interaktion dieser Proteine hin 67
5.1.5.2 Ektopisch in Zellkultur exprimierte Fusionsproteine lassen sich nachweisen 68
5.1.5.3 Durch Co-Immunopräzipitation erzielte Ergebnisse beruhen ausschließlich auf unspezifischen Reaktionen der benutzten Antikörper oder Agarosematrices 69
5.1.6 Der putative Promotorbereich von *Mhcl* kann nicht verifiziert werden 70
5.1.6.1 RT-PCR-Experimente deuten auf mindestens eine *Mhcl*-mRNA hin, die länger als vorhergesagt ist 70
5.1.6.2 Der putative Promotorbereich von *Mhcl* kann die Expression eines Reportergenkonstrukts nicht aktivieren 72
5.1.7 Die Analyse potenzieller Mhcl-Interaktionspartner lieferte keinen Aufschluss über die Beteiligung des Proteins an bestimmten Signalwegen 73
5.1.8 Das Protein Zipper agiert während der Keimstreif-Verlängerung und der Myoblastenfusion in Redundanz zu Mhcl 76
5.1.8.1 *zip2*-mutante Embryonen zeigen maximal leichte Defekte während der Embryogenese 76
5.1.8.2 *zip^2; ΔMhcl*-doppelmutante Embryonen zeigen neben einer starken Störung der allgemeinen Morphologie auch eine reduzierte somatische Fusionsrate 78
5.2 CG10737 81
5.2.1 Nachweis der *CG10737*-mRNA in *D. melanogaster*-Embryonen 81
5.2.1.1 Die Expression des Gens *CG10737* ist im sich entwickelnden somatischen und viszeralen Mesoderm sowie dem ZNS detektierbar 81
5.2.1.2 *Notch*-nullmutante Embryonen zeigen ein verbreitertes *CG10737*-Expressionsmuster 83
5.2.1.3 Die mesodermale *CG10737*-Expression ist von DMef2 abhängig 84
5.2.2 Die Analyse *CG10737*-defizienter Embryonen ließ keine spezifischen Störungen erkennen 85
5.2.3 Ein Konstrukt zur ektopischen Expression von *CG10737* ist zwar funktional, das Fusionsprotein kann in transgenen Embryonen aber nicht nachgewiesen werden 87
5.2.4 Ein aufgereinigter Peptidantikörper gegen CG10737-P erkennt Strukturen im somatischen Mesoderm 88
5.2.5 Der putative Promotorbereich von *CG10737* konnte nicht verifiziert werden 91
5.2.6 Die Analyse des putativen Interaktionspartners Sec5 ergab keinen Aufschluss über eine mögliche Beteiligung von CG10737-P an bestimmten Signalwegen 91
6. Diskussion 93
6.1 Mhcl 93
6.1.1 Mhcl wird während der Myoblastenfusionen spezifisch im viszeralen und somatischen Mesoderm exprimiert 93
6.1.1.1 Mhcl wird zelltypspezifisch in den somatischen und viszeralen FCs exprimiert 93
6.1.1.2 Die *Mhcl*-Expression wird durch den Transkriptionsfaktor DMef2 reguliert 94

6.1.2 Ein erzeugter anti-Mhcl-Antikörper detektiert kein endogenes Protein 94
6.1.3 Es konnte nicht geklärt werden, ob die Expression eines C-terminalen Mhcl-Fragments als eine dominant-negative Version des Protein wirkt 95
6.1.4 Verschiedene Experimente deuten auf die Bildung mehrerer, unterschiedlich regulierter, Mhcl-Isoformen hin 96
6.1.5 Die Interaktion zwischen Mhcl und Rols7 konnte weder bestätigt noch ausgeschlossen werden 98
6.1.6 Mhcl konnte nicht in bestimmte Signalwege eingegliedert werden 99
6.1.7 Mhcl ist für die Myogenese von *D. melanogaster* nicht essentiell 102
6.1.8 Das nicht-muskelspezifische Myosin Zip ist ein Redundanzpartner von Mhcl 104
6.1.8.1 Nicht-muskelspezifische Myosine der Klasse II vermitteln Zellbewegungen 104
6.1.8.2 Die Phänotypen *zip*^{2}*; ΔMhcl*-mutanter Embryonen gehen wahrscheinlich auf Interkalations-Störungen während der Keimstreif-Verlängerung sowie eine Beeinträchtigung der zweiten Fusionsphase zurück 105
6.1.8.3 Die zu Mhcl homologen Proteine MYO18A und B modulieren das Aktin-zytoskelett und regulieren die Bildung und Stabilität der Sarkomere 106
6.1.8.4 PDZ-Domänen vermitteln diverse Protein-Protein-Interaktionen 107
6.1.8.5 Verschiedene unübliche Myosine kontrollieren sehr unterschiedliche Prozesse 108
6.1.9 Es ergeben sich mehrere mögliche Funktionen für Mhcl 109
6.2 CG10737 111
6.2.1 CG1073 wird während der Myoblastenfusionen spezifisch im viszeralen und somatischen Mesoderm exprimiert 111
6.2.2 Endogenes CG10737-P wird von einem generierten Peptid-Antikörper nicht spezifisch erkannt 112
6.2.3 Methodische Schwierigkeiten verhindern die ektopische Expression von CG10737-P in *D. melanogaster* 113
6.2.4 Der genomische Bereich 5´ des Transkriptionsstarts stellt keinen Promotor für *CG10737* dar 114
6.2.5 Der putative Interaktionspartner Sec5 ist für die Bildung der somatischen Muskulatur nicht essentiell 114
6.2.6 CG10737-P spielt keine essentielle Rolle für die Myogenese von *D. melanogaster* 115
6.2.6.1 Der Verlust von *CG10737* ruft keine spezifischen Muskelstörungen hervor 115
6.2.6.2 CG10737-P könnte an der Signaltransduktion oder unterschiedlichen Fusionsprozessen während der Myogenese beteiligt sein 116
6.3 Ausblick 120
6.3.1 Mhcl 120
6.3.2 CG10737 121

7. Literatur 122
8. Anhang 136
8.1 Abkürzungen 136
8.2 Kreuzungsschemata 137
8.2.1 Unpräzise Entfernung des P-Elements *P{EPgy2}EY00454* 137
8.2.2 Rekombination von *Df(3L)BK9/SbTDlZ* und *ΔMhcl/SbTDlZ* 137
8.2.3 Erstellung einer *zip2; ΔMhcl*-doppelmutanten Fliegenlinie 138
8.2.4 Gendosisexperimente 138
8.3 Danksagung 139
8.4 Erklärung 140
8.5 Lebenslauf 141

1. Zusammenfassung

Das unkonventionelle Myosin Mhcl wurde als potenzieller Interaktionspartner von Rols7 identifiziert, welches essentiell für die Myogenese von *Drosophila melanogaster* ist. Die *Mhcl*-mRNA ist zwischen Stadium 10 und 14 spezifisch im somatischen und viszeralen Mesoderm nachweisbar (Bonn, Diplomarbeit 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde mittels *in situ*-Hybridisierung gezeigt, dass die Expression, zumindest im somatischen Mesoderm, auf die FCs beschränkt ist und durch den Transkriptionsfaktor DMef2 reguliert wird. Unterschiedliche Experimente deuten darauf hin, dass mehrere Isoformen von Mhcl gebildet werden, wahrscheinlich durch alternatives Spleißen und die Verwendung unterschiedlicher Promotoren. Zudem wurden mittels RT-PCR Hinweise auf die Existenz eines nicht postulierten 5´-UTR-Bereichs erzielt. Ein generierter anti-Mhcl-Antikörper detektiert zwar ektopisch exprimiertes Protein, produziert in Embryonen aber nur unspezifische Färbung. Versuche, die potenzielle Interaktion zwischen Mhcl und Rols7 durch genetische Experimente oder Co-Immunopräzipitations-Studien zu beweisen, schlugen fehl. Es wurde gezeigt, dass Mhcl in Redundanz zu Zip agiert. Beide haben eine wichtige Funktion in frühen Stadien der Embryonalentwicklung und sind dort wahrscheinlich für die korrekte Interkalation von Zellen während der Keimstreif-Verlängerung verantwortlich. Der Verlust beider Myosine führt zu einem Stopp der somatischen Myogenese nach der ersten Fusionsphase. Daher wird postuliert, dass Mhcl die Bewegung der FCMs in Richtung der wachsenden Muskeln oder die der Muskeln in Richtung der epidermalen Anheftungsstellen regulieren könnte. Darüber hinaus erscheint eine Funktion für die Etablierung der Sarkomere plausibel.

C2-Domänen sind in der Lage, in Membranen zu inserieren und dadurch deren Fusion zu fördern. Eine solche fusogene Wirkung auf die Myoblastenfusion war bisher für keines dieser Proteine bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde mittels *in situ*-Hybridisierung gezeigt, dass *CG10737*, welches u. a. eine C2-Domäne kodiert, während der fusionsrelevanten Stadien sowohl im somatischen als auch im viszeralen Mesoderm exprimiert ist. Diese Expression ist von dem Transkriptionsfaktor DMef2 abhängig, und zumindest im somatischen Mesoderm auf die FCs beschränkt. Durch Immunhistologie an Embryonen sowie Western-Blot-Analysen wurde gezeigt, dass der generierte Peptid-Antikörper nicht in der Lage ist, das Protein spezifisch zu detektieren. Obwohl der Verlust von *CG10737* keine Störungen der Myoblastenfusion oder der Anheftung der Muskeln an die Epidermis hervorruft, wird postuliert, dass CG10737-P an der Signaltransduktion während der Myogenese sowie der Ausbildung neuromuskulärer Verbindungen beteiligt sein könnte.

Summary

The unconventional myosin Mhcl was originally identified as potential interaction partner of Rols7, which is essential for *Drosophila* myogenesis. During the fusion relevant stages, Mhcl transcript is detectable both in the somatic and the visceral mesoderm (Bonn, Diplomarbeit 2006). Here we could show via *in situ* hybridization that the gene is expressed founder cell specifically and regulated by the transcription factor DMef2. By analyzing different P element fly lines with the help of *in situ* hybridization, it became obvious that there are different isoforms of Mhcl established, most likely via differential splicing and the use of different promoters. Furthermore, RT-PCR products revealed the existence of a so far unpredicted 5´-UTR. We raised an antibody against a protein fragment of Mhcl, which detects ectopically expressed protein but showed only unspecific stainings on embryos. We were not able to verify the predicted interaction of Mhcl and Rols7, neither with genetic studies nor by doing co immunoprecipitation analysis. We could show that Mhcl works in redundancy to Zip during early morphogenetic processes. Here they are most likey responsible for the correct intercalation of cells during germ band elongation. Double mutant embryos for both *zip* and *Mhcl* stop myoblast fusion after the first fusion phase. Therefore we postulate that Mhcl regulates the migration of FCMs towards the growing myotubes or the migration of muscles towards their attachement sites. The implication of Mhcl in establishing the sarcomeres seems feasible.

C2 domains are able to insert into membranes and thereby promote their fusion. The participation in myoblast fusion could not be shown for any of these fusogens, yet. Here we could show by *in situ* hybridization that *CG10737*, which codes for one of these domains, is expressed during myoblast fusion in the somatic as well as in the visceral mesoderm. Its expression is regulated by the transcription factor DMef2 and in the somatic mesoderm limited to the FCs. Immunhistological stainings on embryos could show, as well as western blot analysis, that the generated peptide antibody does not detect the protein specifically. Although deletion of *CG10737* does not cause any myoblast fusion or attachement defects, we postulate a function for CG10737-P for signal transduction during myogenesis or for establishing neuromuscular junction.

2. Einleitung

2.1 Die Muskulatur von *Drosophila melanogaster* ist ein geeignetes Modell zur Untersuchung der Muskelentwicklung im Allgemeinen

Die Taufliege *Drosophila melanogaster* erfüllt viele Anforderungen an einen klassischen Modellorganismus wie einfache, kostengünstige Haltung, kurze Generationsdauer, eine große Anzahl an Nachkommen sowie leicht durchführbare genetische Manipulationen. Da seit zehn Jahren die Sequenzdaten des *D. melanogaster*-Genoms zur Verfügung stehen (Adams et al., 2000, Myers et al., 2000), können computergestützte Untersuchungen, etwa zur Vorhersage von Protein-eigenschaften oder zur Planung genetischer und molekulargenetischer Experimente, ausgeführt werden.

Die larvale Muskulatur von *Drosophila melanogaster* unterteilt sich in die somatische Körperwand- oder Bewegungsmuskulatur, die viszerale Darmmuskulatur und die Herzmuskulatur. Somatische und viszerale Muskeln stellen, wie die quergestreiften Muskeln höherer Wirbeltiere, mehrkernige Synzytien dar, die durch fusionierende Myoblasten entstehen. Dazu wandern die Zellen, nachdem sie sich erkannt haben, aufeinander zu und lagern sich mit den Membranen aneinander. Nach Ausbildung des Zell-Zell-Kontakts werden Fusionsporen gebildet, die das zytoplasmatische Kontinuum herstellen, überschüssige Membranteile werden vesikuliert und entfernt. Die Fusion endet mit der Integration der Myoblaste in den wachsenden Muskel (Übersichtsartikel: Horsley and Pavlath, 2004, Önel et al., 2010, Rochlin et al., 2010). Durch intensive Forschung wurde bekannt, dass die Myogenese der Vertebraten große Ähnlichkeit zur Muskelentwicklung der Taufliege aufweist und durch viele funktional konservierte Moleküle geregelt wird. Daher bietet es sich an, zuerst die Funktion diverser Gene sowie grundsätzliche Abläufe an diesem Modell zu studieren, um anschließend die Muskelentwicklung und -regeneration der Säuger, die experimentell sehr viel schlechter zugänglich sind, gezielt auf analoge Vorgänge hin zu untersuchen.

2.2 Die larvale Muskulatur von *D. melanogaster* entwickelt sich durch Fusion zweier unterschiedlicher Zelltypen

2.2.1 Im sich entwickelnden Mesoderm werden Founderzellen und fusionskompetente Myoblasten spezifiziert

Das Zusammenspiel mehrerer ektodermaler und mesodermaler Signale führt in frühen Embryonalstadien zunächst zur Spezifizierung des somatischen und viszeralen Mesoderms, aus dem sich die Körperwand- bzw. die Darmmuskulatur der *D. melanogaster*-Larve entwickelt (Riechmann et al., 1997). Im somatischen Mesoderm, das durch ein hohes Expressionslevel des Transkriptionsfaktors Twist charakterisiert ist, werden durch laterale Inhibition mittels des Notch-Delta-Signalwegs und unter Einfluss extrinsischer und intrinsischer Regulatoren sogenannte Muskelprogenitorzellen festgelegt, während die restlichen Zellen das Schicksal von FCMs (fusionskompetenten Myoblasten) annehmen (Übersichtsartikel: Maqbool and Jagla, 2007). Durch eine weitere Zellteilung entstehen aus einem Progenitor entweder zwei FCs (founder cells oder Gründerzellen) oder eine FC und ein adulter Muskelprogenitor, der während der Metamorphose für den Aufbau eines Teils der adulten Muskulatur benötigt wird (Bate et al., 1991).

Jede FC exprimiert ein charakteristisches Set verschiedener Transkriptionsfaktoren, welche die Identität eines einzelnen Muskels und damit dessen Größe, Orientierung, Innervierung und Anheftungsstelle an die Epidermis festlegen (Übersichtsartikel: Baylies et al., 1998, Frasch, 1999, Maqbool and Jagla, 2007, Paululat et al., 1999, Taylor, 1998). Alle FCMs sind durch die Expression des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors Lmd (Lameduck)/Minc (Myoblasts incompetent)/Gfl (Gleeful) identifizierbar (Duan et al., 2001, Furlong et al., 2001, Ruiz-Gómez et al., 2002), wobei aktuelle Untersuchungen auch hier auf Unterschiede in der Zellpopulation hinweisen (Übersichtsartikel: Rochlin et al., 2010). Nach erfolgter Fusion werden die Zellkerne der FCMs auf das Expressionsmuster der FC umprogrammiert. Der Lmd/Minc/Gfl-Abbau könnte durch die E3-Ubiquitinligase Mind bomb 2 reguliert werden, die auch für Muskelintegrität und -stabilität nötig ist (Carrasco-Rando and Ruiz-Gómez, 2008, Nguyen et al., 2007).

2.2.2 Die Fusion erfolgt in zwei distinkten, voneinander unterscheidbaren Phasen

Die larvale Körperwandmuskulatur von *D. melanogaster* besteht aus etwa 30 Muskeln pro Hemisegment, die in einem sehr klar strukturierten, sich wiederholenden Muster angeordnet sind (siehe Abb. 2.1 A). Jeder Muskel entsteht durch Fusionen zwischen je einer FC und

mehreren FCMs in einem Zeitraum von etwa fünfeinhalb Stunden, wobei eine einzelne Fusion innerhalb weniger Minuten abgeschlossen ist (Beckett and Baylies, 2007). Die Entwicklung des Muskels geschieht in zwei, zeitlich aufeinander folgenden Fusionsphasen, die sich wahrscheinlich genetisch unterscheiden. Zunächst entstehen durch die Fusion einer FC mit wenigen FCMs sogenannte zwei- bis dreikernige PCs (precursor cells oder Vorläuferzellen) (siehe Abb. 2.1 B), die anschließend weitere FCMs rekrutieren, bis die endgültige Größe des Muskels erreicht ist (Bate, 1990; siehe Abb. 2.1 C - E). Entwickelt wurde dieses Modell aufgrund der Beobachtung, dass es zwei Klassen mutanter Embryonen zu geben scheint: einerseits die, die überhaupt keine Fusionen mehr durchführen können und andererseits solche, bei welchen die Muskelentwicklung auf der Stufe zwei- bis dreikerniger Myoblasten stoppt (Rau et al., 2001, Schröter et al., 2004).

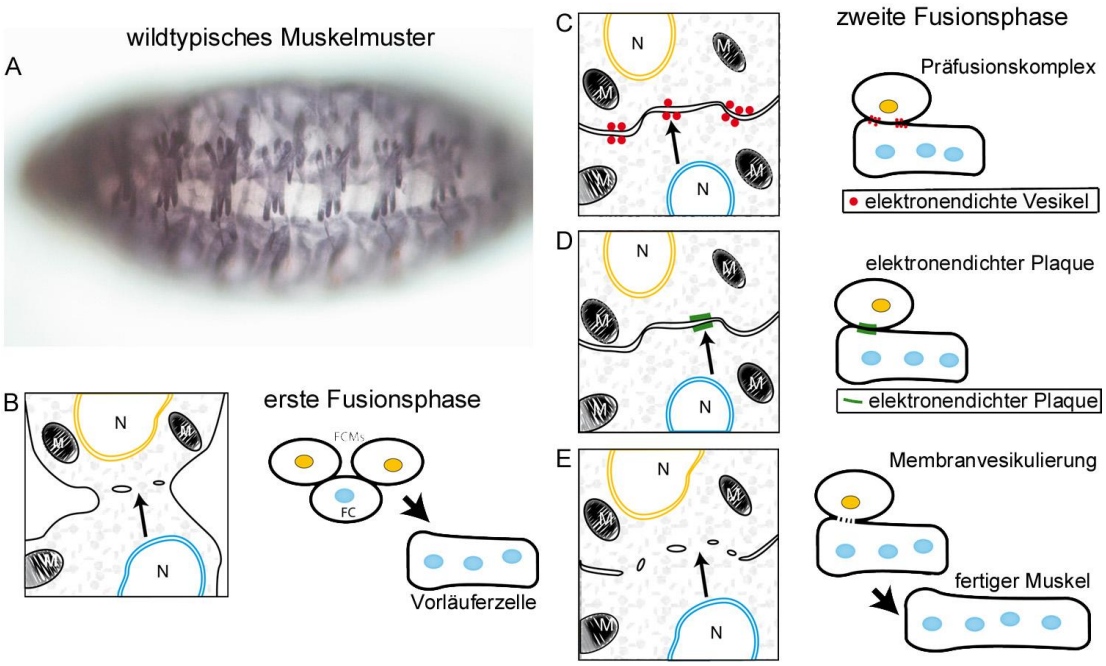

Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Bildung der Körperwandmuskulatur von *Drosophila melanogaster*
A: Die somatische Muskulatur der Fruchtfliege besteht aus etwa 30 charakteristisch angeordneten Muskeln pro Hemisegment, die sich durch ihre Größe, Form, Innervierung und Anheftung an die Epidermis unterscheiden, hier dargestellt durch immunhistologische Färbung mit dem anti-β3-Tubulin-Antikörper. **B**: In der ersten Fusionsphase entstehen durch Fusion zwischen einer FC (blaue Kerne) und wenigen FCMs (gelbe Kerne) sogenannte Vorläuferzellen. **C - E**: In der zweiten Fusionsphase wird die endgültige Größe des fertigen Muskels erreicht, indem die Vorläuferzelle weitere FCMs rekrutiert. Währenddessen sind charakteristische, elektronenmikroskopisch sichtbare Strukturen zu erkennen: der Präfusionkomplex mit elektronendichten Vesikeln (**C**), elektronendichte Plaques (**D**) und die Vesikulierung der Membran (**E**) (verändert nach Önel et al., 2010).

Vor kurzem wurde ein zweites Modell postuliert, nach welchem die reduzierte Kernzahl in Muskeln mutanter Embryonen aus einer Verzögerung der Myogenese resultiert, da die fehlenden Genprodukte für eine effiziente Fusion benötigt werden (Beckett and Baylies,

2007). Die Frage, welche Hypothese zutreffender ist, bedarf weiterer Klärung (Übersichtsartikel Önel and Renkawitz-Pohl, 2009), was allerdings durch die Tatsache erschwert wird, dass die mRNA mancher Gene für den Embryo durch die Oozyten bereitgestellt wird und dadurch auch die defizienten Embryonen noch eine kleine Menge aktiven Proteins besitzen. Je nach Zeitpunkt des Abbaus des entsprechenden Proteins können daher noch verschiedene spezifische Funktionen ausgeführt werden.

2.2.3 Während der zweiten Fusionsphase werden Unterschiede auf ultrastruktureller Ebene sichtbar

Aufgrund intensiver Studien auf elektronenmikroskopischer Ebene (Doberstein et al., 1997) wurden distinkte Strukturen beschrieben, die bisher nur in der zweiten Fusionsphase beobachtet werden konnten (Übersichtsartikel: Önel et al., 2010): Nachdem der Zell-Zell-Kontakt zwischen FCM und wachsendem Muskel ausgebildet wurde lagern sich im Präfusionskomplex elektronendichte Vesikel, die vom Golgi-Apparat abgeschnürt werden, paarweise an den gegenüberliegenden Membranen an (siehe Abb. 2.1 C). Es könnte sein, dass mittels dieser Vesikel fusionsrelevante Proteine zur Kontaktstelle der beiden Zelltypen gebracht werden. Weitere Strukturen mit bisher ungeklärter Funktion und molekularen Komponenten stellen die elektronendichten Plaques dar, die sich ebenfalls an den fusionierenden Membranen anlagern und Desmosomen ähneln (siehe Abb. 2.1 D). Die ursprüngliche Annahme, die elektronendichten Plaques gingen aus dem Präfusionskomplex hervor (Doberstein et al., 1997), konnte bisher noch nicht bewiesen werden. In direkter Nachbarschaft zu diesen Plaques kommt es zum Abbau der Membran und dem Entfernen der vesikulierenden Membranreste, wodurch auch eine zytoplasmatische Verbindung hergestellt wird (siehe Abb. 2.1 E). Die Fusion ist beendet, wenn die Myoblaste in den wachsenden Muskel integriert wurde.

2.2.4 Das Protein Kettin stellt eine wichtige Komponente der Sarkomere dar

Am Ende der Embryogenese, kurz vor dem Übergang zum ersten Larvenstadium, heften sich die Muskeln an spezielle epidermale Zellen an, die als tendon cells oder Apodeme bezeichnet werden. Außerdem werden die Sarkomere, die funktionellen Grundeinheiten der somatischen Muskulatur, etabliert. Ein Sarkomer entspricht der Distanz zwischen zwei Z-Scheiben und ist aus parallel angeordneten Aktin- und Myosinfilamenten aufgebaut. Somit unterscheidet man zwischen der I-Bande (nur Aktin), der M-Linie (nur Myosin) und der A-Bande (Aktin und Myosin) (siehe Abb. 2.2). Die Aktinfilamente sind mit einem Ende in den Z-Scheiben verankert und werden während der Kontraktion und Entspannung der Muskeln ständig gegen die Myosine verschoben. Um die Sarkomere gegen diese mechanischen Kräfte zu stabilisieren,

sind bestimmte Proteine am Aufbau der Z-Scheiben beteiligt, die ihnen eine gewisse Steifheit, aber auch Elastizität verleihen (Bullard et al., 2005). *sallimus (sls)* kodiert mehrere Proteinformen, welche zu dem Protein Titin der Vertebraten funktional konserviert und teilweise an der Myoblastenfusion beteiligt sind (Machado and Andrew, 2000, Zhang et al., 2000).

Die Isoform Kettin ist mit ihrem N-Terminus in den Z-Scheiben verankert, für deren Aufbau sie essentiell ist, und besteht hauptsächlich aus tandemartig angeordneten Ig-Domänen, die das Protein als molekulare Feder wirken lassen (Bullard et al., 2005, Bullard et al., 2006, van Straaten et al., 1999). Zumindest in der adulten Flugmuskulatur bindet Kettin nahe der Z-Scheiben an die Aktinfilamente und inseriert mit seinem C-Terminus in die A-Bande, wodurch es die beiden Filamenttypen miteinander verknüpft und so zur Stabilität im Sarkomer beiträgt (Bullard et al., 2005, van Straaten et al., 1999). Das Protein ist ab Stadium 11 in der somatischen Muskulatur exprimiert, wo es hauptsächlich in den FCMs an deren Kontaktstelle zum wachsenden Muskel nachweisbar ist. Es lokalisiert ab Stadium 16 zunächst an den Muskelanheftungsstellen bzw. den terminalen Z-Scheiben und kann mit fortschreitendem Aufbau der Z-Scheiben des Sarkomers an diesen detektiert werden (Hakeda et al., 2000, Machado et al., 1998, Zhang et al., 2000).

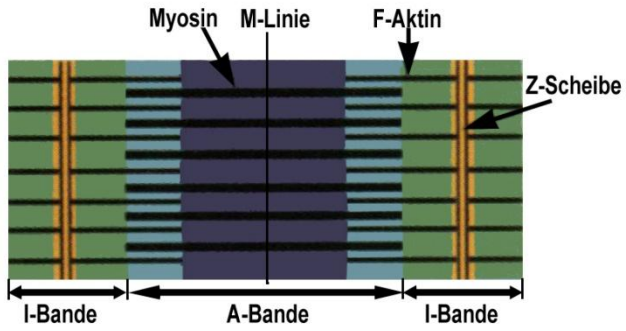

Abb. 2.2: Schematische Darstellung des Sarkomers
Als Sarkomer bezeichnet man die Distanz zwischen zwei Z-Scheiben, in welche die dünnen Aktinfilamente verankert sind. Aufgrund der partiellen Überlappung mit den dicken Myosinfilamenten entstehen die A-Bande (Aktin und Myosin), die I-Bande (nur Aktin) und die M-Linie (nur Myosin) (Verändert nach Hakeda et al., 2000).

2.2.5 Die viszerale Muskulatur besteht aus ineinander verwobenen Muskeln, welche teilweise durch unvollständig fusionierende Myoblasten entstehen

Die viszerale Muskulatur, die den Mitteldarm und eine endodermale Epithelialschicht umgibt, besteht aus zirkulären und longitudinalen Muskeln, die, zeitlich versetzt, ebenfalls durch Fusionen zwischen FCs und FCMs gebildet werden (Klapper et al., 2001, Klapper et al., 2002, San Martin and Bate, 2001). Die Differenzierung der FCs und FCMs verläuft wie im somatischen Mesoderm unter Beteiligung des Notch-Signalwegs. Zusätzlich sind das von somatischen PCs sekretierte Protein Jelly belly und dessen Rezeptor Anaplastic Lymphoma Kinase/Milliways an der Determination der viszeralen FCs beteiligt (Englund et al., 2003, Lee et al., 2003, Stute et al., 2004). Die palisadenartig geformten FCs der zirkulären Muskulatur sind zusammen mit den FCMs für beide Muskeltypen, die dorsal der FCs liegen, im TVM

(Trunk Visceral Mesoderm oder Rumpfmesoderm) als Zellgruppen angelegt und vereinigen sich im Laufe der Entwicklung zu einem Band auf beiden Seiten des Embryos. Die FCs der longitudinalen Muskulatur werden am posterioren Pol des Embryos (Caudal Visceral Mesoderm, CVM) gebildet und wandern entlang der sich bildenden zirkulären Muskulatur nach anterior. Während die longitudinalen Muskeln mehrkernige Synzytien darstellen, fusionieren die FCs der zirkulären Muskulatur mit nur einer Myoblaste (Klapper et al., 2002). Diese Fusion bleibt unvollständig, weshalb zytoplasmatische Brücken zwischen den Zellen ausgebildet werden, die mit den longitudinalen Muskeln netzartig verwoben sind (Schröter et al., 2006). Einige Proteine, die an der somatischen Myogenese beteiligt sind (siehe 2.3), üben eine ähnliche Funktion beim Aufbau der Mitteldarmmuskulatur aus. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass der Kontakt zum Endoderm eine wichtige Rolle für die Elongation der zirkulären viszeralen Muskeln spielt (Wolfstetter et al., 2009).

2.3 Für den erfolgreichen Ablauf der somatischen Myogenese werden Proteine mit unterschiedlichen Funktionen benötigt

2.3.1 Proteine der Immunglobulin-Superfamilie bewerkstelligen die Erkennung und Adhäsion der Myoblasten

Vier Transmembranproteine aus der Immunglobulin-Superfamilie sind für die Erkennung der beiden Zelltypen sowie die Etablierung und Aufrechterhaltung ihres Kontakts verantwortlich. Dabei ist das Protein Duf (Dumbfounded)/Kirre (Kin of Irre) ausschließlich auf der Seite der FCs/wachsendenden Muskeln, die Proteine Sns (Sticks and Stones) und dessen Paralog Hbs (Hibris) auf der Seite der FCMs exprimiert, wohingegen Rst (Roughest)/IrreC (Irregular Chiasm C) in beiden Zelltypen nachweisbar ist (Bour et al., 2000, Dworak et al., 2001, Ruiz-Gómez et al., 2000, Strünkelnberg et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass Duf/Kirre und Rst/IrreC in den FCs funktionell redundante Funktionen ausüben, da nur die Deletion beider Gene zu einem Fusionsstopp führt. Sie agieren als sogenannte chemoattraktive Signale, die bei ektopischer Expression z. B. in der Epidermis FCMs dorthin rekrutieren (Ruiz-Gómez et al., 2000, Strünkelnberg et al., 2001). Mittels Zeitraffer-Mikroskopie wurde zudem gezeigt, dass FCMs Filopodien in Richtung der FC ausstrecken, die weiter in der Peripherie des Embryos lokalisiert sind, und zu dieser hin wandern (Beckett and Baylies, 2007, Richardson et al., 2007). Bisher konnte allerdings noch nicht geklärt werden, ob Teile der extrazellulären Domäne sekretiert werden oder ob das Protein von der Membran ausgehend agiert.

Die Deletion von *sns* führt ebenfalls dazu, dass die Muskeln dieser Embryonen kaum noch Fusion durchlaufen können (Bour et al., 2000), wohingegen die Deletion von Hbs aufgrund partieller Redundanz zu Sns nur milde Phänotypen hervorruft (Shelton et al., 2009).
Die extrazellulären Bereiche dieser Proteine bestehen aus mehreren Immunglobulin-Domänen und vermitteln vermutlich die Adhäsion zwischen FCs und FCMs. Für diese Theorie spricht, dass zumindest in Zellkultur-Experimenten *Drosophila*-Zellen, die entweder Duf/Kirre oder Rst/IrreC exprimieren, eine heterologe Zelladhäsion mit Sns-exprimierenden Zellen durchführen können (Galletta et al., 2004). Außerdem bilden die FCMs in *sns*-mutanten Embryonen keine Filopodien mehr in Richtung der FCs aus (Übersichtsartikel: Abmayr et al., 2008). Die zytoplasmatischen Domänen hingegen werden für die erfolgreiche Signalweiterleitung innerhalb der Zellen benötigt, was letztendlich zur Umorganisierung des Aktinzytoskeletts, zum Membranabbau und dem erfolgreichen Abschluss der Myoblastenfusion führt (siehe 2.3.4).

2.3.2 Das Multidomänenprotein Rols7/Ants übt im wachsenden Muskel eine essentielle Funktion für die Fusion aus

Das Gen *rols7 (rolling pebbles7)/ants (antisocial)* kodiert ein Adapterprotein, das eine RING-Fingerdomäne, neun Ankyrin-Wiederholungen und drei TPR-Wiederholungen besitzt (siehe Abb. 2.3), die für Protein-Protein-Interaktionen bekannt sind. Es ist im Embryo ausschließlich in den FCs/wachsenden Myotuben exprimiert, bei einer Deletion des Gens bilden die mutanten Embryonen nur noch kleine Synzytien aus, was für eine Beteiligung des Proteins an der zweiten Fusionsphase spricht (Chen and Olson, 2001, Menon and Chia, 2001, Rau et al., 2001). Co-Immunopräzipitations-Studien mit Proteinextrakten aus transfizierten Zellen und Hefe-Zwei-Hybrid-Experimente lassen eine direkte Interaktion zwischen der TPR-E-Wiederholung von Rols7/Ants und dem intrazellulären Teil von Duf/Kirre vermuten (siehe Abb. 2.3, Abb. 2.4, Chen and Olson, 2001, Kreisköther et al., 2006). Weitere Experimente konnten zeigen, dass Rols7/Ants, evtl. auch unter Beteiligung der Ankyrin-Wiederholungen, nach erfolgter Etablierung des Zell-Zell-Kontakts von Duf/Kirre an die Membran rekrutiert wird. Dort ist Rols7/Ants für die Stabilität des Kontakts und die Regulierung der Protein-Menge von Duf/Kirre verantwortlich (Chen and Olson, 2001, Menon and Chia, 2001, Menon et al., 2005, Rau et al., 2001). Die Weiterleitung des Fusionssignals zum Aktinzytoskelett könnte über Mbc (Myoblast City) ablaufen, da für beide Proteine eine schwache Interaktion in Co-Immunopräziptitations-Studien gezeigt wurde (siehe Abb. 2.4, Chen and Olson, 2001).
Nach Abschluss der Myoblastenfusion ist Rols7/Ants in den Z-Scheiben der Sarkomere und den terminalen Z-Scheiben, die für die Integration der Muskeln in die Epidermis verantwortlich sind, nachweisbar (Kreisköther et al., 2006). Es kolokalisiert dort mit seinen

putativen Interaktionspartnern α-Aktinin und Zormin, einer Sls-Isoform. In den terminalen Z-Scheiben kann zusätzlich auch eine Kolokalisation mit Duf/Kirre beobachtet werden (Kreisköther et al., 2006), weshalb vermutet wird, dass Rols7/Ants zusammen mit Duf/Kirre für den ersten Kontakt des Muskels mit den Apodemen verantwortlich ist.

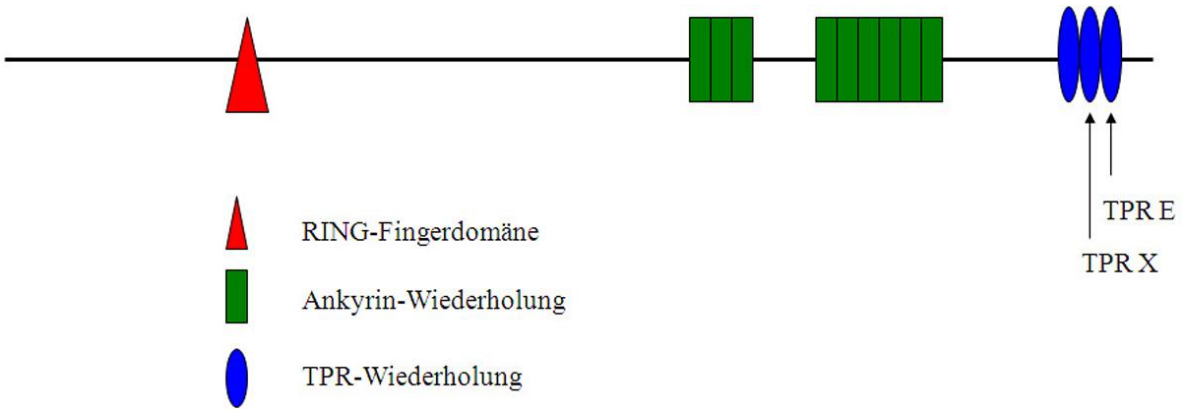

Abb. 2.3: Schematische, nicht maßstabsgetreue Darstellung des Proteins Rolling pebbles7/Ants
Das Protein besitzt 1900 Aminosäuren und in Richtung des N-terminalen Endes eine RING-Fingerdomäne. Am C-Terminus befinden sich drei TPR-Wiederholungen, wobei die Lage von TPR E und TPR X markiert wurde, sowie etwas weiter 5´ gelegen neun Ankyrin-Wiederholungen. Alle diese vorhergesagten Domänen sind bekannt dafür, den Kontakt zwischen Proteinen zu vermitteln.

2.3.3 In beiden Zelltypen sind mehrere zytoplasmatische Proteine an der Weiterleitung des Fusionssignals von der Membran zum Aktinzytoskelett beteiligt

Zusätzlich zu Rols7/Ants sind noch weitere Moleküle an der Signalübertragung innerhalb der Myoblasten und wachsenden Muskeln beteiligt. Der aus der Neurogenese bekannte Arf-GEF (Guanine nucleotide exchange factor, Guanin-Nukleotidaustauschfaktor) Schizo (Hummel et al., 1999, Önel et al., 2004) ist in der Myogenese als Loner bekannt (Chen et al., 2003). Das Molekül ist in FCs/wachsenden Muskeln exprimiert, wo es, zumindest in Zellkultur-Experimenten, von Duf/Kirre bzw. Rst/IrreC zur Membran rekrutiert wird. Die Deletion des *schizo/loner*-Gens führt zum kompletten Verlust der Myoblastenfusion (Chen et al., 2003), wobei neuere Studien die Verteilung des *schizo/loner*-Transkripts auch in FCMs belegen (siehe Abb. 2.4, Richardson et al., 2007). Genverlustmutanten des putativen Interaktionspartners *arf6* (Chen et al., 2003) entwickeln ein wildtypisches Muskelmuster (Dyer et al., 2007), was für die Beteiligung einer weiteren Arf-GTPase spricht, die Schizo/Loner aktivieren kann. Schizo/Loner und Arf6 sind für die Rekrutierung der GTPasen DRac1 und DRac2 an die Membran und wahrscheinlich für deren Aktivierung zuständig (Chen et al., 2003). Da diese beiden redundant zueinander wirken, ist die somatische Muskulatur auch nur in *drac1, drac2*-doppelmutanten Embryonen stark gestört (Hakeda-Suzuki et al., 2002, Luo et al., 1994). Daten aus anderen Organismen legen die Vermutung nahe, dass Mbc ein weiterer GEF der

Rac-Proteine ist (Côté and Vuori, 2002). Neben der Aktivierung von DRac1 und DRac2 interagiert das Protein über seine SH3-Domäne mit ELMO/CED-12 (Geisbrecht et al., 2008) und über prolinreiche Domänen mit dem Adapterprotein DCrk (Galletta et al., 1999). Des Weiteren wird eine Interaktion der SH3-Domäne von Mbc mit dem zytoplasmatischen Teil von Sns postuliert (Balagopalan et al., 2006). *mbc*-Genverlustmutanten zeigen ebenfalls keine Myoblastenfusionen (Erickson et al., 1997, Rushton et al., 1995).

In *C. elegans* und Säugern ist das SH2-SH3-Protein Crk essentiell für die Aktivierung von Rac und die Rekrutierung von Dock180 an die Membran, wobei Dock180 ein Mbc-Homolog darstellt. Eine analoge Funktion in *D. melanogaster* konnte bisher noch nicht gezeigt werden (Übersichtsartikel: Abmayr et al., 2008). Aufgrund molekulargenetischer Probleme ist keine mutante Fliegenlinie für *DCrk* erhältlich, allerdings führt die Überexpression einer membrangebundenen Form des Proteins zu Störungen der Myoblastenfusion (Abmayr and Kocherlakota, 2006). *in vitro*-Daten zeigen eine Interaktion von DCrk mit Sns (Kim et al., 2007) und mit Vrp-1/Sltr/Wip, das an der Aktinpolymerisierung beteiligt ist (siehe 2.3.4).

Das PH-Domänenprotein Blow (Blown fuse) ist ausschließlich in den FCMs nachweisbar und wird nach erfolgtem Zell-Zell-Kontakt zu der Fusionsstelle rekrutiert (Kesper et al., 2007, Schröter et al., 2006). Blow ist wahrscheinlich bereits für die erste Phase der Myoblastenfusion unabkömmlich (Beckett and Baylies, 2007, Doberstein et al., 1997) und interagiert genetisch mit Kette/Hem (Schröter et al., 2004). Kette/Hem wiederum reguliert über Scar/Wave den Arp2/3-Komplex und die F-Aktin-Organisation (siehe 2.3.4).

Für das Protein Singles Bar wird postuliert, dass es mehrfach in Membranen integriert. Es ist in FCs und FCMs nachweisbar und übt dort eine essentielle Funktion für die Myoblastenfusion aus (Estrada et al., 2007). Zurzeit wird eine Beteiligung des Proteins an der Auflösung des Präfusionskomplexes diskutiert (siehe 2.2.3), eventuell indem Sing mittels der MARVEL-Domäne, die in anderen Systemen am Vesikeltransport beteiligt ist, die Fusion von elektronendichten Vesikeln mit der Plasmamembran fördert.

2.3.4 Durch komplexe Umstrukturierungen des Aktinzytoskeletts kommt es zur Öffnung der Fusionspore und der Integrierung der Myoblaste in den wachsenden Muskel

An der Kontaktstelle von FC/wachsendem Muskel und FCM wird in Vorbereitung auf die Fusion eine Struktur etabliert, die aufgrund ihrer strukturellen und funktionalen Charakteristika als FuRMAS (Fusion-Restricted Myogenic-Adhesive Structure) bezeichnet wird (siehe 2.4, Kesper et al., 2007). Im Zentrum eines solchen FuRMAS befindet sich der sogenannte F-Aktin-Fokus, der von einem Ring aus Adhäsionsmolekülen umschlossen wird (Kesper et al., 2007, Richardson et al., 2007). Mehrere aktuelle Studien belegen, wie wichtig

die dynamische Aktin-Regulation für die embryonale Myoblastenfusion ist (siehe Abb. 2.4, Übersichtsartikel: Önel, 2009, Önel et al., 2010, Rochlin et al., 2010).

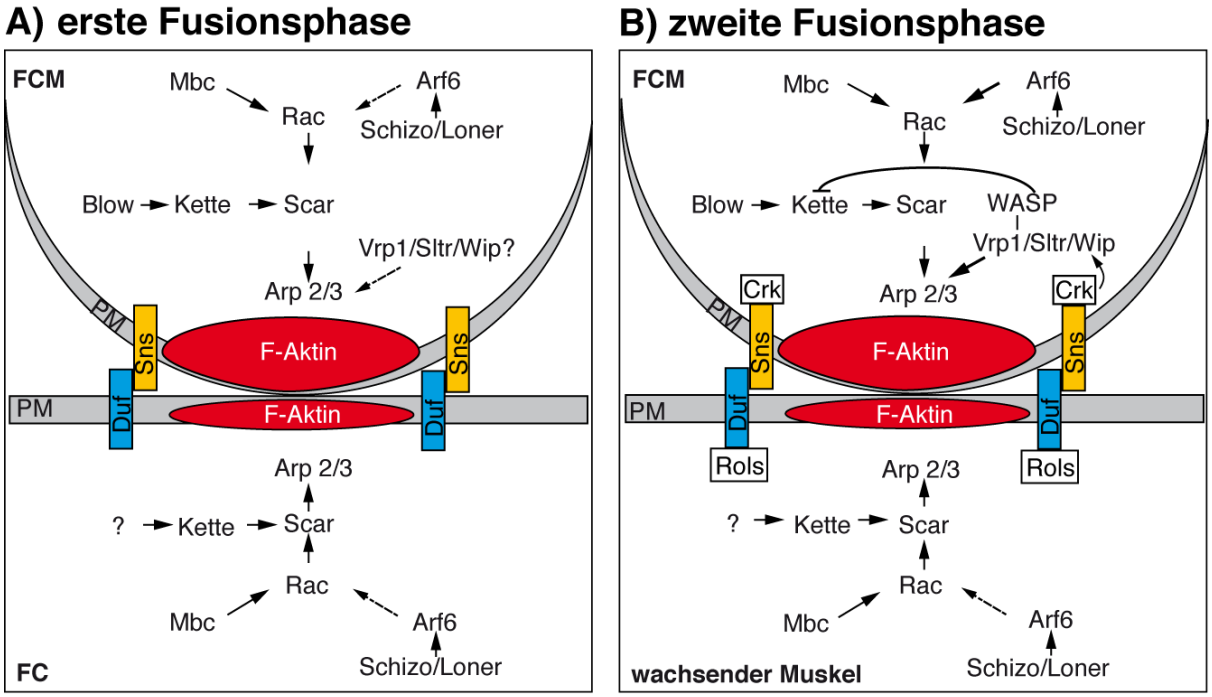

Abb. 2.4: Aktueller Überblick über die am Fusionsprozess beteiligten Proteine und deren mögliche Funktion
Die Zell-Zell-Erkennung und die Etablierung des Zell-Zell-Kontakts wird in beiden Fusionsphasen durch die Transmembranproteine Duf/Kirre und Sns gewährleistet. An der Signalweiterleitung sind die Proteine Rols7/Ants, DCrk, Blow sowie Schizo/Loner beteiligt. Die Reorganisation des Aktinzytoskeletts geschieht unter anderem mittels Mbc, Rac, Scar/Wave, Kette, WASP, Vrp1/Sltr/Wip und dem Arp2/3-Komplex. Wie diese Moleküle interagieren und ob sie eine Funktion in der ersten (**A**) und/oder zweiten Fusionsphase (**B**) übernehmen, ist im Text detailliert beschrieben (PM: Plasmamembran, verändert nach Önel et al., 2010).

Die *de novo*-Assemblierung von Aktinfilamenten sowie deren Verzweigung innerhalb des FuRMAS geschieht unter Beteiligung des Arp2/3-Komplexes (Berger et al., 2008), der von sogenannten Nucleation Promoting Faktoren aus der Familie der WASP- und Scar/Wave-Proteine aktiviert wird (Gildor et al., 2009, Massarwa et al., 2007, Millard et al., 2004, Richardson et al., 2007, Schäfer et al., 2007). Dabei werden der Arp2/3-Komplex und Scar/Wave in beiden Zelltypen und Fusionsphasen benötigt, wohingegen WASP nur während der zweiten Fusionsphase in den FCMs agiert. Allerdings zeigen mutante Embryonen für *scar/wave* oder *wasp* aufgrund ihrer starken maternalen Komponente nur sehr geringe Störungen des somatischen Muskelmusters (Massarwa et al., 2007, Richardson et al., 2007).
WASP interagiert während der zweiten Fusionsphase in den FCMs mit Vrp1/Sltr/Wip, die Deletion dieses Gens führt ebenfalls zu Störungen der Myoblastenfusion. In der ersten Fusionsphase allerdings aktiviert Vrp1/Sltr/Wip das Protein Scar/Wave unabhängig von WASP (Berger et al., 2008, Kim et al., 2007, Massarwa et al., 2007, Schäfer et al., 2007). Analog zu

Daten aus Studien an Wirbeltier-Zellen in Kultur scheint auch während der Myogenese von *D. melanogaster* ein Komplex zu existieren, der Scar/Wave in einem inaktiven Zustand hält (Takenawa and Suetsugu, 2007). Für Kette/Hem, dessen Wirbeltierhomolog Hem-2/Nap1 ein Mitglied dieses Komplexes ist, konnte eine Beteiligung an der Myoblastenfusion bereits gezeigt werden (Richardson et al., 2007, Schröter et al., 2004). Aktuelle Untersuchungen weisen auf eine Beteiligung von Rac an der Aktivierung von Scar/Wave hin (siehe 2.3.3, Gildor et al., 2009).

2.4 An der Fusionsstelle wird eine Struktur (FuRMAS) etabliert, die den Bereich der Membranauflösung räumlich begrenzt

Bei der Fusion zweier einkerniger Myoblasten entspricht die Größe der Kontaktzone dieser beiden Zellen etwa deren Durchmesser. Bei den folgenden Fusionen allerdings ist die Myoblaste klein im Vergleich zum wachsenden Muskel. Zudem fusionieren häufig mehrere FCMs gleichzeitig mit einer PC, wodurch eine räumliche Beschränkung der Fusionsstelle und damit des Bereichs der Membranauflösung notwendig wird (vgl. Abb. 2.1 B mit C; Önel et al., 2010). Dies wird durch die Etablierung einer Struktur erreicht, in der eine lokale Akkumulation von F-Aktin und dessen Regulatoren von einem Ring aus Zelladhäsions-molekülen, z. B. Duf/Kirre, Rst/IrreC und Sns, sowie deren Interaktionspartnern, z. B. Rols7/Ants, umschlossen wird (Kesper et al., 2007). Dieser sogenannte FuRMAS (Fusion-Restricted Myogenic-Adhesive Structure) wird nach erfolgreicher Adhäsion von FC/wachsendem Muskel und FCM aufgebaut, hält den Zell-Zell-Kontakt aufrecht und fungiert gleichzeitig als ein Signalzentrum, das die Myoblastenfusion vorantreibt (Önel and Renkawitz-Pohl, 2009). Innerhalb dieses Rings aus Adhäsionsmolekülen wird der Präfusionskomplex aus Vesikeln, die vom Golgi-Apparat abgeschnürt werden, aufgebaut (siehe 2.2.3, Abb. 2.5 A, B, Kim et al., 2007). Es wird vermutet, dass diese elektronendichten Vesikel Fusogene beinhalten, die zur Fusion der Membranen benötigt werden (Doberstein et al., 1997) und mittels F-Aktin zur Zell-Zell-Kontaktstelle transportiert werden. Nachdem es im Innern des FuRMAS zur Öffnung der Fusionspore gekommen ist, führt die Beteiligung von F-Aktin aller Voraussicht nach zur Vergrößerung der Fusionspore (siehe Abb. 2.5 C) und der Integrierung der Myoblaste in den wachsenden Muskel (Berger et al., 2008).

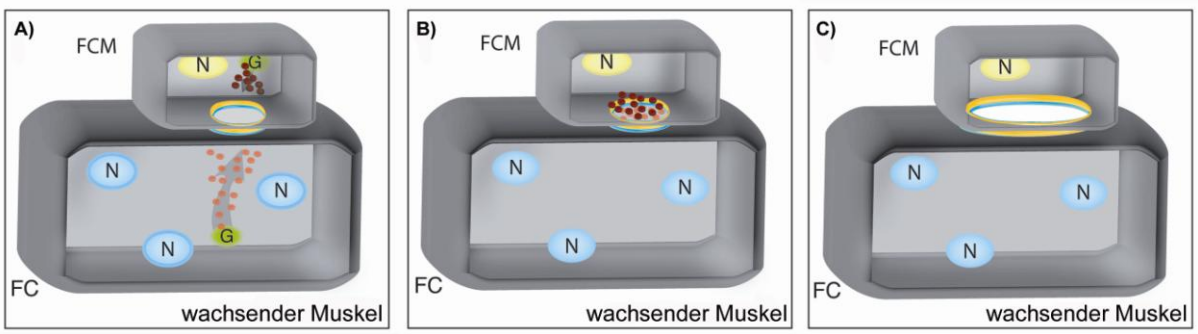

Abb. 2.5: Dreidimensionales FuRMAS-Modell der Myoblastenfusion
A: Nach Etablierung des Zell-Zell-Kontakts zwischen FCM und FC/wachsendem Muskel und der Ausbildung ringförmiger Strukturen durch die Adhäsionsproteine Duf/Kirre (blau) und Sns (gelb) werden elektronendichte Vesikel vom Golgi-Apparat zur Membran innerhalb der FuRMAS transportiert. **B**: Diese Vesikel bilden den Präfusionskomplex aus. **C**: Es kommt zur Öffnung der Fusionspore und deren Weitung, bevor die Myoblaste in den Muskel integriert werden kann (verändert nach Önel et al., 2010).

2.5 Die Beteiligung des unkonventionellen Myosins Mhcl an der Myogenese erscheint plausibel

Wie bereits beschrieben, ist das Aktinzytoskelett mehrmals während der Myogenese detektierbar, weshalb ihm diverse Funktionen zugesprochen werden (siehe 2.4, Önel and Renkawitz-Pohl, 2009). So wird vermutet, dass der Transport der elektronendichten Vesikel zum Fusionsort (Kim et al., 2007) sowie die Aufweitung des Rings aus Adhäsionsmolekülen und der Fusionspore (Massarwa et al., 2007, Kesper et al., 2007) mittels Aktinfilamenten sichergestellt wird. Der Aktinregulator Arp2/3-Komplex scheint ebenfalls wichtig für die Weitung der Fusionspore zu sein, eine Beteiligung dieses Komplexes an der Integration der Myoblaste in den wachsenden Muskel konnte bereits nachgewiesen werden (Berger et al., 2008). Wahrscheinlich verläuft die Anheftung der Muskelenden an die epidermalen Apodeme gleichermaßen unter Beteiligung des Aktinzytoskeletts (Guerin and Kramer, 2009a).

Für alle diese aktinbasierten Prozesse müssen ein oder mehrere Motorproteine gefordert werden, die den Transport entlang der Filamente, aber auch die Bewegungen der Filamente gegeneinander bewerkstelligen. Bereits 1954 wurde gezeigt, dass Muskelkontraktionen nach der sogenannten Gleitfilamenttheorie ablaufen (Huxley and Hanson, 1954, Huxley and Niedergerke, 1954). Hier verschieben lange, bipolare Filamente, die aus dem sogenannten konventionellen Myosin aufgebaut sind, unter Verbrauch von ATP parallel ausgerichtete Aktinfilamente gegeneinander (siehe 2.2.4). Mittlerweile ist bekannt, dass unkonventionelle Myosine, die ebenfalls unter Energieverbrauch an Aktin binden, aber nicht für die Kontraktion im Muskel verantwortlich sind, auch an anderen Aufgaben wie Organellentransport, Organisation von Aktinfilamenten, Zytokinese, Regulation der

mitotischen Spindel, Transkription, Endozytose und Zellmigration beteiligt sind (aktuelle Übersichtsartikel: Kee et al., 2009, Woolner and Bement, 2009, Wu et al., 2000).

Die schweren Ketten der Myosine (Myosin heavy chains), vereinfachend hier nur als Myosine bezeichnet, bestehen aus einer N-terminalen Kopf- oder Motordomäne (head), einer regulatorischen Gelenkdomäne (neck) und einem spezifischen C-terminalen Schwanz, der oft aus sogenannten coiled-coil-Motiven aufgebaut ist, die für die Dimerisierung der Myosine verantwortlich sind (Berg et al., 2001, Tzolovsky et al., 2002). Die Motordomäne bindet sowohl ATP als auch Aktin und ist für die Umsetzung der Energie in Bewegung verantwortlich. Die Gelenkdomäne enthält ein bis mehrere IQ-Motive, die die Bindung von Calmodulin, verwandten EF-Hand-Domänen-Proteinen oder der leichten Myosinketten bewerkstelligen. Myosine werden aufgrund der Konservierung ihrer Motordomäne aktuell in mehr als 30 Klassen eingeteilt, wobei Mhc, das konventionelle Muskelmyosin, der prominenteste Vertreter der Klasse II ist (Woolner and Bement, 2009). Für *D. melanogaster* werden anhand Sequenzdaten dreizehn unterschiedliche Myosine vorhergesagt, die neun unterschiedliche Klassen repräsentieren (siehe Abb. 2.6, Tzolovsky et al., 2002).

In einem Hefe-zwei-Hybrid-Screen, bei dem mit den Ankyrin-Wiederholungen des Rols7-Proteins (siehe 2.3.2 und Abb. 2.3) eine embryonale cDNA-Bank durchgemustert wurde, konnte das Protein Mhcl (Myosin heavy chain like) als möglicher Interaktionspartner identifiziert werden (Kreisköther, Dissertation 2005, Kreisköther et al., 2006). Es wurde bereits beschrieben, dass die mRNA dieses Gens ab Stadium 10 im somatischen Mesoderm und dessen Vorläufern nachweisbar ist (Bonn, Diplomarbeit 2006). Im viszeralen Mesoderm beginnt die Expression in Stadium 11, wo sie zunächst auf das CVM am posterioren Pol des Embryos sowie auf eine Zellreihe des Rumpfmesoderms beschränkt scheint. Sowohl im somatischen als auch im viszeralen Mesoderm ist die Expression bis Stadium 14 zu verfolgen, anschließend beschränkt sich die Verteilung des Transkripts auf segmentale Streifen in der Epidermis. Sehr präliminäre Untersuchungen von *Mhcl*-mutanten Embryonen zeigten keine Auffälligkeiten in der Körperwand- oder Darmmuskulatur (Bonn, Diplomarbeit 2006). Verschiedene Datenbanken prognostizieren zurzeit sechs Isoformen des Proteins, die durch alternatives Spleißen und die Verwendung unterschiedlicher Promotoren gebildet werden, davon enthalten nur vier die Motordomäne und drei die für diese Klasse der Myosine charakteristische PDZ-Domäne (Flybase, Smart, Tzolovsky et al., 2002). Das Protein weist eine Sequenzidentität von etwa 40 % zu den entsprechenden Proteinen aus Maus und Mensch auf (Blast, Berg et al., 2001, Tzolovsky et al., 2002) und besitzt je nach Analyseprogramm eine oder zwei IQ-Domänen sowie eine coiled-coil-Region im C-terminalen Bereich

(InterProScan). Seinen Namen bekam das Protein aufgrund der Sequenzidentität von etwa 26 % zum konventionellen Myosin, die auf dem gleichen evolutiven Ursprung dieser beiden Klassen beruht (Foth et al., 2006, Tzolovsky et al., 2002).

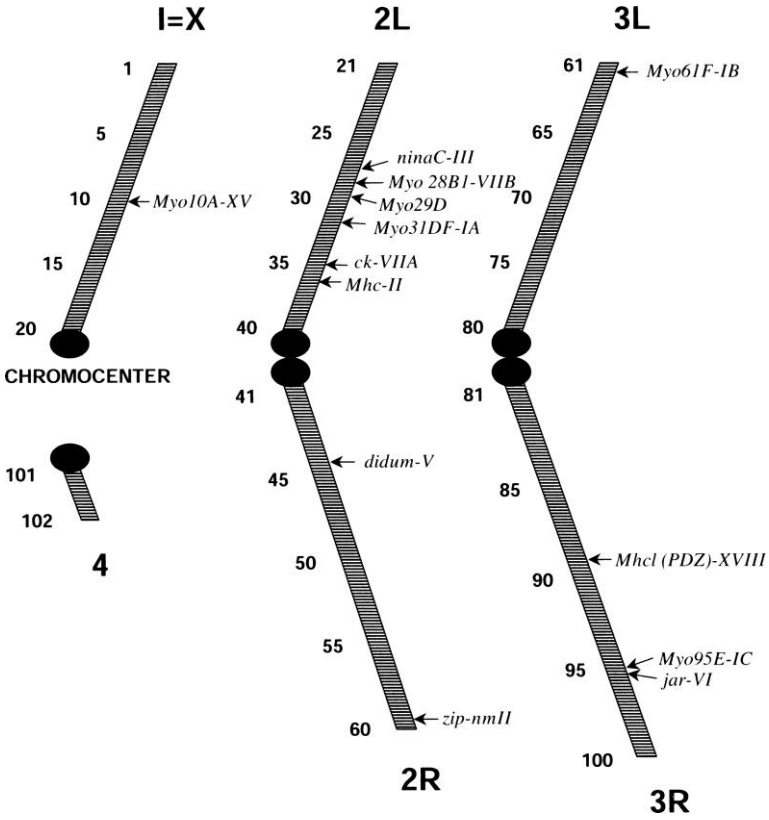

Abb. 2.6: Übersicht über die vermutlich im *D. melanogaster*-Genom kodierten schweren Ketten der Myosine
Basierend auf Sequenzanalysen werden für *D. melanogaster* dreizehn unterschiedliche Myosine mit Lokalisation auf den Chromosomen X, 2 und 3 postuliert. Die römische Zahl, die auf den Gennamen folgt, bezeichnet die Klasse der Myosine, in die das entsprechende Protein eingeordnet wird, für das in dieser Arbeit näher analysierte Mhcl ist dies die Klasse XVIII (aus: Tzolovsky et al., 2002).

PDZ-Domänen sind sehr weit verbreitete Protein-Protein-Interaktionsdomänen, die ihren Namen drei Proteinen verdanken, in welchen sie zuerst beschrieben wurden: Postsynaptic density protein-95, Discs large und Zonula occludence-1 (Übersichtsartikel: Jelén et al., 2003, Sheng and Sala, 2001, Sierralta and Mendoza, 2004). Diese etwa 80-100 Aminosäuren großen Module interagieren mit kurzen, meist C-terminal lokalisierten PDZ-bindenden Motiven anderer Moleküle, wie beispielsweise membranständige Rezeptoren, Phosphoinositole, Ionenkanäle oder Zelladhäsionsmoleküle. Proteine, die PDZ-Domänen enthalten, spielen eine wichtige Rolle in unterschiedlichen zellulären Prozessen, z. B. Proteintransport, Signalweiterleitung, Etablierung von Zellpolarität oder Aufbau von Proteinkomplexen. Häufig enthält ein Protein mehrere PDZ-Domänen, die mit unterschiedlichen Liganden interagieren, aber auch von anderen Interaktionsdomänen flankiert werden können. Im *D. melanogaster*-Genom sind mehr als 100 Proteine mit einer oder mehreren solcher Domänen bekannt oder vorhergesagt.

2.6 C2-Domänen-Proteine regulieren Zell-Zell- und Zell-Vesikel-Fusionen

Die Fusion zweier Membranen spielt eine wichtige Rolle in diversen inter- und intrazellulären Prozessen wie der Zell-Zell-Fusion, z. B. bei der Myogenese, der Endo- und Exozytose, beim Eindringen des Pathogens in die Wirtszelle oder bei dem Verschmelzen von Ei und Spermium (aktuelle Übersichtsartikel: Chernomordik and Kozlov, 2008, Martens and McMahon, 2008, Wickner and Schekman, 2008). Intensive Forschung ermöglichte ein grundlegendes Verständnis dieser Abläufe. Es wird angenommen, dass in der sogenannten Hemifusion zunächst nur die äußeren Schichten der Membranen fusionieren (siehe Abb. 2.7), bevor es zur Vereinigung der gesamten Lipiddoppelschicht kommt. Damit dieses geschehen kann, müssen sich die Membranen entgegen der durch ihre Hydrophobizität hervorgerufene Energiebarriere zuerst stark annähern. Dafür werden die membranständigen Proteine aus dem zu fusionierenden Bereich entfernt, außerdem kommt es häufig zu einer Krümmung der Membran, was die Fusion ebenfalls fördert (Martens and McMahon, 2008).

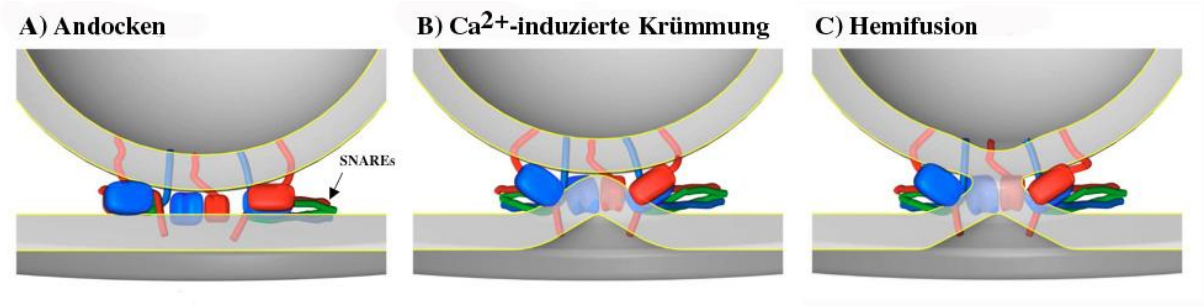

Abb. 2.7: Bei der Neurotransmitter-Ausschüttung entsteht der Zwischenschritt der Hemifusion
A: An der Kontaktstelle zwischen Vesikel- und Synapsenmembran wird ein Komplex aus Synaptotagminen, die C2-Domänen enthalten, und SNAREs etabliert. **B:** Der Einstrom von Ca^{2+}-Ionen führt zur Konformationsänderung dieses Komplexes und zur Krümmung der Membran. **C:** Anschließend kommt es zur sogenannten Hemifusion, wobei sich nur die äußeren Lipidschichten miteinander verbinden (verändert nach Martens et al., 2007).

Ein gut untersuchtes Beispiel dieser energetisch ungünstigen Prozesse ist die Fusion synaptischer Vesikel bei der Ausschüttung von Neurotransmittern, das hier exemplarisch vorgestellt werden soll. Für diesen Vorgang ist das Protein Synaptotagmin, das zwei sogenannte C2-Domänen besitzt, essentiell. Diese C2-Domänen weisen strukturelle Ähnlichkeit zu Ig-Domänen auf, wie sie in den myogeneserelevanten Adhäsionsmolekülen vorkommen (Grobler and Hurley, 1997) und inserieren als Reaktion auf den Einstrom von Ca^{2+}-Ionen in die Vesikel-Membran. Ebenfalls in Abhängigkeit von Ca^{2+} interagieren diese Domänen mit Mitgliedern der Familie der SNARE-Proteine (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor), wobei der genaue Ablauf dieser Interaktion noch nicht geklärt wurde. Fest

steht allerdings, dass das Zusammenspiel dieser Moleküle zu deren Konformationsänderung führt, die in einer Verkürzung des Membranabstands, wahrscheinlich durch Einführung einer Krümmung und der folgenden Hemifusion, resultiert (siehe Abb. 2.7, Martens et al., 2007).

2.7 Fragestellung

Das Aktinzytoskelett wird während der Myoblastenfusion von *D. melanogaster* mehrmals benötigt, z. B. bei der Etablierung des FuRMAS, bei der Aufweitung der Fusionspore oder bei der Integration der Myoblaste in den wachsenden Muskel. Da für fast alle aktinbasierten Prozesse die Beteiligung von Myosinen als Motorprotein beschrieben wurde, ist davon auszugehen, dass diese auch bei der Myogenese eine Rolle spielen. Ein möglicher Kandidat ist Mhcl, das in einem globalen Hefe-zwei-Hybrid-Screen als putativer Interaktionspartner von Rols7 gefunden wurde (Kreisköther, Dissertation 2005, Kreisköther et al., 2006). Es konnte bereits gezeigt werden, dass *Mhcl* während der myogeneserelevanten Stadien im somatischen und viszeralen Mesoderm exprimiert wird (Bonn, Diplomarbeit 2006). Das Protein Rols7 übernimmt eine essentielle Funktion in der zweiten Phase der Myoblastenfusion und später bei der Anheftung der Muskeln an die Epidermis. Aufgrund dessen sollte in der vorliegenden Arbeit das Protein Mhcl und seine mögliche Beteiligung an der Myogenese aufgeklärt werden. Dazu sollten einerseits Analysen von zu erstellenden Mutanten hinsichtlich des somatischen und viszeralen Muskelmusters durchgeführt und andererseits ein Antikörper gegen das Protein generiert werden, um die subzelluläre Verteilung des Proteins in wildtypischen Embryonen und solchen, die Mutationen in fusionsrelevanten Genen tragen, zu untersuchen.
In einem zweiten Projekt wurde ein Protein untersucht, das eine C2-Domäne enthält. Die Beteiligung von Molekülen mit solchen Domänen an anderen Fusionen wurde bereits beschrieben, beispielsweise reguliert das C2-Domänen-Protein Synaptotagmin die Fusion zwischen Vesikel- und Synapsenmembran bei der Neurotransmitter-Ausschüttung (Martens et al., 2007, Martens and McMahon, 2008). Während der Myogenese von *D. melanogaster* kommt es entsprechend den aktuellen Modellen zunächst zur Fusion zwischen elektronendichten Vesikeln und der Zellmembran, bevor die Membranen der unterschiedlichen Zelltypen miteinander fusionieren. Daher ist es denkbar, dass diese Fusionen ebenfalls von C2-Domänen-Proteinen beeinflusst werden. Auch im Falle des hier analysierten *CG10737* sollten Experimente an Embryonen durchgeführt werden, die das Gen nicht mehr exprimieren, um einen Hinweis auf eine mögliche Funktion des Genprodukts in der Myogenese zu bekommen. Es sollte weiterhin ein Antikörper gegen das Protein generiert werden, um dessen subzelluläre Verteilung untersuchen zu können.

3. Material

3.1 Geräte

Binokulare	Stemi SV11 und Stemi DV4, Zeiss, Göttingen
DNA-Gelelektrophoreseapparaturen	Elektronik-Werkstatt, Philipps-Universität Marburg
Entwicklermaschine	Curix 60, Agfa, Köln
Fotomikroskope	Axiphot, Zeiss, Jena Axioskop, Zeiss, Jena ApoTome, Zeiss, Jena
Geldokumentation	UV Solo, Biometra, Göttingen
Heizblöcke	HBT 130 Dri-Block DB2a, Haep Labor Consult, Bovenden und Techne, Wertheim
Magnetrührer	Variomag Mono, H+P Labortechnik, München IKA Combimag RCT Janke + Kunkel, Staufen
Mikroskop (invers)	CKX41, Olympus, Hamburg
PCR-Maschine	Personal Cycler, Biometra, Göttingen
Photometer	Gene Quant 1300, GE Healthcare, München
Rocky 3D	Fröbel Labortechnik, Lindau
Röhrenzentrifuge	Megafuge 1.0R, Haereus, Hanau
Schüttler	IKA Vibrax VXR basic und MS1 Minishaker, Staufen
SDS-Gelelektrophorese-Apparatur	Modell 45-1010, Peqlab, Erlangen
Spannungsgeber für DNA-Gele	Power Pac 300, Biorad, München
Spannungsgeber für Blotapparatur	EV231, Peqlab, Erlangen
Sterilbank	Hera safe, Haereus, Hanau
Thermostatschrank (SL2-Zellen)	Lovibond, Liebherr
Tischzentrifugen	Biofuge pico bzw. fresco, Haereus, Hanau
Ultraschallgerät	Bandelin Sonoplus GM70, Berlin
Vortexierer	Reax 2000, Heidolph, Schwabach
Wasserbäder	Haake C1 und C10, PSL Systemtechnik GmbH, Clausthal-Zellerfeld; GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel

3.2 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit benutzten Chemikalien und Nährmedien wurden von den Firmen Invitrogen/Gibco (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich/Fluka (Taufkirchen) bezogen.

3.3 Enzyme

AccuPrime™ *Taq* DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, St. Leon-Rot; NEB, Frankfurt/Main; Roche, Mannheim und Boehringer-Ingelheim, Ingelheim
RNA-Polymerasen: Sp6, T3, T7	Roche, Mannheim
Streptavidin-HRP	Perkin Elmer, Jügesheim
Taq-Polymerase	Axon, Kaiserslautern
T4-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot

3.4 Molekularbiologische Reagenzien und Reagenziensätze

EZview™ Red Anti-HA/-Myc Affinity Gel	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bradfordreagenz (Protein Assay)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Calmodulin Affinity Resin	Stratagene, Waldbronn
DIG-RNA-Labeling Kit	Roche, Mannheim
ECL™ Western Blotting Analysis System	GE Healthcare, München
Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix	Invitrogen, Karlsruhe
GFX™ PCR, DNA and Gel Band, Purification Kit	GE Healthcare, München
Jetsorb	Genomed, Löhne
Jetstar 2.0	Genomed, Löhne
Microsep™ Microconcentrator 3 kDa	Pall GmbH, Dreieich
NHS-aktivierte Sepharose, 4 Fast Flow	GE Healthcare, München
Ni-NTA His-Bind® Resin	Novagen, Darmstadt
Oligotex mRNA Mini Kit	QIAGEN, Hilden
OneStep RT-PCR Kit	QIAGEN, Hilden
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
Protease Inhibitor Tabletten complete mini	Roche, Mannheim
Protein A-Sepharose™	GE Healthcare, München
Rabbit IgG Agarose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Recombinant Enterokinase Cleavage Capture Kit	Novagen, Darmstadt
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Zero blunt® TOPO® PCR Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Transfectin™ Lipid Reagent	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Trizol® Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
TSA™ Fluorescein System	Perkin Elmer, Jügesheim
TSA™ Biotin System	Perkin Elmer, Jügesheim
Vectastain ABC-Kit	Vector Laboratories, Eching

3.5 Sonstige Materialien

chemilumineszenter Film	Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare, München
Chromatorgraphie-Säulen (Poly-Prep)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Roth, Karlsruhe
Dialyseschlauch	Spectra/Por® Membrane, MWCO:6 000-8 000, Spectrum Laboratories Inc, Breda, The Netherlands
Entwickler-/Fixier-Lösung	G153 A und B/G354, Agfa, Köln
Fluoromount-G™	Southern Biotech, Birmingham
MassRuler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use	Fermentas, St. Leon-Rot
Nitrozellulosemembran	Optitran BA-S 83 Whatman GmbH, Dassel
PageRuler™ Prestained Protein Ladder und PageRuler™ Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot

3.6 Nähr-und Zuchtmedien

fötales Kälberserum	PAA, Cölbe
Schneider´s *Drosophila* Medium	Gibco®, Karlsruhe

3.7 Antikörper und Seren

Die verwendeten Antikörper wurden in immunhistochemischen Nachweisen in der angegebenen Verdünnung eingesetzt, für Fluoreszenzfärbungen wurde in der Regel die doppelte Konzentration verwendet. Der Vermerk (faf) oder (hf) zeigt an, ob sich die Antikörper zur Verwendung an paraformaldehydfixierten oder hitzefixierten Embryonen eignen.

anti-β3-Tubulin (Leiss et al., 1988)
(faf/hf, polyklonal aus Kaninchen, 1 : 5 000)

anti-β3-Tubulin D. Buttgereit, Marburg, unveröffentlicht
(faf/hf, polyklonal aus Meerschweinchen, 1 : 10 000)

anti-β-Galaktosidase Biotrend, Köln
(faf, polyklonal aus Kaninchen, 1 : 5 000)

anti-β-Galaktosidase Cappel/MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
(faf, polyklonal aus Kaninchen, 1 : 3 000, benutzt nach *in situ*-Hybridisierungen)

anti-β-Galaktosidase Promega, Mannheim
(faf, monoklonal aus Maus, 1 : 5 000)

anti-BP102 Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa
(faf, monoklonal aus Maus, 1 : 50)

anti-CBP (calmodulin binding peptide) Upstate Millipore, Billerica, USA
(polyklonal aus Kaninchen, 1 : 2 000 in Western-Blot-Analyse)

anti-Digoxigenin-AP Fab fragments (faf, polyklonal aus Schaf, 1 : 2 000)	Roche, Mannheim
anti-Evenskipped (2B8) (faf, monoklonal aus Maus, 1 : 50)	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa
anti-FasciclinIII (faf, monoklonal aus Maus, 1 : 50, fluoreszent, nur präadsorbiertes Serum verwenden)	(Patel et al., 1987)
anti-Flag-HRP (monoklonal aus Maus, 1 : 4 000 in Western-Blot-Analyse)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
anti-HA (faf, monoklonal aus Maus, 1 : 4 000)	Covance, München
anti-HA-HRP (1 : 2 000 in Western-Blot-Analyse)	Roche, Mannheim
anti-penta-His (monoklonal aus Maus, 1 : 5 000 in Western-Blot-Analyse)	QIAGEN, Hilden
anti-Kettin (MAC155) (faf, polyklonal aus Ratte, 1 : 50)	Abcam plc, Cambridge (UK)
anti-cMyc (polyklonal aus Kaninchen, 1 : 2 000; 1 : 1 000 in Western-Blot-Analyse, gelöst in 5 % BSA)	Cell Signaling, NEB, Frankfurt/Main
anti-cMyc (faf, monoklonal aus Maus, 1 : 2 000)	Upstate Millipore, Billerica, USA
anti-Tinman (faf, polyklonal aus Kaninchen, 1 : 2 000)	A. Paululat, Osnabrück
anti-Kaninchen bzw. anti-Meerschweinchen IgG, biotinyliert (aus Ziege, 1 : 500)	Vector Laboratories, Lörrach
anti-Maus IgG, biotinyliert (aus Pferd, 1 : 500)	Vector Laboratories, Lörrach
anti-Kaninchen IgG, Cy2- Cy3- bzw. Cy5-gekoppelt (1 : 200)	Dianova, Hamburg
anti-Maus IgG, Cy2-, Cy3- bzw. Cy5-gekoppelt (1 : 200)	Dianova, Hamburg
anti-Meerschweinchen IgG, Cy2- bzw. Cy3-gekoppelt (1 : 200)	Dianova, Hamburg
anti-Kaninchen bzw. anti-Maus IgG, POD-gekoppelt (1 : 5 000)	Jackson ImmunoResearch Lab., Suffolk (UK)
Normal Goat Serum (Ziegenserum)	Vector Laboratories, Lörrach
Normal Horse Serum (Pferdeserum)	Vector Laboratories, Lörrach

3.8 Fliegenstämme (*Drosophila melanogaster*)

Durch den Index BL werden Fliegenlinien gekennzeichnet, die vom Bloomington Stockcenter in Indiana bezogen wurden, der Index v kennzeichnet Fliegenlinien aus dem RNAi-Stockcenter in Wien.

3.8.1 Balancerstämme

Df/FM7c-ftz-lacZ	Blau-Balancerstamm mit Markern für das X-Chromosom zur Verfügung gestellt von S. Önel, Marburg
w; If/CyO-hg-lacZ	Blau-Balancerstamm mit Markern für Chromosom II zur Verfügung gestellt von M. Affolter, Basel
w; Gla/CyO-ftz-lacZ	Blau-Balancerstamm mit Markern für Chromosom II
w; Dr/SbTDlZ	Blau-Balancerstamm mit Markern für Chromosom III, zur Verfügung gestellt von A. Holz, Gießen
w; Sp/CyO-wg-lacZ; TM2/TM6-ftz-lacZ	Blau-Balancerstamm mit Markern für Chromosom II und III zur Verfügung gestellt von S. Önel, Marburg
w; Sp/CyO-hg-lacZ; TM2/SbTDlZ	Blau-Balancerstamm mit Markern für Chromosom II und III zur Verfügung gestellt von S. Berger, Marburg
w; Sp/CyO; Sb/Ubx	Multimarkerstamm zur kreuzungsgenetischen Lokalisation inserierter P-Elemente; zur Verfügung gestellt von Ch. Klämbt, Münster
BL6662	w^{1118}*; In(2LR)Gla,* wg^{Gla-1}*/CyO, P{GAL4-twi.G}2.2, P{UAS-2xEGFP}AH2.2* (Fluoreszenz-Balancerstamm für Chromosom II)
BL6663	w^{1118}*;* Dr^{Mio}*/TM3, P{GAL4-twi.G}2.3, P{UAS-2xEGFP}AH2.3,* Sb^1 Ser^1 (Fluoreszenz-Balancerstamm für Chromosom III)
BL10768	y^1 *w*; TM2, P{lacW}l(3)E7-3-58*^{1}*/?* (Blau-Balancerstamm für Chromosom III)

3.8.2 Defizienzen

Namen in Klammern bezeichnen das deletierte Gen von Interesse

BL6018	*Df(1)w67k30,* lz^1 ras^1 v^1*/FM7c* (***duf/kirre***, ***rst/irreC***)
BL2991	*Df(3L)BK9,* ru^1 red^1 $cv\text{-}c^1$ Sb^{sbd-1} sr^1 e^1*/TM3,* Sb^1 (***rols***)
BL7983	w^{1118}*; Df(3R)Exel7328/TM6B,* Tb^1 (***Mhcl***)
BL26580	w^{1118}*; Df(3R)BSC728, P+PBac{XP3.RB5}BSC728/TM6C,* Sb^1 cu^1 (***Mhcl***)
BL9422	w^{1118}*; Df(4)ED6369, P{3'.RS5+3.3'}ED6369/l(4)102EFf*^{1} (***DCrk***)
BL7551	w^{1118}*; Df(2R)Exel6069, P{XP-U}Exel6069/CyO* (***CG10737***)
BL8918	w^{1118}*; Df(2R)ED3683, P{3'.RS5+3.3'}ED3683/SM6a* (***CG10737***)
BL24373	w^{1118}*; Df(2R)BSC349/CyO* (***CG10737***)
BL7787	w^{1118}*; Df(2L)Exel7016/CyO* (***sec5***)

3.8.3 Mutanten

fettgedruckt ist jeweils die Mutation des Gens von Interesse

BL730	*w^{ch2} **N^{264-39}**/FM4, B^{+}*
***$blow^{2}$**/CyO*	(Doberstein et al., 1997)
BL8753	*st^{1} e^{1} **$kette^{J4-48}$**/TM6B, P{ase-lacZF:2.0}PK3, Tb^{1}*
***lmd^{E202}**/SbTDlZ*	(Hummel et al., 1999)
***sns^{20-23}**/CyO*	(Paululat et al., 1995)
***$DMef2^{22-21}$**/CyO*	(Bour et al., 1995)
BL7052	*st^{1} in^{1} kni^{ri-1} p^{p} **wts^{3-17}**/TM3, Sb^{1}*
BL8739	*P{FRT(w^{hs})}G13 **zip^{2}**/CyO, P{lacZ-un3}276*
BL8568	*wg^{Sp-1} Bl^{1} **ena^{210}**/CyO*

3.8.4 P-Element-Insertionen

fettgedruckt ist jeweils das inserierte P-Element von Interesse

BL15025	*y^{1} w^{67c23}; P{EPgy2}**EY00454***
w; Δ2-3 Ki/TM3, Sb	Transposaselinie zur unpräzisen Entfernung von P-Elementen, zur Verfügung gestellt von Ch. Klämbt, Münster
BL10178	*w^{1118}; P{lacW}**26-29-p^{s3635}**/TM6C, $Antp^{Hu}$ Sb^{1} Tb^{1}*
BL12039	*w^{1118}; P{lacW}**Cka^{s1883}**/CyO*
BL11451	*P{PZ}**Cka^{05836}** cn^{1}/CyO; ry^{506}*
BL12287	*w^{67c23} P{lacW}**flw^{G0172}**/FM7c*
BL13652	*y^{1}; ry^{506}; P{SUPor-P}**Crk^{KG00336}**/ci^{D}*
BL11627	*ry^{506} P{PZ}**Akt1^{04226}**/TM3, ry^{RK} Sb^{1} Ser^{1}*
BL19894	*y^{1} w^{67c23}; P{EPgy2}**Akt1^{EY10012}**/TM3, Sb^{1} Ser^{1}*
BL22577	*y^{1} w^{67c23}; P{EPgy2}**Myo95E^{EY22671}**/TM3, Sb^{1} Ser^{1}*
BL11114	*cn^{1} P{PZ}**ena^{02029}** CG15118^{02029}/CyO; ry^{506}*
BL10801	*y^{1} w^{67c23}; P{lacW}**cora^{k08713}**/CyO*
e03696	*PBac{RB}Mhcl^{e03696}* (Exelixis Collection, Harvard)
c05149	*PBac{PB}Mhcl^{c05149}* (Exelixis Collection, Harvard)

3.8.5 UAS- und GAL4-Linien

BL4918	*w*; P{GAL4-**wg**.M}MA1*
BL25756	*P{UAS-**Dcr-2**.D}1, w^{1118}; P{GAL4-**Mef2**.R}R1*
twist-GAL4	TGX bzw. SG24 (zur Verfügung gestellt von A. Michelson, Boston)
BL1767	*w*; P{GawB}**how^{24B}***
UAS-**EGFR^{dn}**/Cyo	zur ektopischen Expression einer dominant-negativen Version des EGF-Rezeptors, zur Verfügung gestellt von E. Schejter, Rehovot, Israel
sns-GAL4	*sns4,5*-GAL4 (Stute, Dissertation 2004)
rP298-GAL4	Expression im ***duf/kirre***-Muster (Menon and Chia, 2001)
BL27390	*y^{1} w*; P{GAL4-**Mef2**.R}3*
1151-GAL4	Expression in adulter Flugmuskulatur (zur Verfügung gestellt von L. S. Shashidhara, Hyderabad, Indien)
GMR-GAL4	Expression in Augenimaginalscheibe (Hay et al., 1994)

UAS-***DCrk^{Myr}***	myristylierte Version von DCrk (zur Verfügung gestellt von S. Abmayr, Kansas, USA)

3.8.6 Reporterstämme

rP298-lacZ	Expression im ***duf/kirre***-Muster (Nose et al., 1998)
btl-*lacZ*	(Klämbt et al., 1992)
sls-GFP ZCL2144	(Hudson et al., 2008)

3.8.7 Sonstige

v9130/CyO	RNAi-Linie gegen ***Scamp***
v8996	RNAi-Linie gegen ***CG10737***
v28873	RNAi-Linie gegen ***sec5***
v19061	RNAi-Linie gegen ***DCrk***
white	wildtypischer Stamm der AG Renkawitz-Pohl, Marburg
BL6326	w^{1118}
BL24484	y^1 *M{vas-int.Dm}ZH-2A* w^**; M{3xP3-RFP.attP'}ZH-58A,* Injektionsstamm für Gateway-Konstrukte
oregonR	wildtypischer Stamm der AG Renkawitz-Pohl, Marburg

3.9 Bakterienstämme (*Escherischia coli*)

DH5α	*supE44, ΔlacU169 (Φ80lacZΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1*
BL21	F^- *ompT* $hsdS_B(r_B^-m_B^-)$ *gal dcm* (nicht-induzierbare Zellen)
BL21(DE3)	F^- *ompT* $hsdS_B(r_B^-m_B^-)$ *gal dcm* (DE3) (Zellen, die nach IPTG-Induktion das rekombinante Protein, welches in den pET44a-Vektor kloniert wurde, exprimieren)

3.10 Plasmide

act-GAL4	zur ektopischen Expression von UAS-Konstrukten in SL2-Zellen (Yepiskoposyan et al., 2006)
pET44a	Plasmid zur ektopischen Expression von Proteinfragmenten in *E. coli*, Novagen, Darmstadt
pCHABΔSal	Transformationsvektor für Promotorstudien (Wimmer et al., 1997)
pUAST	Transformationsvektor für induzierbare Expression (Brand and Perrimon, 1993)
pUAST-HA	pUAST zur Erstellung von Fusionsproteinen mit C-terminalem HA-Anhang, zur Verfügung gestellt von S. Berger
pUAST-*Rols-TAP*	C. Stute, unveröffentlicht
pUASp-attB-rfa-10xMyc	zur Verfügung gestellt von S. Bogdan, Münster
pπ25.7wc	Helferplasmid für die P-Element-basierte Transformation (Karess and Rubin, 1984)

3.11 cDNAs

Alle verwendeten cDNAs wurden über das DGRC (*Drosophila* Genomics Resource Center, Indiana University) bezogen, angegeben sind jeweils Restriktionsenzyme und RNA-Polymerasen, die für die Erstellung der sense- (s) und antisense- (as) Sonden verwendet wurden

GH05039	***flw*** (s: PvuI/T7, as: PstI/Sp6)
GH15471	***Mhcl*** (s: BamHI/T7, as: EcoRV/Sp6)
GH22187	***CG10737*** (s: NcoI/T7, as: SspI/Sp6)
GH25580	***Myo95E*** (s: XhoI/T7, as: EcoRI/Sp6)
IP15304	***zipper*** (s: XhoI/T7, as: EcoRI/Sp6)
LD41760	***Cka*** (s: XhoI/T7, as: PvuI/Sp6)
LD47926	***lmd*** (as-Sonde zur Verfügung gestellt von D. Buttgereit, Marburg)
RE18380	***26-29-p*** (s: KpnI/T7, as: XhoI/T3)
RE40416	***Myo95E*** (s: BamHI/T7, as: EcoRI/T3)
RE 60886	***DCrk*** (s: BamHI/T7, as: EcoRI/T3)
RH02643	***CanB*** (s: BamHI/T7, as: XbaI/T3)
RH68403	***Scamp*** (s: BamHI/T7, as: EcoRI/T3)
SD03467	***sec5*** (s: RsaI/T7; as: BamHI/Sp6)
SD10734	***Akt1*** (s: ScaI/T7, as: MunI/Sp6)
SD19495	***wts*** (s: NheI/T7, as: SacI/Sp6)

3.12 synthetische Oligonukleotide und damit erstellte Konstrukte

Alle für diese Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg hergestellt und sind mit einer kurzen Beschreibung aufgelistet:

3.12.1 Primer

B3 aa 23 ATCATTTCCGAGGAGCACGGC
FW-Primer für die Amplifikation eines 372/490 bp großen Fragments des *β3-tubulin*-Gens (mRNA/genomische DNA)

B3 aa 140 GCCCAGCGAGTCCGTCAATTG
Rev-Primer für die Amplifikation eines 372/490 bp großen Fragments des *β3-tubulin*-Gens

Plac1 CACCCAAGGCTCTGCTCCCACAAT
Rev-Primer für die 5´-Flanke des P-Elements *pEPgy2*

Pry2 CTTGCCGACGGGACCACCTTATGTTATT
FW-Primer für die 3´-Flanke des P-Elements *pEPgy2*

EY.3F CCTTTCACTCGCACTTATTG
FW-Primer für die 3´-Flanke des P-Elements *pEPgy2*

pUASt-t prom-for TAACGTGACTGTGCGTTAGG
Sequenzierprimer für pUASp-attB-rfa-10xMyc

M13FW CCAGGGTTTTCCCAGTCACG
Standard-Sequenzierprimer

M13Rev CGGATAACAATTTCACACAGG
Standard-Sequenzierprimer

T7 TAATACGACTCACTATAGGG
Sequenzierprimer für den T7-RNA-Polymerase-Promotor

Sp6 CTATTTAGGTGACACTATAG
Sequenzierprimer für den Sp6-RNA-Polymerase-Promotor

oBB09 GCCGAGCGTCCAATGGCG
FW-Primer zur Erstellung einer RNA-Sonde gegen die Isoformen *Mhcl-RA, -RB* und *-RE*

oBB10 GCTGCACTGGCGGCAGCG
Rev-Primer zur Erstellung einer RNA-Sonde gegen die Isoformen *Mhcl-RA, -RB* und *-RE*

oBB11 GCTTAAGTACGAGCGGGTGG
FW-Primer zur Erstellung einer RNA-Sonde gegen alle Isoformen von *Mhcl*

oBB12 CGGCATCGCGATCAACAGG
Rev-Primer zur Erstellung einer RNA-Sonde gegen alle Isoformen von *Mhcl*

oBB13 GCAGCCATGAACGGCGGC
FW-Primer zur Erstellung einer RNA-Sonde gegen die Isoform *Mhcl-PD*

oBB14 GGCTGCCTTTGGCATCCG
Rev-Primer zur Erstellung einer RNA-Sonde gegen die Isoform *Mhcl-PD*

oBB15 GATCGGATCCGGCATCTCTGAGGACGAGG
FW-Primer für Fragment zur anti-Mhcl-Antikörper-Generierung inkl. BamHI-Schnittstelle

oBB16 GATCGTCGACGCGCAGCAGCAGAGTCCGC
Rev-Primer für Fragment zur anti-Mhcl-Antikörper-Generierung inkl. SalI-Schnittstelle

oBB23 GGTACCCGTTGCCACCTGTTTTAGCGATAGT
FW-Primer für *Mhcl*-Promotorkonstrukt inkl. KpnI-Schnittstelle

oBB24 GGATCCCGTTGGTGGGTTAATGCGAAGTTCA
Rev-Primer für *Mhcl*-Promotorkonstrukt inkl. BamHI-Schnittstelle

oBB25 GATCGCGGCCGCATGACGCACATCGAGAGCC
FW-Primer für *Mhcl-Myc/-Flag* inkl. NotI-Schnittstelle und ATG

oBB26 GATCACTAGTTCACAGGTCCTCCTCTGAGATCAGCTTCTGCTCGAAC ACCACGGTGCGGG
Rev-Primer für *Mhcl-Myc* und *Mhcl^{CC}-Myc* inkl. SpeI-Schnittstelle, Myc-Anhang und STOPP

oBB28 GATCGGTACCGCGGAATTGAGCGTGGTGTTCAGG
FW-Primer für *CG10737*-Promotorkonstrukt inkl. KpnI-Schnittstelle

oBB29 GATCGCGGCCGCGGTATCGATAGCCATGTTTAGGCAC
Rev-Primer für *CG10737*-Promotorkonstrukt inkl. NotI-Schnittstelle

oBB31 GATCGCGGCCGCATGGACTCCCTGGCCATCTTCA
FW-Primer für *CG10737-HA* inkl. NotI-Schnittstelle und ATG

oBB32 GATCACTAGTTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACAGCTT CCGTATGCTGCGATCT
Rev-Primer für *CG10737-HA* inkl. SpeI-Schnittstelle, HA-Anhang und STOPP

oBB37 GGTCTTGGACTATTAGGCTGC
Sequenzierprimer für *CG10737*-Promotorkonstrukt

oBB38 CGAATCCAAACCGCAGAATCC
Sequenzierprimer für *CG10737*-Promotorkonstrukte

oBB39 CCATCCGGTGATTGCCTCAG
Sequenzierprimer für *CG10737*

oBB40 GAGACGCTGTGGACGTGCG
Sequenzierprimer für *CG10737*

oBB41 GGCAGCTAGTGATCAGGCG
Sequenzierprimer für *Mhcl*

oBB42 GGTTGTCTCCATGTTCCGC
Sequenzierprimer für *Mhcl*

oBB43 CGAAATCGCCCACCTCGG
Sequenzierprimer für *Mhcl*

oBB44 CGTGTCCAGTATTCGCCGC
Sequenzierprimer für *Mhcl*

oBB55 GAGCGCTGGGGATGAGGACAAG
FW-Primer für die RT-PCR zur Verifizierung der *Mhcl*-mRNA, bindet in Exon1

oBB56 GCATGAGCACCGACGAGCTGCT
FW-Primer für die RT-PCR zur Verifizierung der *Mhcl*-mRNA, bindet in Exon1

oBB57 GGGAGCCTTTCAGAATGCCACG
Rev-Primer für die RT-PCR zur Verifizierung der *Mhcl*-mRNA, bindet in Exon2

oBB59 GCACCTAAGGACCCCACACACC
FW-Primer für die RT-PCR zur Verifizierung der *Mhcl*-mRNA, bindet in genomischer Region stromaufwärts von Exon1

oBB66 GATCACTAGTTCACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCGAACACCACG GTGCGGG
Rev-Primer für *Mhcl-Flag* inkl. SpeI-Schnittstelle, Flag-Anhang und STOPP

oBB67 GATCGAATTCATGGATACATTTGACGTTTCTG
FW-Primer für *DCrk-HA* inkl. ATG und EcoRI-Schnittstelle

oBB68 GATCGGTACCGCATATTTCTGTGGAGTTTTTG
Rev-Primer für *DCrk-HA* inkl. KpnI-Schnittstelle (ohne STOPP)

oBB70 CACCATGCCCCTGCTCAACGTTCATCG
FW-Primer für *Mhcl*^{CC} in pUASp-attB-rfa-10xMyc

oBB71 GAACACCACGGTGCGGG
Rev-Primer für *Mhcl*^{CC} in pUASp-attB-rfa-10xMyc

3.12.2 Konstrukte

pBB10 600bp von *Mhcl-RA*, *-RB* und *-RE* in TOPO TA
PCR mit oBB09 und oBB10 an GH15471 (sense Sonde: XhoI/Sp6, antisense: HindIII/T7)

pBB11 830bp aller *Mhcl*-Isoformen in TOPO TA
PCR mit oBB11 und oBB12 an GH15471 (s: XbaI/Sp6, as: BamHI/T7)

pBB12 620bp von *Mhcl-RD* in TOPO TA
PCR mit oBB13 und oBB14 an LP8646 (s: HindIII/T7, as: XhoI/Sp6)

pBB13 822bp von *Mhcl* zur Generierung eines Antikörpers in TOPO TA
PCR mit oBB15 und oBB16 an GH15471

pBB15 822bp von *Mhcl* zur Generierung eines Antikörpers in pET44a
Umklonierung aus pBB13 mittels BamHI und SalI

pBB20 *Mhcl*-Promotorkonstrukt in Zero blunt TOPO
PCR mit oBB23 und oBB24 an genomischer DNA

pBB21 *Mhcl*-Promotorkonstrukt in pCHABΔSal
Umklonierung aus pBB20 mittels KpnI und BamHI

pBB22 *Mhcl-Myc* in Zero blunt TOPO
PCR mit oBB25 und oBB26 an GH15471

pBB23 *Mhcl-Myc* in pUAST
Umklonierung aus pBB22 mittels NotI und XbaI/SpeI

pBB27 *Mhcl*^{CC}*-Myc* in TOPO TA
PCR mit oGD03 (Daum, Bachelorarbeit 2008) und oBB26 an GH15471

pBB28 *Mhcl*^{CC}*-Myc* in pUAST
Umklonierung aus pBB27 mittels EcoRI/MfeI und XbaI/SpeI

pBB29 *CG10737*-Promotorkonstrukt in Zero blunt TOPO
PCR mit oBB28 und oBB29 an genomischer DNA

pBB30 *CG10737*-Promotorkonstrukt in pCHABΔSal
Umklonierung aus pBB29 mittels KpnI und NotI

pBB33 *CG10737-HA* in Zero blunt TOPO
PCR mit oBB31 und oBB32 an GH22187

pBB34 *CG10737-HA* in pUAST
Umklonierung aus pBB33 mittels NotI und XbaI/SpeI

pBB47 *Mhcl-Flag* in Zero blunt TOPO
PCR mit oBB25 und oBB66 an GH15471

pBB48 *Mhcl-Flag* in pUAST
Umklonierung aus pBB47 mittels NotI und XbaI/SpeI

pBB49 *DCrk* (ohne STOPP) in TOPO TA
PCR mit oBB67 und oBB68 an RE60886

pBB50 *DCrk* in pUAST-HA
Umklonierung aus pBB49 mittels EcoRI und KpnI

pBB51 $Mhcl^{CC}$ in pENTR™/D-TOPO
PCR mit oBB70 und oBB71 an GH15471

pBB52 $Mhcl^{CC}$ in pUASp-attB-rfa-10xMyc
Umklonierung mittels Rekombinase-Reaktion

3.13 Zell-Linien

SL2-Zellen *Drosophila* Schneider-Zellen aus schlüpfbereiten Embryonen der Linie *oregon R* (Schneider, 1972)

3.14 Auftragsarbeiten

Sequenzierungen	LGC Genomics, Berlin
	SEQLAB – Sequence Laboratories Göttingen GmbH
Antikörpergeneration	Pineda – Antikörper-Service, Berlin

3.15 benutzte Internetseiten

BDGP	http://www.fruitfly.org/
Blast	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/
DroID	http://www.droidb.org/
Flybase	http://flybase.org/
InterProScan	http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/
McPromoter	http://tools.genome.duke.edu/generegulation/McPromoter/
Smart	http://smart.embl-heidelberg.de/

4. Methoden

4.1 Molekulargenetische Arbeiten

4.1.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

(Sambrook et al., 1989)

TfbI
30 mM NaAc
100 mM RbCl
10 mM $CaCl_2$
50 mM $MnCl_2$ (nach dem Autoklavieren zugeben)
15 % (v/v) Glycerin
pH 5,8 (mit Essigsäure einstellen)

TfbII
10 mM MOPS
15 mM $CaCl_2$
10 mM RbCl
15 % (v/v) Glycerin
pH 6,5 (mit NaOH einstellen)

LB-Medium (Luria-Bertani)
1,0 % (w/v) Trypton/Pepton aus Casein
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
0,5 % (w/v) NaCl

500 ml LB-Medium wurden mit 5 ml einer 50 ml-DH5α-Übernachtkultur angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD_{600} von 0,4 - 0,6 kultiviert. Anschließend wurde die Kultur auf 50 ml-Röhren-Gefäße aufgeteilt, 15 min auf Eis inkubiert und für 5 min bei 4 000 UpM und 4 °C abzentrifugiert. Die Resuspension erfolgte in 0,4 VT (Volumenteilen) TfbI mit darauffolgender, 15minütiger Lagerung auf Eis. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 4 000 UpM, 4 °C) wurden die Zellen in 0,04 VT TfbII aufgenommen und nochmals 15 min auf Eis inkubiert. Die kompetenten Zellen wurden zu je 50 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

4.1.2 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

(Sambrook et al., 1989)

500 ml LB-Medium wurden mit 5 ml einer DH5α-Übernachtkultur angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD_{600} von 0,4 – 0,6 kultiviert. Danach wurde die Kultur auf 50 ml-Röhren-Gefäße aufgeteilt, 15 min auf Eis inkubiert und für 15 min bei 4 000 UpM und 4 °C abzentrifugiert. Die Resuspension erfolgte in 500 ml eiskaltem, sterilem Wasser. Nach erneuter Zentrifugation (4 000 UpM, 4 °C, 15 min) wurden die Zellen in 20 ml einer 10%igen Glycerinlösung aufgenommen und wiederum zentrifugiert (4 000 UpM, 4 °C, 15 min). Die kompetenten Zellen wurden abschließend in 3 ml einer 10%igen Glycerinlösung resuspendiert, zu je 50 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

4.1.3 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

(Sambrook et al., 1989)

LB-Selektionsplatten LB-Medium
1,5 % (w/v) Agar
Ampicillin 100 µg/ml, Chloramphenicol 23 µg/ml
oder Kanamycin 50 µg/ml

50 µl dauerkompetente *E. coli* Zellen (Kompetenz 10^7- 10^9 Transformanten/µg DNA) wurden auf Eis aufgetaut und nach Zufügen von etwa 100 ng Plasmid-DNA-Lösung kurz durchmischt. Sollten käuflich erworbene cDNAs transformiert werden, wurde die Hälfte des Whatman-Plättchens, auf dem sich die cDNA befand, mit 50 µl 1 x-TE-Puffer gewaschen. Sowohl der Waschpuffer als auch das gewaschene Plättchen wurden, in unterschiedlichen Ansätzen, zu den aufgetauten Zellen gegeben. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42 °C. Es wurden 250 µl vorgewärmtes LB-Medium zugegeben und die Bakterien zur Ausbildung der Antibiotika-Resistenz 1,0 - 1,5 h bei 37 °C im Wärmeschrank geschüttelt. Der Transformationsansatz wurde anschließend auf LB-Selektionsplatten, auf denen nur erfolgreich transformierte Zellen wachsen können, ausplattiert. Die Inkubation erfolgte ü. N. im Wärmeschrank bei 37 °C.

4.1.4 Transformation elektrokompetenter Zellen

(Sambrook et al., 1989)

Aufgrund hoher Effizienz können Bakterien mit dieser Methode wesentlich größere DNA-Mengen als bei der chemischen Transformation aufnehmen. Dazu wurden die elektrokompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 1 µg Plasmid-DNA in eine Elektroporationsküvette pipettiert. Dabei war darauf zu achten, dass die Kontakte der Küvette trocken waren und die Suspension den kompletten Boden bedeckte. Nachdem die Küvette in den Elektroporator gestellt worden war, wurde der Elektropuls ausgelöst. Anschließend wurde die Bakteriensuspension mit 200 - 300 µl vorgewärmtem LB-Medium versetzt, in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und zur Ausbildung der Antibiotika-Resistenz für 1,0 - 1,5 h bei 37 °C im Wärmeschrank geschüttelt. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf LB-Selektionsplatten auspattiert und ü. N. bei 37 °C inkubiert.

4.1.5 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

4.1.5.1 Plasmid-Isolierung im analytischen Maßstab (Mini-Präparation)

auch als alkalische Lyse bezeichnet (Birnboim and Doly, 1979)

L1-Lösung 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
10 mM EDTA
100 µg/ml RNase A

L2-Lösung 200 mM NaOH
1 % (w/v) SDS

L3-Lösung 3M Kaliumacetat,
pH 4,8 (in wenig Aqua dest. lösen, pH-Wert mit Essigsäure einstellen)
10 mM Tris/HCl, pH 8,0
1 mM EDTA

Kolonien der Transformationsplatten wurden in 3 ml LB-Medium plus Antibiotikum angeimpft und ü. N. bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. 1,5 ml der Kulturen wurden am nächsten Tag in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und für 5 s bei 13 000 UpM abzentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstands wurde das Pellet in 100 µl L1-Lösung resuspendiert, um die Zellen aufzuschließen und die RNA zu zerstören. Durch Zugabe von 200 µl L2-Lösung begann die alkalische Lyse und es wurden die zelleigenen Proteine zerstört. Nach 5minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurden 150 µl L3-Lösung zur Neutralisation zugegeben und die Reaktionsgefäße für 10 min bei 13 000 UpM zentrifugiert, um Zelltrümmer und chromosomale DNA aus der Lösung zu entfernen. 400 µl des Überstands wurden in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Plasmid-DNA nach Zugabe von 0,8 VT Isopropanol durch Zentrifugation (30 min bei RT und 13 000 UpM) pelletiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % EtOH gewaschen und nach dem Trocknen in 25 µl H_2O gelöst.

4.1.5.2 Plasmid-Isolierung im präparativen Maßstab (Midi-Präparation)

(Jetstar 2.0, Genomed)

Um größere Mengen Plasmid-DNA aufzureinigen wurden 50 ml LB-Medium plus Antibiotikum mit der entsprechenden Vorkultur angeimpft und ü. N. bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Diese Kultur wurde in ein 50 ml-Röhren-Gefäß überführt und für 10 min bei 4 000 UpM und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierten Zellen in 4 ml E1-Puffer resuspendiert. Nach einer 5minütigen Inkubation bei RT wurden die Zellen durch Zugabe von 4 ml E2-Puffer für 5 min lysiert. Zur Neutralisation wurden 4 ml E3-Puffer zugegeben und anschließend chromosomale DNA und Zelltrümmer durch 10minütige Zentrifugation (4 500 UpM und 4 °C) pelletiert. Der Überstand wurde auf eine zuvor mit 10 ml E4-Puffer äquilibrierte Anionenaustauschersäule geladen. Nach der Bindung der Plasmid-DNA wurde die Säule zweimal mit je 10 ml E5-Puffer gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe von 5 ml E6-Puffer eluiert und durch Zugabe von 0,7 VT Isopropanol in einer 30minütigen Zentrifugation (13 000 UpM und 4 °C) gefällt. Dazu wurde das DNA-Isopropanol-Gemisch auf vier 2 ml-Eppendorfreaktionsgefäße aufgeteilt. Das Präzipitat wurde mit 70 % EtOH gewaschen und nach dem Trocknen in je 30 µl H_2O resuspendiert.

4.1.6 Gelelektrophorese von DNA in Agarosegelen

(Sambrook et al., 1989)

TAE-Puffer (10x)	400 mM Tris (pH 7,7) 200 mM Essigsäure 10 mM EDTA	**TBE-Puffer (10x)**	900 mM Tris/HCl (pH 7,9) 900 mM Borsäure 20 mM EDTA

DNA-Auftragspuffer (10x): 30 % (w/v) Glycerin in 10x TAE
0,01 % (w/v) Bromphenolblau
0,01 % (w/v) Xylencyanol

Für analytische Gele sowie für Gele, aus welchen anschließend DNA isoliert werden sollte, wurde einfach konzentrierte TBE-Lösung mit 1 % Agarose aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf etwa 60 °C wurde die viskose Lösung mit 1 µl Ethidiumbromid/100 ml Gel versetzt und in Gelkammern der Größe 4 cm x 6 cm bzw. 8 cm x 10 cm gegossen. Als Laufpuffer diente 1 x TBE-Puffer, die aufzutrennenden DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10 VT

10 x DNA-Auftragspuffer versetzt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung bei 60-100 V Gleichspannung konnte die orangerote Fluoreszenz des DNA/Ethidiumbromid-Komplexes durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden. Um die Größe der DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde der MassRuler™ DNA Ladder Mix verwendet.

4.1.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

4.1.7.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen nach der Jetsorb-Methode (Jetsorb Gel Extraktion Kit, Genomed)

Vollständig verdaute, ungefällte Plasmid-DNA wurde über ein TBE-Gel aufgetrennt und die aufzureinigende Bande mit Hilfe eines Skalpells auf dem UV-Tisch ausgeschnitten. Das Gelstück wurde in ein leeres Eppendorfreaktionsgefäß überführt, um sein Gewicht zu bestimmen und anschließend mit je 300 µl A1-Puffer sowie 10 µl Jetsorb-Suspension pro 100 mg Gel versetzt. Bei einer 15minütigen Inkubation im 60 °C warmen Wasserbad wurde das Gelstück gelöst und die Suspension danach für 30 s bei 12 000 UpM zentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 µl A1-Puffer gelöst und nochmals zentrifugiert, bevor dieser Waschschritt zweimal mit je 300 µl A2-Puffer wiederholt wurde. Nach dem Trocknen des Pellets wurde dieses in 20 µl H_2O aufgenommen und die Suspension für 10 - 15 min im Wasserbad bei 60 °C inkubiert, um die DNA von der Matrix zu lösen. Nach einer abschließenden Zentrifugation (30 s bei 12 000 UpM) wurde der Überstand, der die gereinigte DNA enthielt, in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und dessen Konzentration mittels Gelelektrophorese bestimmt.

4.1.7.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen nach der GFX-Methode (GFX™ PCR, DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare)

Auch bei dieser Methode wurde das gewünschte DNA-Fragment unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, in ein leeres Eppendorfreaktionsgefäß überführt und gewogen. Pro 10 mg Gel wurden 10 µl Capture Buffer zugegeben und die Agarose im Wasserbad bei 60 °C für 15 min gelöst. Die Suspension wurde auf eine Glasfasermatrix-Säule gegeben, die auf einem Sammelgefäß stand, und dort für 1 min bei RT inkubiert. Nach einer anschließenden Zentrifugation (30 s bei 5 000 UpM) wurde der Durchlauf verworfen, die säulengebundene DNA mit 500 µl Wash Buffer gewaschen und nochmals zentrifugiert (30 s bei 5 000 UpM). Zur Trocknung der Säule wurde diese in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt, für 1 min bei 13 000 UpM zentrifugiert und anschließend für 15 min bei RT inkubiert. Nach Überführung der Säule in ein weiteres Reaktionsgefäß wurden 25 µl H_2O zugegeben und 10 min inkubiert. Es wurde abschließend für 1 min bei 13 000 UpM zentrifugiert und die Konzentration der so eluierten DNA per Gelelektrophorese bestimmt.

4.1.8 Präparation von Nukleinsäuren

4.1.8.1 Isolation genomischer DNA aus adulten *Drosophilae* mittels Stahlkugeln (modifiziert nach BDGP)

Puffer A	100 mM Tris/HCl (pH 7,5) 100 mM EDTA 100 mM NaCl 0,5 % (w/v) SDS	**KAc-Lösung**	5 M Kaliumacetat
		LiCl-Lösung	6 M Lithiumchlorid

Es wurden 15 Fliegen in einem 1,5 ml-Eppendorfreaktionsgefäß mit 400 µl Puffer A und drei Stahlkugeln versetzt und 3 - 5 min per Hand geschüttelt. Nach dem Entfernen der Kugeln wurde die Suspension für 30 min auf 65 °C inkubiert, bevor 570 µl LiCl- und 230 µl KAc-Lösung zugegeben wurde. Nach einer 10minütigen Inkubation auf Eis wurde 15 min bei 13 000 UpM zentrifugiert. 1 ml des Überstands wurde in ein 2 ml-Eppendorfreaktionsgefäß überführt und die genomische DNA durch Zugabe von 800 µl Isopropanol gefällt (10 min bei 13 000 UpM). Nach einem Waschschritt in 70%igem EtOH (5 min bei 13 00 UpM), wurde die DNA in 75 µl H_2O aufgenommen.

4.1.8.2 Isolation von RNA aus adulten *Drosophila*-Fliegen (Trizol®-Reagenz, Invitrogen)

10 - 15 Fliegen wurden in einem 1,5 ml-Eppendorfreaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit einem Pistill zerkleinert. Das Gewebe wurde in 1 ml Trizol-Reagenz aufgenommen und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Chloroform zugegeben und die Suspension für 15 s stark geschüttelt, bevor eine 3minütige Inkubation bei RT folgte. Bei der anschließenden Zentrifugation (15 min bei 13 000 UpM und 4 °C) bildeten sich zwei Phasen, die obere aquatische Phase enthielt die RNA und war durch die Zelltrümmer von der Phenol-Chloroform-Phase getrennt. Die aquatische Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die enthaltene RNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol und anschließender Zentrifugation (10 min bei 13 000 UpM und RT, danach 10 min bei 13 000 UpM und 4 °C) gefällt. Das Pellet wurde mit 75%igem eiskaltem EtOH (-80 °C) gewaschen (5 min bei 6 000 UpM und 4 °C) und nach kurzem Antrocknen für 10 min in 30 µl RNase-freiem Wasser bei 60 °C gelöst. Die RNA wurde auf einem MOPS-Gel (20 mM MOPS, pH 7,0; 1 mM EDTA, 8 mM Natriumacetat; 1 % Agarose) analysiert.

4.1.8.3 Aufreinigung von polyA$^+$-RNA (mRNA) (Oligotex mRNA Mini Kit, QIAGEN)

Die zuvor aufgereinigte RNA wurde in ein 1,5 ml-Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert und mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 250 µl gebracht. Es wurden 250 µl Puffer OBB und 15 µl Oligotex-Suspension zugegeben und die Lösung durch auf- und abpipettieren gemischt. Es folgten zwei Inkubationsschritte für 3 min bei 70 °C bzw. für 10 min bei RT. Der Oligotex:mRNA-Komplex wurde durch Zentrifugation für 2 min bei 13 000 UpM pelletiert und der Überstand entfernt. Zum Entfernen evtl. Unreinheiten wurde das Pellet zwei Mal in je 1 ml Puffer OW2 resuspendiert und nochmals zentrifugiert (2 min bei 13 000 UpM). Für die Elution der mRNA wurde das Pellet in 50 µl 70 °C warmen Puffer OEB aufge-

nommen und wiederum zentrifugiert (2 min bei 13 000 UpM). Der Überstand, der die mRNA enthielt, wurde in ein frisches 1,5 ml-Eppendorfreaktionsgefäß überführt und als Ausgangsmaterial für die RT-PCR eingesetzt (siehe 4.1.12).

4.1.9 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Quantifizierung von DNA erfolgte im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum der DNA. In einem Gesamtvolumen von 500 µl wurde die OD_{260} einer 1 : 500 in H_2O verdünnten DNA-Suspension bestimmt, nachdem als Referenzwert die OD_{260} von reinem H_2O gemessen worden war. Unter Berücksichtigung folgender Parameter lässt sich aus der Absorption (optische Dichte; OD) die Konzentration der Nukleinsäuren in µg/µl bei einer Quarzküvettendicke von 1cm berechnen:

doppelsträngige DNA	OD_{260} x 50 x Verdünnungsfaktor
einzelsträngige DNA	OD_{260} x 33 x Verdünnungsfaktor
RNA	OD_{260} x 37 x Verdünnungsfaktor

Neben der Extinktion der Lösung bei 260 nm wurde auch die Extinktion bei 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) bestimmt, wodurch eine Aussage über den Grad der Verunreinigung der DNA-Lösung durch Proteine gemacht werden kann.

4.1.10 Konzentrationsabschätzung von DNA mittels Agarosegelelektrophorese

Neben der genauen Konzentrationsbestimmung der DNA durch photometrische Messungen ist es möglich, schon geringe Mengen DNA mittels Agarosegelelektrophorese abzuschätzen. Dazu wurde 1 µl gelöste DNA mit Auftragspuffer versetzt und auf ein Agarosegel aufgetragen. Neben dieser Probe wurde ein bestimmtes Volumen eines Standard-DNA-Größenmarkers mit bekannten Fragmentlängen und Konzentrationsangaben aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA konnte anhand der Leuchtstärke des interkalierenden Ethidiumbromids ein Vergleich zwischen der DNA und dem Standard-DNA-Größenmarker gezogen und so eine Mengenangabe pro µl abgeschätzt werden.

4.1.11 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

(Mullis et al., 1986, Saiki et al., 1988, Invitrogen, Axon)

In der PCR (Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Ketten-Reaktion) findet eine Amplifizierung eines bestimmten DNA-Fragments statt. Synthetisch hergestellte Oligonukleotide, sogenannte Primer, die komplementär zum 5'- bzw. 3'-Ende des zu amplifizierenden Fragments sind werden von der thermostabilen *Taq*-Polymerase als Startpunkte für die Verlängerung des DNA-Einzelstranges verwendet. Ein Reaktionsansatz von 50 µl setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

5-50ng Plasmid-DNA bzw. 100ng genomische DNA als Templat
1 µl 5'-Primer (25pmol/µl)
1 µl 3'-Primer (25pmol/µl)
5 µl dNTP-Mix (2mM pro dNTP)
5 µl 10x PCR-Puffer
1 µl Taq-DNA-Polymerase (1U/µl)
evtl. 2 µl DMSO (bei genomischer DNA)
evtl. 1 µl MgCl2 (50 mM, bei genomischer DNA)
ad 50 µl H_2O

Ein Synthesezyklus besteht aus drei Abschnitten und wurde etwa 30mal wiederholt: Die Denaturierung der DNA erfolgte bei 94 °C, danach lagerten sich in einem zweiten Schritt die Primer bei einer Temperatur zwischen 50 °C und 60 °C an. Dies war von der Länge der Oligonukleotide und dem Gehalt an GC-Basen abhängig. Anschließend elongierte die Polymerase bei ihrem Temperaturoptimum von 68 °C bzw. 72 °C den DNA-Strang komplementär zum Templat, wobei sie die zugefügten dNTPs (Desoxynukleotidtriphosphate) verwendete. Vor dem ersten Zyklus wurde eine zusätzliche, 10minütige Denaturierung bei 94 °C durchgeführt, an den letzten Zyklus schloss sich eine 10minütige Elongationsphase bei 72 °C an.

4.1.12 Reverse Transkriptions-(RT-)PCR

(OneStep RT-PCR Kit, QIAGEN)

Mit dieser Methode kann aufgereinigte mRNA zunächst in cDNA umgeschrieben und anschließend amplifiziert werden. Ein Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1 µl Template RNA
4 µl 5x RT-PCR Puffer
4 µl 5x Q-Solution
1 µl Primer A (25pmol/µl)
1 µl Primer B (25pmol/µl)
1 µl dNTPs (10mM)
0,25 µl RNase out
0,8 µl RT-PCR Enzym Mix
ad 20 µl RNase freies H_2O

Für die Amplifikation der cDNA wurde das Standard-PCR-Programm benutzt, wie es unter 4.1.11 beschrieben wurde. Diesem wurde ein 30minütiger Inkubationsschritt bei 50 °C vorgeschaltet, währenddessen die reverse Transkription, d. h. das Umschreiben der mRNA in cDNA, ablief. Um sicher zwischen DNA und mRNA unterscheiden zu können, sollten die Primer so gewählt werden, dass das PCR-Produkt ein Intron überspannt.

4.1.13 Klonierung von PCR-Produkten in TOPO®-Vektoren

(Invitrogen)

PCR-Produkte wurden zur weiteren Analyse mit Hilfe des Topo-Systems in einen Zwischen-Vektor kloniert. Wurde bei der PCR eine Polymerase benutzt, die durch ihre terminale

Transferaseaktivität an den 3'-Enden der PCR-Produkte einen A-Überhang erzeugt, wurde der Vektor pCR®II-TOPO® benutzt, an dessen linearisierten Enden entsprechend dazu ein T-Überhang vorzufinden ist. PCR-Produkte, die mittels einer Proofreading-Polymerase erzeugt wurden und nicht über einen A-Überhang verfügten, konnten in den pCR®-Blunt II-TOPO®-Vektor kloniert werden. Sollte das PCR-Produkt mit dem Gateway-System weiterbearbeitet werden, wurde der pENTR™/D-TOPO®-Vektor benutzt. Diese Topo-Vektoren sind linearisiert und mit Topoisomerase I-Molekülen komplexiert. Dadurch können die PCR-Produkte leicht in den Vektor kloniert werden, da dieses Enzym supercoil-DNA-Moleküle schneidet, relaxiert und ligiert. Ein Klonierungsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

10-20 ng frisches PCR-Produkt
0,3-0,5 µl TOPO®-Vektor
1 µl Salzlösung
ad 6 µl H_2O

Nach 5minütiger Inkubation bei RT wurden 2 µl dieses Ansatzes in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert.

4.1.14 Enzymatische Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen schneiden doppelsträngige DNA in einem für sie spezifischen, meist pallindromischen Sequenzabschnitt, so dass 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen entstehen. Dabei spaltet eine Enzymeinheit (Unit [U]) 1µg der DNA des Vektors λ in einer Stunde bei 37°C an allen für das entsprechende Enzym spezifischen Schnittstellen. Welche Enzymmenge verwendet werden muss, um die eingesetzte DNA vollständig zu schneiden, kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Benötigte Enzymmenge (Units/µg DNA)} = \frac{\text{48,5kb (bp λ) x Anzahl der Schnittstellen in der DNA}}{\text{Größe der DNA (bp) x Anzahl der Schnittstellen in λ}}$$

5 µg DNA (leerer End-Vektor oder Zwischen-Vektor inklusive Insert) wurden mit 1/10 VT Reaktionspuffer und der berechneten Menge des Restriktionsenzyms in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

4.1.15 DNA-Fällung mit Ethanol

Um DNA-Lösungen von Salzen oder Verunreinigungen zu befreien, wurde eine Fällung durchgeführt. Dafür wurde die DNA mit 1/10 VT NaAc (3 M, pH 4,8) und 2,5 VT 96%igem, –20 °C kaltem EtOH versetzt und für 15 min bei –20 °C inkubiert. Anschließend wurde für 30 min bei 13 000 UpM und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 70%igem EtOH (10 min bei 13 000 UpM) gewaschen und in einer geeigneten Menge H_2O resuspendiert.

4.1.16 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren

In einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden 150 ng Vektor-DNA mit einem dreifachen molaren Überschuss des zu klonierenden Fragments sowie 2 µl Ligationspuffer und 1 U T4-

DNA-Ligase vermischt. Die Ligationsreaktion wurde ü. N. bei 16 °C oder für 1 h bei 22 °C inkubiert, anschließend wurden 10 µl des Ansatzes in kompetente Zellen transformiert.

4.1.17 Rekombination von Vektoren des Gateway-Systems

(Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix, Invitrogen)

Der Zwischen-Vektor pENTR™/D-TOPO® und der Zielvektor pUASp-attB-rfa-10xMyc enthalten sogenannte att-Stellen, die aus der Rekombination zwischen spezifischen DNA-Abschnitten von *E. coli* und dem λ-Phagen bekannt sind. Die hier benutzten Komponenten stellen alle benötigten Proteine und Enzyme zur Verfügung, die für den Ablauf dieser Reaktion *in vitro* benötigt werden. 100 ng pENTR-Vorklon wurden dafür mit 100 ng des Zielvektors mit 1x TE-Puffer (pH 8,0) in einem Gesamtvolumen von 4 µl. Es wurde 1 µl des Clonase-Mix zugegeben, durch Vortexieren kurz durchmischt und bei RT für 1 h inkubiert. Zum Beenden der Reaktion wurden 0,5 µl Proteinase K zugegeben und das Gemisch für 10 min bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine Transformation in kompetente *E. coli*-Zellen.

4.1.18 Markierung von RNA-Sonden mittels *in vitro*-Transkription

(DIG RNA Labeling Kit, Roche)

5 µg Plasmid-DNA wurden stromabwärts der zu transkribierenden Fremd-DNA enzymatisch linearisiert und nach dem Fällen mittels EtOH in 15 µl H_2O aufgenommen. Es erfolgte eine Konzentrationsabschätzung per Gelelektrophorese. Zur *in vitro*-Transkription wurde 1 µg dieser DNA in folgendem Ansatz für 2 h bei 37 °C inkubiert:

1 µg Plasmid-DNA
2 µl DIG-RNA-Labeling Mix
2 µl 10x Transkriptionspuffer
evtl. 0,2 µl RNase Inhibitor
1 µl T3-, T7- oder Sp6-RNA-Polymerase
ad 20 µl H_2O

Für Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen wurden biotinylierte RNA-Sonden erstellt, wofür die Transkriptions-Reaktion mit Biotin- statt DIG-RNA-Labeling Mix durchgeführt wurde.

4.2 Arbeiten mit *Drosophila melanogaster*

4.2.1 Stammhaltung und Zucht von *Drosophila melanogaster*

Maismehlagar
60 % (w/v) Maismehl
7,15 % (w/v) Fruktose
1,2 % (w/v) Trockenhefe
0,14 % (w/v) Nipagin
0,6 % (w/v) Propionsäure
0,7 % (w/v) Agar

Die Fliegen wurden in zylindrischen Plastikgefäßen mit einer Höhe von 6 cm und einem Durchmesser von 2,5 bzw. 3,5 cm in Klimakammern bei 18 °C oder 24 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70 % gezüchtet. Die Flaschen wurden ca. 2 cm hoch mit Maismehlagar befüllt, der den Larven als Nährmedium diente, sowie mit Trockenhefe bestreut, die die Nahrungsquelle für die adulten Fliegen darstellte. Zur Stammhaltung wurden die Fliegen alle zwei Wochen auf neue Flaschen gesetzt, zur Vermehrung alle drei bis vier Tage.

4.2.2 *D. melanogaster*-Kreuzungen

Um jungfräuliche, weibliche Fliegen für Kreuzungsexperimente zu erhalten, wurden aus Flaschen mit schlüpfbereiten Puppen alle adulten Tiere entfernt. Die Spermien der frisch geschlüpften männlichen Tiere benötigen bei einer Umgebungstemperatur von 18 °C etwa 16 h, bei 24 °C ca. 6 h um sich vollständig zu entwickeln. Deswegen können weibliche Fliegen, die in diesem Zeitraum abgesammelt wurden, als virginell angesehen und in frischen Zuchtflaschen mit den gewünschten Männchen verkreuzt werden.

4.2.3 Gewinnung von *D. melanogaster*-Embryonen

Fruchtsaft-Agar:
25 % (w/v) Apfel- oder Traubensaft
1,25 % (w/v) Saccharose
2,5 % (w/v) Trockenhefe
0,2 % (w/v) Nipagin
2,7 % (w/v) Agar

Um Embryonen zu erhalten, wurde eine adäquate Menge an Fliegen in größeren Ablagegefäßen oder in Plastikflaschen gehalten. Hierin befand sich jeweils Fruchtsaft-Agar, der mit etwas Hefe als Stimulans zur Eiablage bestrichenen bzw. bestreut wurde. Nach der gewünschten Ablagezeit wurden die Fliegen auf neuen Fruchtsaft-Agar gesetzt.

4.2.4 Fixierung von Fliegenembryonen

TNX (NaCl-Titon)
0,7 % NaCl
0,01 % Triton X-100

PBT
0,1 % (v/v) Tween® 20 in PBS

PBS (Phosphate Buffered Saline)
130 mM NaCl
10 mM Na_2HPO_4
2 mM KH_2PO_4
3 mM KCl, pH 7,4

F-PBS (Formaldehyd-PBS)
4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS

Die Embryonen wurden mit einem Pinsel und ausreichend TNX in ein Stahldrahtnetzchen überführt und mehrmals mit TNX gewaschen. Zur Dechorionisierung wurden die Embryonen für 2 - 5 min in 50 % Klorix getaucht, ständig bewegt und unter dem Binokular beobachtet. Erschien die Oberfläche der Embryonen glänzend und waren die Atemanhänge nicht mehr zu sehen, wurde die Reaktion durch mehrmaliges Waschen mit TNX abgestoppt. Die Wahl der anschließenden Fixierungsmethode richtete sich nach dem zu verwendenden Antikörper.

4.2.4.1 Fixierung mit Paraformaldehyd

Die dechorionisierten Embryonen wurden mit Hilfe eines Pinsels in ein Eppendorfreaktionsgefäß transferiert, das je 500 µl Heptan und F-PBS enthielt, und für 20 min sehr stark schüttelnd inkubiert. In diesem Schritt sammeln sich die Embryonen an der Phasengrenze, wo der fixierende Formaldehydanteil der Lösung mit Hilfe des Heptans durch die Vitellinmembran gebracht wird. Anschließend wurde die untere, wässrige Phase vollständig entfernt und die Embryonen einmal in Heptan gewaschen.

4.2.4.4 Hitzefixierung

Die dechorionisierten Embryonen wurden mit so wenig TNX wie möglich in ein 50 ml-Röhren-Gefäß überführt. Nach Zugabe von 5 ml kochendem PBT wurden sie für 10 s im 100 °C heißen Wasserbad inkubiert, sofort in eiskaltes PBT überführt und zum vollständigen Abkühlen auf Eis inkubiert. Alternativ wurden die dechorionisierten Embryonen im Stahldrahtnetzchen für 10 s in kochendes PBT getaucht und danach in eiskaltes PBT überführt.

Nach der Fixierung musste die Vitellinmembran entfernt werden. Dazu wurden die Embryonen in ein Eppendorfreaktionsgefäß mit je 500 µl Heptan und MeOH transferiert und für 50 s auf dem Vortexiergerät heftig durchmischt. Da die devitellinisierten Embryonen nach unten sanken, konnte anschließend der Überstand entfernt und die Embryonen mehrmals mit MeOH gewaschen werden. Die Lagerung der fixierten Embryonen erfolgte bei 4 °C in MeOH. Für wenige Antikörper wurde auf die Fixierung komplett verzichtet und die Embryonen nach dem Dechorionisieren direkt devitellinisiert.

4.2.5 Präparation von *D. melanogaster*-Geweben

Für die Antikörperfärbung an larvalen Muskeln von *D. melanogaster* wurden dritte Larven abgesamelt und unter dem Binokular mit dünnen Nadeln am anterioren sowie posterioren Pol in Präparierschalen fixiert. Dies erfolgte auf einem Stück Parafilm in einem Tropfen PBT, damit das Gewebe nicht austrocknete. Mit zwei DuMont-Pinzetten wurde nun die Larve von einem Ende beginnend aufgezupft und störende Gewebe wie Darm, Fettkörper oder Speicheldrüsen entfernt. Die Larvenhülle wurde mit je zwei weiteren Nadeln auf jeder Seite fixiert und für 1 h mit F-PBS zur Fixierung inkubiert. Danach wurde dreimal mit PBT gewaschen, bevor die fixierten Larvenhüllen in Eppendorfreaktionsgefäße überführt wurden. Die anschließende immunfluoreszierende Antikörperfärbung erfolgte wie für Embryonen beschrieben (4.3.2).
Zur Analyse der Thorax-Muskulatur wurden betäubte Fliegen in wenig PBT von dorsal auf einen Objektträger gelegt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Mit einer Rasierklinge wurde der Thorax symmetrisch halbiert, in 50 % Glycerin eingebettet und mikroskopiert.

4.2.6 P-Element Keimbahntransformationen von *D. melanogaster*

(Rubin and Spradling, 1982, Spradling and Rubin, 1982)

Injektionspuffer (10x): 0,1 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4, pH 7,4
5 mM KCl

4.2.6.1 Vorbereitung der Embryonen

Drei bis fünf Tage nach dem Schlüpfen wurden 200 - 300 *white*$^-$-Fliegen in Ablagegefäßen bei 18 °C gehalten. Die Apfelsaft-Agar-Schalen wurden alle 20 min gewechselt und die darauf befindlichen Embryonen sofort dechorionisiert (siehe 4.2.4). Die Embryonen wurden mit einem Pinsel auf einen rechteckigen Apfelsaft-Agar-Block überführt und mit Hilfe einer Präpariernadel mit dem anterioren Pol zur Blockkante hin ausgerichtet. Ein mit Heptankleber beschichtetes Deckglas wurde leicht auf die Embryonen gedrückt, so dass sie auf diesem fixiert wurden. Um den Innendruck der Embryonen für die nachfolgenden Injektionen zu verringern, wurden sie für 8 - 12min im Exikator über Kieselgel getrocknet. Um weiteres Austrocknen zu verhindern, wurden die Embryonen nun mit Voltalef-Öl überschichtet.

4.2.6.2 Mikroinjektion

Die für die Mikroinjektion benötigte Injektionsnadel wurde aus einer Borosilikat-Glaskapillare (Durchmesser 1,2 mm) mit Innenfilament hergestellt, die in einem Kapillarziehgerät manuell ausgezogen wurde. Die Injektionsnadel wurde dann mit dem Injektionsansatz befüllt, der sich wie folgt zusammensetzte:

5 µg gereinigte DNA
2,5 µg pπ25.7wc (Helferplasmid, nicht bei Gateway-Konstrukten)
2,5 µl 10x Injektionspuffer
ad 25 µl H_2O

Vor dem Einfüllen in die Kapillare wurde der Injektionsansatz zentrifugiert (30 min bei 13 000UpM), um störende Schwebeteilchen zu sedimentieren. Die befüllte Kapillare wurde mit dem Drucksystem der Mikroinjektionsapparatur verbunden und am Mikromanipulator befestigt. Unter dem Mikroskop (200 fache Vergrößerung) wurde die Kapillare am Deckglas abgebrochen, um sie zu öffnen. Dann wurde die Kapillare in den posterioren Pol des Embryos eingeführt und die DNA-Lösung injiziert. Embryonen, bei denen schon die Polzellen erkennbar waren, wurden durch seitliches Aufreißen mit der Injektionsnadel abgetötet, da bei diesen die Transformation der Keimbahn nicht mehr möglich ist. Nachdem alle Embryonen injiziert waren, wurde das Deckglas wiederum mit Voltalef-Öl beschichtet, in eine feuchte Petri-Schale mit Apfelsaft-Agar überführt und bei 24 °C bis zum Schlüpfen der Larven inkubiert. Die Larven wurden mit einer Präpariernadel abgesammelt, in Fliegenflaschen mit Zuchtmedium überführt und bis zum Schlüpfen der adulten Fliegen bei 24 °C inkubiert.

4.2.6.3 Selektion transformierter Fliegen

(Klemenz et al., 1987)

Die injizierten DNA-Konstrukte enthielten das *white*-Gen, das die Selektion transformierter Fliegen aufgrund der roten Augenfarbe ermöglicht. Diese wurde erst in der folgenden G1-Generation sichtbar, da die Insertion der P-Elemente in der Keimbahn der injizierten Embryonen erfolgte. Die Fliegen, die sich aus den injizierten Embryonen entwickelten (G0-Generation), wurden jungfräulich abgesammelt und in Einzelpaarzuchten mit *white*$^-$-Fliegen verkreuzt. Traten transgene Nachkommen, zu erkennen an orange- bis rotfarbigen Augen, auf, wurden diese ebenfalls in Einzelpaarzuchten mit *white*$^-$-Fliegen verkreuzt. Wurden hier transgene Weibchen eingesetzt, konnten Mehrfachinsertionen auf einem Chromosom

eliminiert werden, da nur in *D. melanogaster*-Weibchen Cross-Over-Ereignisse stattfinden. Mit der reziproken Kreuzung wurden Mehrfachinsertionen auf unterschiedlichen Chromosomen entfernt. Dieser Kreuzungsschritt wurde dreimal wiederholt, anschließend wurden die heterozygoten Tiere zur Etablierung stabiler Linien untereinander verkreuzt. Die homozygoten Tiere waren in der Regel an einer dunkleren Augenfarbe zu erkennen.

4.2.7 Das UAS-GAL4-System

(Brand and Perrimon, 1993)

Durch das UAS-GAL4-System wird die zeit- und gewebespezifische Expression von Genprodukten in *D. melanogaster* ermöglicht. Die Expression des Hefetranskriptionsfaktors GAL4 wird dabei unter die Kontrolle eines Promotors gestellt, der in den gewünschten Geweben zur gewünschten Zeit aktiv ist. GAL4 wiederum interagiert mit dem UAS-Promotorelement (upstream activating sequence) und aktiviert die Expression von Genen, die unter der Kontrolle der UAS-Stelle stehen. Sowohl das GAL4- als auch das UAS-Konstrukt liegen in unterschiedlichen transgenen Fliegen vor. Durch Kreuzung dieser beiden Linien werden sie in einem Embryo kombiniert und der Effekt der ektopischen Expression kann in den Nachkommen dieser Kreuzung beobachtet werden (Abb. 4.1).

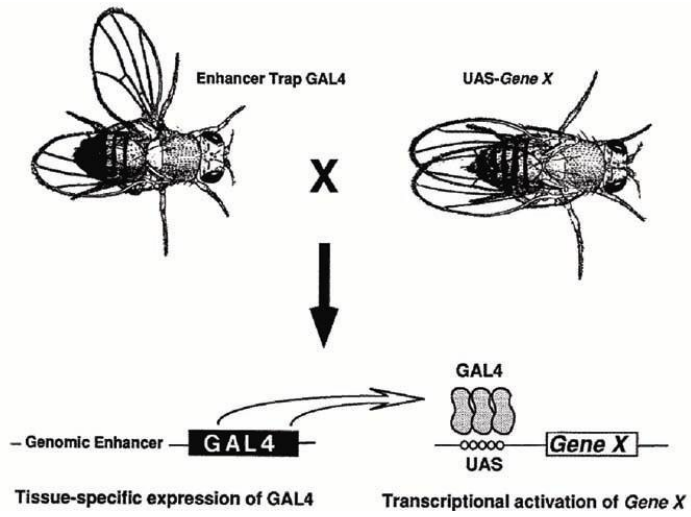

Abb. 4.1: Das UAS-GAL4-System in *Drosophila melanogaster*
Für eine zeit- und gewebespezifische Expression von Genen werden zwei Fliegenlinien verkreuzt, die transgen für unterschiedliche Konstrukte sind. Eine Fliegenlinie exprimiert den Transkriptionsfaktor GAL4 unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors, die andere Linie trägt ein Konstrukt aus dem UAS-Element und dem zu untersuchenden Gen X im Genom. Werden beide Linien verkreuzt, kann in Zellen mit GAL4-Expression die Transkriptionsaktivierung des Gens X beobachtet werden (Abbildung aus Brand and Perrimon, 1993)

4.2.8 Allelietest

Um zu testen, ob zwei letale Fliegenlinien zueinander allelisch sind, wurden diese miteinander verkreuzt. Dies wird durchgeführt, um den genomischen Bereich einer zu untersuchenden Mutation zu kartieren. Alle *D. melanogaster*-Linien, die letale Mutationen auf einem ihrer Chromosomen tragen, werden standardmäßig über einem sogenannten Balancerchromosom gezüchtet. Dieses verhindert die Rekombination und exprimiert gleichzeitig Markergene, wodurch adulte Fliegen und teilweise auch Embryonen, welche dieses spezielle Chromosom tragen, identifiziert werden können. Fliegen mit Balancerchromosomen im homozygoten Zustand sind dabei aufgrund von Letalfaktoren nicht lebensfähig. Exprimierten die Nachkommen einer solchen Kreuzung nur die erwähnten Marker, sind die beiden zu testenden Mutationen zueinander allelisch.

4.3 Histologische Methoden an *Drosophila melanogaster*-Embryonen

4.3.1 Antikörperfärbung nach der „Avidin-Biotinylated Enzyme Complex"-Methode (ABC-Methode)

(Lawrence and Johnston, 1989)

Epon
51,5 % (w/w) Epoxy-Einbettungsmittel
28 % (w/w) Epon Härter DDSA
19 % (w/w) Epon Härter MNA
1,5 % (w/w) Epon Beschleuniger DMP 30

Das Grundprinzip des immunhistochemischen Nachweises nach der ABC-Methode besteht darin, dass ein unmarkierter Erstantikörper, der an ein Antigen bindet, durch einen biotinylierten Zweitantikörper mit dem „Vectastain ABC Standard Kit" detektiert werden kann. Die an den Zweitantikörper gebundenen Biotin-Moleküle bilden mit Avidin-Proteinen, an welche Meerrettich-Peroxidase-Moleküle gekoppelt sind, einen stabilen Komplex. Die Peroxidase bildet mit dem Katalysator H_2O_2 einen Komplex, der chromogene Stoffe oxidieren kann. Bei Verwendung von Diaminobenzidin (DAB) erhält man daraufhin eine braune Färbung, die sich bei Zusatz von NiCl zu schwarz ändert.
Um diese Färbung durchzuführen, wurde das MeOH von den fixierten und devitellinisierten Embryonen abgenommen und diese 3mal für je 10 min in PBT gewaschen. Die Waschschritte erfolgten jeweils bei RT unter leichtem Schwenken. Das PBT wurde entfernt und 250 µl des entsprechend verdünnten Erstantikörpers zugegeben. Die Inkubation erfolgte unter leichtem Schwenken ü. N. bei 4 °C.
Am nächsten Morgen wurde der Erstantikörper von den Embryonen entfernt und diese 3mal je 5 min in PBT gewaschen. Parallel dazu wurde eine kleine Menge fixierter und devitellinisierter Wildtyp-Embryonen 3 mal je 5 min in PBT rehydriert und anschließend mit einer 1 : 20-Verdünnung des biotinylierten Zweitantikörpers versetzt, um diesen zu präadsorbieren. Um unspezifische Bindungen des Zweitantikörpers in den zu färbenden Embryonen zu verhindern, wurden diese für 1 h in 2 % Ziegenserum in 500 µl PBT geblockt. Anschließend wurden 250 µl des präadsorbierten Zweitantikörpers in einer Endverdünnung von 1 : 500 zugegeben und die Embryonen für 2 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert.
Nach der Inkubation mit dem Zweitantikörper wurden die Embryonen 3mal je 10 min in PBT gewaschen und währenddessen die ABC-Lösung vorinkubiert. Dafür wurden je 3 µl der Lösung A (Avidin) und B (biotinylierte Peroxidase) aus dem „Vectastain ABC Standard Kit" in 500 µl PBT leicht geschüttelt. Die Lösung wurde auf die Embryonen gegeben und diese für 1 h bei RT geschüttelt. Anschließend erfolgten 3 weitere je 10minütige Waschschritte in PBT.
Die Embryonen wurden in 500 µl PBT in ein Blockschälchen überführt und mit 10 µl DAB (10 mg/ml) sowie 3 µl NiCl-Lösung (10 % w/v) versetzt. Durch Zugabe von 10 µl H_2O_2-Lösung (0,3 %) wurde die Reaktion gestartet. Die Färbung wurde unter dem Binokular beobachtet und bei ausreichender Intensität durch mehrfaches Waschen mit PBT gestoppt. Die Inaktivierung aller Lösungen, welche das karzinogene DAB enthielten, erfolgte in Klorix. Die gefärbten Embryonen wurden anschließend in ein Eppendorfreaktionsgefäß transferiert

und ü. N. bei 4 °C in 70 % EtOH entwässert. Am nächsten Tag wurden die Embryonen 3mal je 20 min in 96 % EtOH gewaschen, bevor sie in Epon eingebettet wurden. Zur Aushärtung des Mediums wurden die Objektträger im Wärmeschrank bei 60 °C getrocknet.

4.3.2 Immunfluoreszenzfärbung

Die fixierten und devitellinisierten Embryonen wurden rehydriert und ü. N. mit dem Erstantikörper inkubiert (siehe 4.3.1). Nach den Waschschritten und dem Blocken für 1 h in 2 % Ziegenserum/PBT wurde der fluoreszenzgekoppelte Zweitantikörper zugegeben und die Embryonen für 2 h bei RT damit inkubiert. Nachdem sie 3mal je 10 min mit PBT gewaschen worden waren, konnten die Embryonen in Fluoromount-G™ eingebettet werden.

4.3.3 Verstärkung mit dem TSA-System

(TSA™ Fluorescein bzw. TSA™ Biotin System, Perkin Elmer)

War mit den beschriebenen Methoden nur eine schwache Färbung zu erkennen, konnte diese mit dem TSA-Amplifikationssystem verstärkt werden. Dazu wurden die Embryonen zunächst für 2 h mit dem entsprechenden biotinylierten Zweitantikörper inkubiert und nach dreimaligem Waschen für 1 h in 500 µl vorinkubierter AB-Lösung geschüttelt (siehe 4.3.1). Anschließend wurden die Embryonen 3mal je 10 min mit PBT gewaschen, bevor sie für 30 min bei RT im TSA-Gemisch inkubiert wurden. Für Fluoreszenzfärbungen wurden hierbei 2 µl Fluorescein Reagenz, für standard-immunhistochemische Färbungen 2 µl Biotinyl Tyramid Reagenz in 100 µl Amplification Diluent verdünnt. Auf drei weitere, je 10minütige Waschschritte folgte die Hitzeinaktivierung des TSA. Dafür wurden die Embryonen für 10 min bei 70 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden sie ein weiteres Mal in PBT gewaschen, bevor sie entweder in Fluoromount-G™ eingebettet wurden oder die Visualisierung des Signals mittels DAB/H_2O_2 erfolgte (siehe 4.3.1).

4.3.4 *in situ*-Hybridisierung an fixierten *D. melanogaster*-Embryonen

(Tautz and Pfeifle, 1989, O'Neill and Bier, 1994, modifiziert)

X-Phosphat	50 mg/ml in DMF	**SSC (20x)**	300 mM Natriumcitrat 3 M NaCl, pH 7,0
HS-Lösung	50 % (w/v) Formamid	**Färbepuffer**	100 mM NaCl
(pH ~6,4)	25 % (w/v) 20x SSC		100 mM Tris/HCl, pH 9,5
	0,1 % (w/v) Heparin (50 mg/ml)		50 mM $MgCl_2$
	0,1 % (w/v) Tween®20		1 mM Levamisol
			0,1 % (w/v) Tween®20

Fixierte und devitellinisierte Embryonen (siehe 4.2.4) wurden durch drei je 10minütige Waschschritte in PBT rehydriert und anschließend für je 10 min in 50 % PBT/HS und reiner HS-Lösung gewaschen. Die Prähybridisierung mit 500 µl HS erfolgte für 1 - 6 h im Heizblock bei Hybridisierungstemperatur (55 - 57 °C). Die DIG-markierte RNA-Sonde wurde entsprechend ihrer Qualität in 100 µl HS verdünnt, für 5 min bei 100 °C im Wasserbad denaturiert und sofort auf die Embryonen gegeben, von welchen zuvor die HS-Lösung entfernt worden war. Die Inkubation erfolgte bei Hybridisierungstemperatur ü. N. im Heizblock.

Am nächsten Morgen wurden die Embryonen 3mal je 20 min in vorgewärmter HS-Lösung bei Hybridisierungstemperatur im Heizblock, sowie je 20 min in HS und 50 % HS/PBT bei RT gewaschen. Daran schlossen sich drei weitere Waschschritte von je 10 min in PBT an. Währenddessen wurden fixierte Wildtyp-Embryonen durch 3maliges Waschen in PBT rehydriert und für 1 h mit einer 1 : 100-Verdünnung des anti-DIG-AP-Antikörpers inkubiert.
Die gewaschenen Embryonen wurden für 2 h bei RT mit 150 µl einer 1 : 2 000-Verdünnung des präadsorbierten Antikörpers inkubiert. Nach anschließendem dreimaligen Waschen für je 10 min mit PBT wurden die Embryonen 1mal für 5 min sowie 2mal je 10 min in Färbepuffer gewaschen, bevor sie in 1 ml Färbepuffer in silikonisierte Blockschälchen überführt wurden. Die Färbereaktion wurde durch Zugabe von je 3,5 µl NBT und X-Phosphat gestartet und im Dunkeln entwickelt. Bei ausreichender Intensität wurde die Reaktion durch mehrmaliges Waschen in PBT abgestoppt. Die Embryonen wurden ü. N. in 70 % EtOH gelagert und am nächsten Tag 3mal je 20 min in 96 % EtOH entwässert, bevor sie in Epon eingebettet wurden.

4.3.5 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

(Lécuyer et al., 2008, modifiziert)

F-PBS-fixierte Embryonen wurden 3mal je 10 min in PBT rehydriert und anschließend für 20 min in 500 µl F-PBS refixiert. Nach drei je 5minütigen Waschschritten in PBT wurden sie für je 10 min in 50 % PBT/HS und reiner HS-Lösung gewaschen, danach erfolgte die Prähybridisierung in 500 µl HS-Lösung bei Hybridisierungstemperatur (55-57 °C) im Heizblock für 1 - 3 h. Die biotinylierte Sonde wurde entsprechend ihrer Qualität in 100 µl HS-Lösung verdünnt, 5 min bei 100 °C denaturiert und sofort danach auf die Embryonen gegeben. Die Inkubation erfolgte ü. N. bei Hybridisierungstemperatur im Heizblock.
Am nächsten Morgen wurden die Embryonen 3mal je 20 min in vorgewärmter HS-Lösung im Heizblock gewaschen, anschließend je 20 min in HS und 50 % HS/PBT bei RT. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurden die Embryonen nach drei weiteren Waschschritten (je 10 min in PBT) für 10 min in 1 % Milchpulver/PBT (MP/PBT) inkubiert, danach folgte die Inkubation mit Streptavidin-HRP (1 : 300 in PBT verdünnt) für 2 h bei RT. Nachdem 6mal je 10 min mit MP/PBT und 3mal je 5 min mit PBT gewaschen wurde, wurden die Embryonen mit einer 1 : 50-Verdünnung Fluorescein in Amplification Diluent inkubiert. Dies erfolgte für 2 h bei RT, dann wurden sie 6mal für je 10 min in PBT gewaschen und schließlich in Fluoromount-G™ eingebettet.

4.4 Methoden der Zellkultur

4.4.1 Kultivierung von *Drosophila* Schneider-Zellen (SL2)

Kulturmedium Schneider´s *Drosophila* Medium
10 % (v/v) fötales Kälberserum (durch 30 min bei 56 °C inaktiviert)
5 000 U/ml Penicillin und 5 000 µg/ml Streptomycin

SL2-Zellen sind semi-adhärente Suspensionszellen und wurden in 5 ml Kulturmedium in 25 cm^2-Kulturflaschen bei 25 °C ohne CO_2 kultiviert. Bei Erreichen von etwa 80 % Konfluenz wurden die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vollständig in

Lösung gebracht und die Kultur 1 : 5 verdünnt auf eine neue Kulturflasche gegeben. Dabei war darauf zu achten, dass mindestens 5 x 10^5 Zellen/ml ausgebracht wurden.

4.4.2 Transfektion von SL2-Zellen

(Transfectin, Bio-Rad)

Routinemäßig wurden SL2-Zellen mit DNA-Konstrukten transfiziert, um die ektopisch exprimierten Proteine nachzuweisen oder auf Interaktion zu untersuchen. Dafür wurden in Platten mit einem Durchmesser von 6 cm jeweils 5 ml Zellsuspension mit in einer Konzentration 3x10^5 Zellen/ml ausgesät. Um die Zellzahl einer Suspension zu bestimmen, wurden 10 µl einer 1 : 10-Verdünnung in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt, der Mittelwert aus vier Großquadraten entsprach dabei der Zellzahl mal 10^4/ml.
Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion der Zellen. Pro 6 cm-Platte wurden dafür 1 ml serumfreies Medium mit je 4 µg Plasmid-DNA und 10 µl Transfectin™ vermischt. Die Ansätze wurden für 20 min bei RT inkubiert, während die Zellen mit 4 ml frischem Kulturmedium überschichtet wurden. Nach Zugabe des Transfektionsansatzes wurden die Kulturschalen mit Parafilm abgedichtet und die Zellen für weitere 48 h inkubiert.

4.5 Präparation und Analyse von Proteinen

4.5.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

(Protein Assay, Bio-Rad Laboratories)

Mit der sogenannten Bradford-Methode kann die Konzentration einer Proteinlösung bestimmt werden. Dafür wurden 200 µl Bradfordreagenz mit 800 µl H_2O vermischt und zunächst eine Reihe von Standards erstellt, die zwischen 1 und 15 µg/ml BSA enthielten. Mit dem Färbereagenz ohne BSA als Referenz wurde die OD_{595} dieser Standardwerte bestimmt und eine Ausgleichsgerade erstellt. Nun wurden die Absorptionswerte von fünf unterschiedlichen Verdünnungen der Proteinlösung bestimmt und aus dem gemittelten Wert die Konzentration der Lösung abgeschätzt.

4.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

(Laemmli, 1970)

Sammelgel	130 mM Tris/HCl, pH 6,8 4 % (v/v) Acrylamid 0,1 % (v/v) SDS 0,1 % (v/v) APS 0,1 % (v/v) TEMED	**Trenngel**	380 mM Tris/HCl, pH 8,8 8-15 % (v/v) Acrylamid 0,1 % (v/v) SDS 0,14 % (v/v) APS 0,1 % (v/v) TEMED
Elektrophorese-puffer (10x)	500 mM Tris/HCl, pH 8,8 1,92 M Glycin 1,0 % (w/v) SDS	**Färbelösung**	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 0,05 % (w/v) Coomassie Brillant Blau

SDS-Proben-puffer (2x)	90 mM Tris/HCl pH 6,8 20 % (v/v) Glycerin 2 % (w/v) SDS 6 %(v/v) β-Mercaptoethanol 0,02 % (w/v) Bromphenolblau	**Entfärbelösung**	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure

Bei der vertikalen Gelelektrophorese werden Proteine in Polyacrylamidgelen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Nachdem das verwendete Reduktionsmittel β-Mercaptoethanol die Tertiär- bzw. Quartärstruktur der Proteine aufgelöst hat, führt SDS negative Ladungen in die Proteine ein, wodurch sie bei Anlegen einer elektrischen Spannung zum Pluspol wandern. Acrylamid polymerisiert zu netzartigen Strukturen aus, durch welche leichte Proteine schneller als schwere wandern, die Porengröße nimmt mit steigender Acrylamidkonzentration ab. Das Trenngel wurde nach dem Auspolymerisieren mit dem Sammelgel überschichtet, welches dazu diente, alle Proteinproben gleichförmig auszurichten. Vor dem Auftragen wurden diese mit 1 VT SDS-Probenpuffer versetzt und bei 100 °C für 5 min denaturiert. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 100 - 150 V für 1 - 2 h. Um die Proteine im Gel zu detektieren, wurde dieses ü. N. in Färbelösung geschwenkt. Mehrmaliges Waschen in Entfärbelösung eliminierte überschüssigen Farbstoff, wodurch Proteinbanden sichtbar wurden.

4.5.3 Western-Blot-Analyse

(ECL™ Western Blotting Analysis System, GE Healthcare, modifiziert)

Tankblot-Puffer	20 mM Tris/HCl, pH 8,0 150 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol	**TBS (Tris buffered saline)**	20 mM Tris/HCl pH 7,6 140 mM NaCl
TBST	0,1 % Tween®20 in 1 x TBS		

Bei der Tankblot-Methode werden Proteine mit einem besonders hohen Molekulargewicht aus dem Polyacrylamidgel heraus auf eine Nitrozellulosemembran gebracht und dort durch den Einsatz entsprechender Antikörper visualisiert. Nach dem Auftrennen der Proteine durch SDS-PAGE (siehe 4.5.2) wurde das Trenngel zunächst für 10 min in Tankblot-Puffer inkubiert. Zum Aufbau des Blots wurden die Kissen der Membranhalterung mit Tankblot-Puffer getränkt und ein mit Puffer getränktes Whatman-Papier daraufgelegt. Es folgte eine in H_2O aktivierte, ebenfalls mit Puffer getränkte Optitran-Membran, das Trenngel und ein weiteres Whatman-Papier. Nachdem dieser Aufbau in die Apparatur gestellt und mit Puffer befüllt worden war, erfolgte der Transfer ü. N. bei 30 V bzw. 80 mA.
Am nächsten Tag wurde das Trenngel mittels Coomassie-Färbung auf die Effizienz des Transfers überprüft, die Membran für 10 min in TBST gewaschen und anschließend zur Absättigung unspezifischer Bindungen in 5 % Magermilchpulver/TBST geblockt. Nach zwei 10minütigen Waschschritten in TBST erfolgte die Inkubation des primären Antikörpers in TBST mit maximal 5 % Magermilchpulver und 5 % Tween®20 ü. N. bei 4 °C. Es wurde viermal je 10 min in TBST gewaschen, bevor die Membran mit dem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper für 2 h bei RT inkubiert wurde. Nach vier weiteren je 10minütigen Waschschritten wurde die Membran für 1 min in einer Mischung aus je 500 µl Lösung A und B des ECL-Systems inkubiert. Die Peroxidasemoleküle setzten an dieser Stelle die Kompo-

nenten des Systems zu einem lichtemitierenden Komplex um, der durch Auflegen eines chemilumineszenz-sensitiven Films mit anschließendem Entwickeln sichtbar gemacht wurde.

4.5.4 Ponceau S-Färbung

Um die Effizienz des Proteintransfers zu überprüfen, wurde die Membran nach dem Tankblot (siehe 4.5.3) für 10 min in H_2O gespült und anschließend für 10 min in 0,1 % Ponceau S in 5 % Essigsäure gefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde durch Spülen in H_2O eliminiert, bis die Hintergrundfärbung entfernt war. Die Membran wurde dann für 10 min in TBST gewaschen, bevor mit dem Blocking-Schritt des Western-Blot-Protokolls fortgefahren wurde.

4.5.5 „Strippen" von Nitrozellulosemembranen

Stipping-Puffer: 100 mM Tris/HCl, pH 6,8
100 mM β-Mercaptoethanol,
2 % (w/v) SDS

Manche Experimente erforderten den Nachweis bestimmter Proteine auf einer einzigen Nitrozellulosemembran durch zwei unterschiedliche primäre Antikörper. Dafür wurde die Membran nach der ersten Detektion für 30 min bei 60 °C in Stripping-Puffer inkubiert, um alle Antikörpermoleküle abzulösen. Nach zwei 10minütigen Waschschritten in TBST wurde mit dem Blocking-Schritt des Western-Blot-Protokolls fortgefahren.

4.5.6 Ektopische Expression eines Fusionsproteins in *E. coli*

4.5.6.1 Test auf Expression des Proteins

Um die ektopische Expression eines Proteins in *E. coli* zu testen, wurde zunächst das Konstrukt, welches das entsprechende Protein kodierte, in Bakterienstämme transformiert, welche durch Zugabe von IPTG zur Expression des Proteins induziert werden konnten bzw. nicht induzierbar waren. Von beiden Stämmen wurde je eine Vorkultur angesetzt und am nächsten Morgen je 2mal 6 ml LB-Medium mit etwa 300 µl der Vorkultur angeimpft. War eine OD_{600} von 0,5 - 0,7 erreicht, erfolgte bei einer der beiden Kulturen die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG. Nach einer weiteren 2stündigen Inkubation wurden 2 ml der Bakterien für 5 min 5 000 UpM zentrifugiert und das Zellpellet in 1/10 VT PBS aufgenommen. 10 µl dieser Suspension wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

4.5.6.2 Aufreinigung ektopisch exprimierten Fusionsproteins aus *E. coli*

(The QIAexpressionist™, QIAGEN, modifiziert)

Lysispuffer (nativ) 300 mM NaCl
50 mM NaH_2PO_4
10 mM Imidazol, pH 8,0

Lysispuffer (denaturierend) 100 mM NaH_2PO_4
10 mM Tris/HCl
8 M Harnstoff, pH 8,0

Zur Untersuchung der Löslichkeit ektopisch exprimierter Fusionsproteine wurden diese unter nativen Bedingungen aufgereinigt. Dazu wurden 50 ml LB-Medium mit einer Übernachtkultur von Bakterienzellen angeimpft, die durch IPTG zur Expression des zu untersuchenden Proteins induzierbar waren. Nachdem diese Kultur eine OD_{600} von 0,5 - 0,7 erreicht hatte,

wurden die Zellen durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert, pelletiert (10 min bei 4 000 UpM und 4 °C) und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Zellpellet wurde auf Eis aufgetaut und in 5 ml Lysispuffer/g Pellet resuspendiert. Es wurde 1 mg/ml Lysozym zugegeben und die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert, bevor sie durch 6 je 10 s lange Ultraschall-Stöße bei 50 % Arbeitszyklus, die jeweils durch 10 s Pause getrennt waren, aufgeschlossen wurden. Dies erfolgte in einer 15 ml-Röhre, die während der Beschallung auf Eis gelagert wurde. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 30 min bei 10 000 UpM und 4 °C zum Abtrennen der Zelltrümmer und Membranfraktionen zentrifugiert. 5 µl des Überstands sowie das in SDS-Probenpuffer resuspendierte Pellet wurden mittels SDS-PAGE analysiert (4.5.2).

4.5.7 Aufreinigung eines Fusionsproteins mit His-Anhang per Ni-NTA-Agarose

(The QIAexpressionist™, QIAGEN, modifiziert)

Waschpuffer	50 mM NaH_2PO_4 300 mM NaCl 20 mM Imidazol, pH 8,0	**Elutionspuffer**	50 mM NaH_2PO_4 300 mM NaCl 250 mM Imidazol, pH 8,0

Um das gewünschte Fusionsprotein aus dem gewonnenen Zell-Lysat (siehe 4.5.6.2) zu reinigen, wurden 4 ml des Lysats mit 1 ml eines 50%igen Ni-NTA-Agarose-Gemischs versetzt und für 1 h bei leichtem Schwenken (200 UpM) und 4 °C inkubiert, damit sich der His-Anhang mit der Ni-Agarose verbinden konnte. Das Lysat-Agarose-Gemisch wurde auf eine Chromatographie-Säule geladen, deren Ausfluss durch eine Schlauchklemme regulierbar war. Es wurden sowohl dieser Durchfluss als auch beide Fraktionen zu je 4 ml Waschpuffer zur Analyse aufgefangen, um nicht durch die Waschschritte ausgelöste größere Mengen des gewünschten Proteins zu verlieren. Das Fusionsprotein wurde 4mal mit je 0,5 ml Elutionspuffer eluiert, bevor je 5 µl aller gesammelten Fraktionen per SDS-PAGE analysiert wurden. Die benutzte Ni-NTA-Agarose wurde anschließend durch je 3maliges Waschen in denaturierendem sowie nativem Lysispuffer regeneriert und in nativem Lysispuffer bei 4 °C aufbewahrt.

4.5.8 Dialyse

Um die hohe Imidazol-Konzentration des Elutionspuffers zu verringern, wurde das gereinigte Fusionsprotein in Lysispuffer dialysiert. Dazu wurde ein passendes Stück Dialyseschlauch zugeschnitten und dieser zum Quellen für 30 min in Aqua dest. gelegt. Anschließend wurde der Dialyseschlauch mit Aqua dest. gespült und dessen eines Ende mit einer Schlauchklemme verschlossen. Dieses System wurde zunächst mit etwas eingefülltem Puffer auf Dichte getestet, bevor das zu dialysierende Eluat eingefüllt und der Schlauch möglichst ohne Luftblasen mit einer weiteren Schlauchklemme verschlossen wurde. Die Dialyse erfolgte in einem 100fachen Volumen nativen Lysispuffers ü. N. bei 4 °C unter ständigem Rühren.

4.5.9 Spaltung von Fusionsproteinen mittels rekombinanter Enterokinase

(Recombinant Enterokinase Cleavage Capture Kit, Novagen)

Im benutzten pET-Vektorsystem war es möglich, die verschiedenen Anhänge des Fusionsproteins, welche für die bessere Löslichkeit oder zur Aufreinigung angefügt worden waren, per rEK (rekombinante Enterokinase) abzuspalten. Dafür musste zunächst die Aktivität der

rEK in einem analytischen Ansatz optimiert werden. 50 µg des Fusionsproteins wurden mit 1 U rEK in 1 x rEK Cleaveage/Capture Buffer bei RT inkubiert und je 10 µl dieses Ansatzes nach 2, 4, 8, 16 und 24h entnommen. Diese Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE auf den Fortschritt der Spaltung analysiert. Nachdem die optimale Inkubationsdauer bestimmt war, wurde die Reaktion im präparativen Maßstab wiederholt. Das Enzym und die abgespaltenen Proteinfragmente wurden anschließend durch Ultrafiltrations-Zentrifugation aus dem Proteingemisch entfernt. Das gereinigte Protein wurde zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt.

4.5.10 Aufreinigung von Immunseren mittels Protein-A-Sepharose

(Harlow and Lane, 1988, modifiziert)

Aus den erhaltenen Immunseren wurde zunächst die IgG-Fraktion durch Verwendung von Protein-A-Sepharose im Niedrigsalzbereich aufgereinigt. Dafür wurde 1 ml 50%igen Säulenmaterials mit 10 VT 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 vermischt und nach dem Absinken der Sepharose der Überstand entfernt. Dieser Vorgang wurde 2mal wiederholt und parallel dazu 1 ml Serum mit 1/10 VT 1 M Tris/HCl, pH 8,0 vermischt, um dessen pH-Wert zu optimieren. Das Säulenmaterial wurde in 1 ml 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 aufgenommen und mit dem vorbereiteten Serum vermischt. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 4 °C unter ständigem Schwenken, bevor die Mischung auf eine Chromatographie-Säule gegeben wurde, deren Ausfluss durch eine Schlauchklemme regulierbar war. Nach dem Auffangen des Durchflusses wurde mit je 10 VT 100 mM Tris/HCl, pH 8,0 und 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 gewaschen. Die Elution der gereinigten IgGs erfolgte 4mal mit je 500 µl 100 mM Glycin, pH 3,0. Das Eluat wurde dabei in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen aufgefangen, die bereits 50 µl 1 M Tris/HCl, pH 8,0 zur Neutralisation des pH-Werts enthielten. Die Fraktionen 2 bis 4 wurden anschließend in verschiedenen Konzentrationen für eine Antikörperfärbung nach der ABC-Methode (siehe 4.3.1) eingesetzt. Um die Sepharose zu regenerieren, wurde diese zunächst mit 2 M Urea und anschließend mit 100 mM Glycin, pH 2,5 gewaschen. Eine kurzzeitige Lagerung erfolgte in 100 mM Tris/HCl, pH 8,0, zur längeren Aufbewahrung wurde sie in 30 % EtOH überführt.

4.5.11 Aufreinigung von Immunseren mittels NHS-aktivierter Sepharose

(NHS-aktivierte Sepharose, 4 Fast Flow, GE Healthcare und Harlow and Lane, 1988, modifiziert)

Eine weitere Möglichkeit, Immunseren zu reinigen, stellte die Verwendung von NHS-aktivierter Sepharose dar. Dafür wurde zunächst das Proteinfragment, welches zur Immunisierung eingesetzt worden war, an die Sepharose gekoppelt. Dazu wurden 400 µl eines 50%igen Sepharose-Gemischs mit 5 ml 1 mM HCl vermischt und nach Absinken der Sepharose der Überstand entfernt. Es wurden 200 µl Protein (siehe 4.5.7) zugegeben und der pH-Wert des Gemischs kontrolliert. Dieser wurde bei Bedarf mit NaOH neutralisiert. Die Kopplung erfolgte für 2 h unter ständigem Schwenken bei RT, anschließend wurde mit je 1 ml 0,1 M Tris/HCl, pH 8,5 sowie 0,1 M NaAc in 0,5 M NaCl, pH 4,5 gewaschen. Das gekoppelte Säulenmaterial konnte in 20 % EtOH bei 4 °C gelagert werden. Für die eigentliche Reinigung des Serums wurde das Säulenmaterial auf eine Chromatographie-Säule gegeben und mit je 3 ml 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 100 mM Glycin, pH 2,5 und 10 mM Tris/HCl, pH 8,8 gewaschen. Hatte das Säulenmaterial den pH-Wert des letzten Puffers erreicht, wurde mit 3 ml

100 mM Trietholamin, pH 11,5 und mit 2 ml 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 gespült. War auch dieser pH-Wert erreicht, wurden 2,5 ml des Serums 1 : 10 verdünnt und 3mal nacheinander über die Säule geschickt. Das Säulenmaterial wurde mit je 6 ml 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 und 500 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 gewaschen und der gereinigte Antikörper anschließend mit 3 ml 100 mM Glycin, pH 2,5 eluiert. Das Eluat wurde in einer 15 ml-Röhre aufgefangen, die 300 µl 1 M Tris/HCl, pH 8,0 zur Neutralisation des pH-Werts enthielt. Die Säule wurde mit 2 ml 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 gewaschen und nach Erreichen dieses pH-Werts mit 3 ml 100 mM Trietholamin, pH 11,5 eluiert, um sowohl säure- als auch basisch-sensitive Interaktionen der gebundenen Antikörper zu zerstören. Auch diese Fraktion wurde zur Neutralisation in einer 15 ml-Röhre aufgefangen, die 300 µl 1 M Tris/HCl, pH 8,0 enthielt. Das Säulenmaterial wurde anschließend mit 2 ml 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 gewaschen und in 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 mit 0,1 % Natriumazid dauerhaft aufbewahrt.

4.5.12 Gewinnung von Proteinextrakten aus Embryonen

Lysis-Puffer:

50 mM Tris/HCl, pH 7,5	1,5 mM $MgCl_2$
125 mM NaCl	25 mM NaF
5 % Glycerin	1 mM Na_3VO_4
0,4 % NP40	1 mM EDTA
1 mM Dithioerythritol oder	Protease Inhibitor Tabletten
2 mM Dithiothreitol	(nach Angaben des Herstellers)

Um Proteinextrakte aus *D. melanogaster*-Embryonen zu gewinnen, wurden diese zunächst mit TNX in Stahldrahtnetze gespült, dechorionisiert (siehe 4.2.4) und mit PBT gewaschen. Nach Überführung in 1,5 ml-Reaktionsgefäße wurden sie mit 1 ml Lysispuffer/g Embryonen versetzt. Die Homogenisierung mittels Pistill erfolgte, wie die anschließende 20minütige Inkubation, auf Eis. Durch zweimalige Zentrifugation (je 20 min bei 13 000 UpM) wurden Zelltrümmer sedimentiert, der die Proteine enthaltende Überstand wurde bei -20 °C gelagert.

4.5.13 Gewinnung von Proteinextrakten aus SL2-Zellen

Lysis-Puffer:

1 % (w/w) Triton X-100 in PBS
1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid
1 mM Dithiothreitol
Protease Inhibitor Tabletten (nach Angaben des Herstellers)

Die Gewinnung von Proteinextrakten erfolgte aus Zellen, welche in 6 cm-Platten kultiviert worden waren. Dafür wurden die Zellen mittels Zellschaber von der Kulturschale abgelöst, in eine 15 ml-Röhre überführt und pelletiert (3 min bei 1 000 UpM und 4 °C). Das Zellpellet wurde in 25 µl Lysispuffer/ml Kultursuspension aufgenommen. Nach Überführung in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurden Zelltrümmer in einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min bei 13 000 UpM und 4 °C) sedimentiert. Der die Proteine enthaltende Überstand wurde in einem frischen 1,5 ml-Reaktionsgefäß bei -20 °C gelagert oder per SDS-PAGE analysiert.

4.5.14 Co-Immunopräzipitation

(EZview™ Red Anti-HA/-Myc Affinity Gel, Sigma-Aldrich)

Mit diesem Versuchsansatz wurde die Interaktion zweier Proteine analysiert. Dafür wurden zunächst SL2-Zellen mit DNA-Konstrukten transfiziert, welche die zu testenden Proteine kodierten (siehe 4.4.2). Anschließend wurde der Proteinextrakt dieser Zellen präpariert (4.5.13), wobei das Volumen des Lysispuffers bei 100 µl/ml Kultursuspension lag. Währenddessen wurden 30 µl einer Agarose-Matrix äquilibiert, welche durch Kopplung eines Antikörpers zur Bindung eines der beiden Proteine in der Lage war. Dazu wurde die Matrix 2mal in je 750 µl Lysispuffer gelöst, kurz gevortext und anschließend bei 10 000 UpM für 30 s zentrifugiert. Die Bindung des Antikörpers an extrahierte Proteine und eventuell damit verbundene Interaktionspartner erfolgte unter leichtem Schwenken für 2 bis 3 h bei 4 °C. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert (10 000 UpM, 30 s), die Matrix in weiteren 750 µl Lysispuffer resuspendiert und für 5 min bei 4 °C schwenkend inkubiert. Dieser Waschschritt wiederholte sich zwei Mal, bevor die Proteine in 50 µl 2 x SDS-Probenpuffer für 5 min bei 100 °C aufgekocht und per SDS-PAGE analysiert wurden.

5. Ergebnisse

5.1 Mhcl

5.1.1 Nachweis der *Mhcl*-mRNA in *D. melanogaster*-Embryonen

5.1.1.1 *Mhcl* besitzt keine maternale Komponente, eine Expression im ZNS kann zudem ausgeschlossen werden

Das Protein Mhcl (Myosin heavy chain like) wurde in einem globalen Hefe-zwei-Hybrid-Screen als möglicher Interaktionspartner für das Protein Rols7/Ants identifiziert (Kreisköther, Dissertation 2005, im Folgenden vereinfachend als Rols7 bezeichnet), welches für die Myogenese von *Drosophila melanogaster* essentiell ist (Chen and Olson, 2001, Menon and Chia, 2001, Rau et al., 2001). Im Rahmen einer früheren Arbeit wurde begonnen, das Gen *Mhcl* zu charakterisieren (Bonn, Diplomarbeit 2006). Dabei konnte die Verteilung der mRNA ab Stadium 10 im somatischen Mesoderm, sowie ab Stadium 11 im viszeralen Mesoderm gezeigt werden. Aufgrund der Morphologie der gefärbten Zellen wurde vermutet, dass die Expression auf die FCs der longitudinalen und zirkulären viszeralen Muskeln beschränkt ist, eine zusätzliche Verteilung des Transkripts in den Tracheen und deren Vorläuferzellen wurde nicht ausgeschlossen. Die mesodermale Expression blieb bis Stadium 14 bestehen, anschließend wurde lediglich eine Färbung in der Epidermis sowie dem Ösophagus beobachtet.

Da mehrere aktuelle Untersuchungen die Beteiligung filamentösen Aktins an der Muskelentwicklung von *D. melanogaster* belegen (Übersichtsartikel: Önel and Renkawitz-Pohl, 2009, Önel et al., 2010, Rochlin et al., 2010) und Myosine bei ganz unterschiedlichen Prozessen mit Aktin interagieren (aktuelle Übersichtsartikel: Kee et al., 2009, Nambiar et al., 2010, Woolner and Bement, 2009), erschien es sinnvoll, die Funktion von Mhcl hinsichtlich der embryonalen Myogenese zu untersuchen. Dafür wurde zunächst das Expressionsmuster des Gens mittels *in situ*-Hybridisierung an wildtypischen Embryonen genauer analysiert. Mit einer Sonde, die gegen die cDNA des Proteins erstellt wurde (GH15471, Abb. 5.5, Pfeil), wurde die Verteilung der mRNA während der myogeneserelevanten Stadien im somatischen und viszeralen Mesoderm sowie in der Epidermis und dem Ösophagus in späteren embryonalen Stadien verifiziert (Abb. 5.1 C, D, F, Pfeile SM, VM, E bzw. Ö). Obwohl RNA-Interferenz-Experimente die Beteiligung von Mhcl an der Entwicklung des ZNS (zentralen Nervensystem) vermuten lassen (Ivanov et al., 2004), kann die Expression in diesem Gewebe (Abb. 5.1 E, Pfeil) genauso wie die Bereitstellung der mRNA durch die Oozyte ausgeschlossen werden. Diese maternale Komponente wäre durch Transkript-Nachweis ab Stadium 1 zu erkennen (Abb. 5.1 A, B).

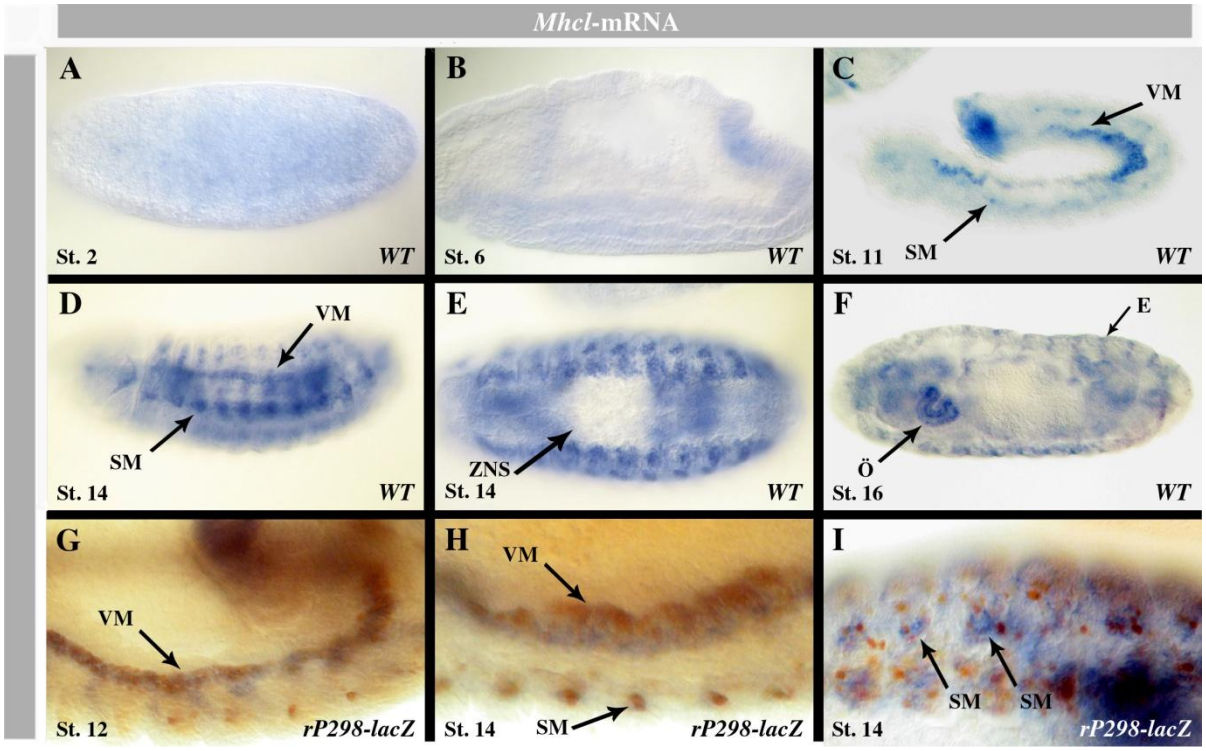

Abb. 5.1: Das Gen *Mhcl* zeigt eine spezifische Expression im somatischen und viszeralen Mesoderm während der Myoblastenfusionen, welche fast ausschließlich auf die FCs beschränkt ist
Aufgrund *in situ*-Hybridisierungen an wildtypischen Embryonen kann eine maternale Bereitstellung der mRNA ausgeschlossen werden, die Stadien 1 bis 8 zeigen allenfalls unspezifische Färbung (**A, B**). Während der myogeneserelevanten Stadien 11 bis 14 ist die mRNA im somatischen (SM) und viszeralen Mesoderm (VM) nachweisbar (**C, D**), wohingegen das zentrale Nervensystem keine Expression des Gens zeigt (**E**, ZNS). Ab Stadium 15 ist die Expression auf segmentale epidermale Streifen sowie den Ösophagus beschränkt (**F**, E bzw. Ö). *in situ*-Hybridisierung an *rP298-lacZ*-Embryonen, in welchen spezifisch die FCs nachweisbar sind (**G - I**), zeigen, dass die Verteilung der mRNA häufig (**H**, VM, SM), aber nicht immer (**G**, VM, **I**, SM) mit der anti-β-Galaktosidasefärbung übereinstimmt. Fast alle Embryonen sind hier und in den folgenden Abbildungen, soweit nicht anders angegeben, mit anterior nach links und dorsal nach oben ausgerichtet, das Stadium des Tieres sowie die Nachweismethode ist jeweils vermerkt. In **E**, **F** und **I** erfolgt der Blick von schräg ventral.

Aufgrund *in situ*-Hybridisierung an *btl-lacZ*-Embryonen, in welchen mittels anti-β-Galaktosidase-Antikörper spezifisch die Tracheen und deren Vorläuferzellen angefärbt werden (Klämbt et al., 1992), kann die Verteilung der *Mhcl*-mRNA in diesem Gewebe ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

5.1.1.2 Die *Mhcl*-Expression scheint auf die FCs beschränkt zu sein

Aufgrund der anscheinend ausschließlichen Lokalisation der mRNA in einer Zellreihe im frühen Rumpfmesoderm wurde postuliert, dass es sich bei *Mhcl* um ein FC-spezifisch exprimiertes Gen handeln könnte (Bonn, Diplomarbeit 2006). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden *in situ*-Hybridisierungen an *rP298-lacZ*-Embryonen durchgeführt, in welchen *β-Galaktosidase* spezifisch in den Kernen der FCs exprimiert wird (Nose et al., 1998). Hierbei wurde deutlich, dass das *Mhcl*-Transkript im viszeralen wie auch im somatischen Mesoderm (VM bzw. SM) sehr häufig in Zellen mit β-Galaktosidase-positiven

Kernen lokalisiert (Abb. 5.1 H, Pfeile), was vermehrt in Stadium 10 bis 12 beobachtet werden kann. Hauptsächlich in Stadium 13 und 14 ist die mRNA auch in anderen Zellen nachweisbar (Abb. 5.1 G, I, Pfeile). Da sich diese Zellen in direkter Nachbarschaft zu den FCs befinden und die Expression in den Tracheen bereits ausgeschlossen wurde, handelt es sich hierbei mit sehr großer Wahrscheinlichkeit um FCMs. Es scheint zudem, als lokalisiere das Transkript entweder an den Kontaktstellen von FCs und FCMs (Abb. 5.1 I) oder an deren Zellmembranen. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass die mRNA auf Seiten der FCs detektiert wird, welche als solche nicht zu erkennen sind, beispielsweise weil der β-Galaktosidase-Nachweis zufällig nicht geklappt hat oder die Morphologie der Zellen den Anschein vermittelt, es handele sich hierbei um FCMs.

in situ-Hybridisierungen an *Notch*-nullmutanten Embryonen zeigen eine verbreiterte *Mhcl*-Expressionsdomäne (Abb. 5.2, vgl A - C mit D - F, Pfeile). Dies unterstützt die Theorie, *Mhcl* sei ausschließlich in den FCs exprimiert, die in diesen Embryonen vermehrt gebildet werden (Baker and Schubiger, 1996).

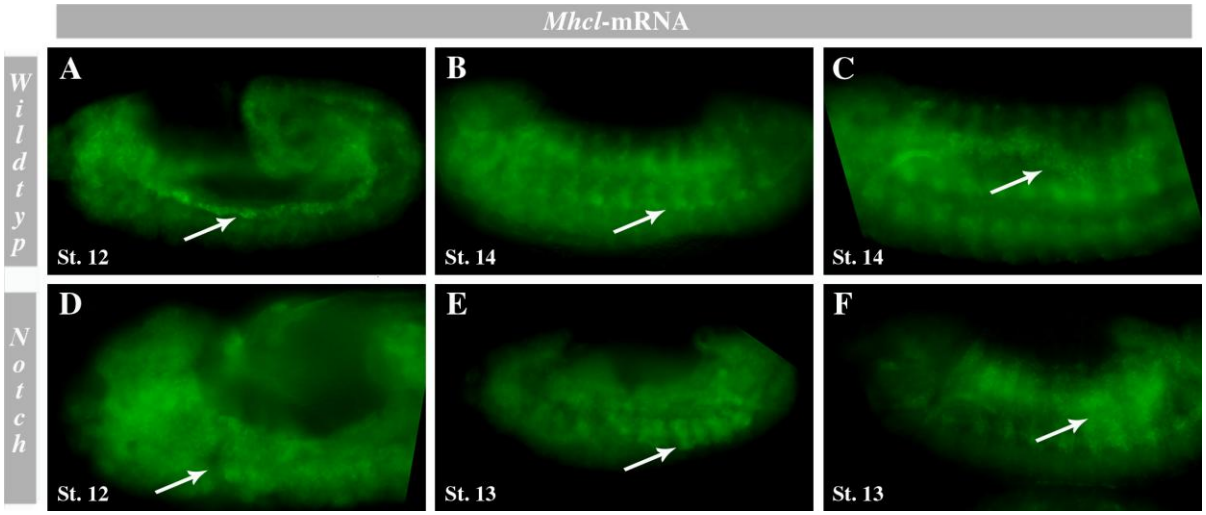

Abb. 5.2: *Notch*-nullmutante Embryonen weisen ein verbreitertes *Mhcl*-Expressionsmuster auf
in situ-Hybridisierungen an Embryonen, die aufgrund des Verlusts von Notch mehr FCs spezifizieren, zeigen im Vergleich zu wildtypischen Embryonen eine deutlich verbreiterte *Mhcl*-Expressionsdomäne (vgl. **A - C** mit **D - F**, Pfeile).

Im Gegensatz dazu bilden Embryonen des bisher uncharakterisierten EMS-Allels lmd^{E202} vermutlich eine geringere Menge oder eine nicht voll funktionsfähige Version des Transkriptionsfaktors. Diese Linie ist allelisch zu bekannten *lmd*-mutanten Fliegenstämmen, der mesodermale Phänotyp aber deutlich schwächer ausgeprägt (A. Holz, unpubliziert, Duan et al., 2001). Hier wird in Stadium 14 eine verringerte somatische Expressionsmenge detektiert (Abb. 5.3 D, SM), was auf die verminderte Muskelbildung und die Expression in den verkürzten Muskeln bzw. unfusionierten FCs zurückzuführen sein könnte. Im viszeralen Meso-

derm hingegen kann eine Verbreiterung und Intensivierung des *Mhcl*-Expressionsmusters beobachtet werden (vgl. Abb. 5.3 E mit B, VM), was allerdings auch durch Störungen der Darmbildung bedingt sein könnte. Embryonen des lmd^{A388}-Allels bilden keine synzytiale Darmmuskulatur (Ruiz-Gómez et al., 2002), eine detaillierte Analyse dieses Gewebes ist nicht publiziert. Die hier beobachtete Änderung der Transkriptverteilung weist aber auf Beeinträchtigungen in diesem Gewebe mit unterschiedlicher Auswirkung auf das somatische und viszerale Mesoderm hin (siehe 6.1.1). Die ektopische Expression einer dominant-negativen Version des EGF-Rezeptors im Mesoderm führt wie erwartet zu keiner auffälligen Veränderung des *Mhcl*-Expressionsmusters (Abb. 5.3 A, F), da in diesen Embryonen nur die Bildung weniger mesodermaler Gruppen beeinträchtig ist (Carmena et al., 1998). Eine veränderte *Mhcl*-mRNA-Verteilung wäre dann gegebenenfalls nur mittels spezifischer Marker identifizierbar.

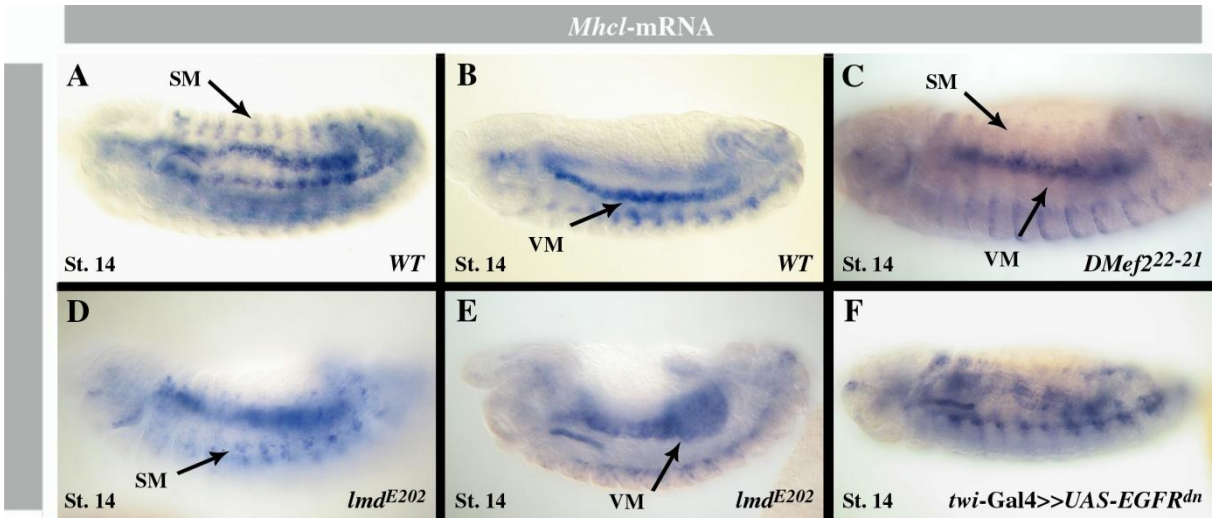

Abb. 5.3: Die Expression von *Mhcl* ist im somatischen Mesoderm von DMef2 abhängig, in lmd^{E202}-mutanten Embryonen wird mehr Transkript im viszeralen Mesoderm detektiert
In $DMef2^{22-21}$-Embryonen (**C**) ist, im Vergleich zu wildtypischen Embryonen (**A, B**), eine stark reduzierte *Mhcl*-Transkriptmenge im somatischen Mesoderm (SM) zu beobachten, die Expression im viszeralen Mesoderm (VM) erscheint unverändert. In lmd^{E202}-Embryonen erscheint die somatische Expression ebenfalls verringert (**D**, SM), im viszeralen Mesoderm fällt eine breitere mRNA-Verteilung auf (vgl. **B** mit **E**, VM). Embryonen, die eine dominant-negative Variante des EGF-Rezeptors ektopisch im Mesoderm exprimieren, zeigen kein verändertes mRNA-Muster (**F**).

5.1.1.3 Die *Mhcl*-Expression ist im somatischen Mesoderm von DMef2 abhängig

Der Transkriptionsfaktor DMef2 ist in allen Muskeltypen und deren Vorläufergeweben detektierbar, wo er die Expression vieler Gene reguliert, die für die Myogenese essentiell sind (Junion et al., 2005, Sandmann et al., 2006). Embryonen der amorphen Linie $DMef2^{22-21}$ zeigen eine verminderte *Mhcl*-Expression im somatischen Mesoderm (vgl. Abb. 5.3 A mit C, SM), im viszeralen Mesoderm hingegen erscheint die Transkriptmenge wildtypisch (Abb. 5.3 C, SM). Diese Daten sprechen, zumindest im somatischen Mesoderm, für eine Regulation des

Gens durch DMef2. In Chromatin-Co-Immunopräzipitations-Experimenten wurde *Mhcl* ebenfalls als Zielgen von DMef2 identifiziert, allerdings nur mit einer Wahrscheinlichkeit, die unterhalb des als signifikant anzusehenden Schwellenwertes lag (Sandmann et al., 2006).

5.1.1.4 Die *Mhcl*-Expression in Embryonen, welche eine Mutation in fusionsrelevanten Genen tragen, erscheint wildtypisch

Die mesodermspezifische Expression von *Mhcl*, die im somatischen Mesoderm von DMef2 reguliert wird, lässt vermuten, dass das Protein mit einem der für die Fusion essentiellen Proteine direkt oder indirekt interagiert. Dies könnte, wie auch eine erfolgreiche Zelladhäsion, sowohl auf die *Mhcl*-Transkription als auch auf die Lokalisation der mRNA Einfluss haben. Um diese Hypothese zu klären, wurden *in situ*-Hybridisierungen an verschiedenen Embryonen durchgeführt, welche keine funktionalen, für die erste oder zweite Fusionsphase essentiellen, Proteine mehr bilden können. Es wurden Embryonen der *duf/kirre, rst/irreC*-Deletionslinie *Df(1)67k30* und der *sns*-Nullmutation $sns^{20\text{-}23}$ analysiert, sowie Embryonen der *rols7*-Deletion *Df(3L)BK9* und der *kette/Hem*-Nullmutationslinie $kette^{J4\text{-}48}$, außerdem Embryonen der Linie $blow^{2}$, welche aufgrund einer EMS-induzierten Deletion kein funktionales Protein bilden (Sickmann, Dissertation 2010). Der putative Interaktionspartner Rols7 war hierbei von besonderem Interesse.

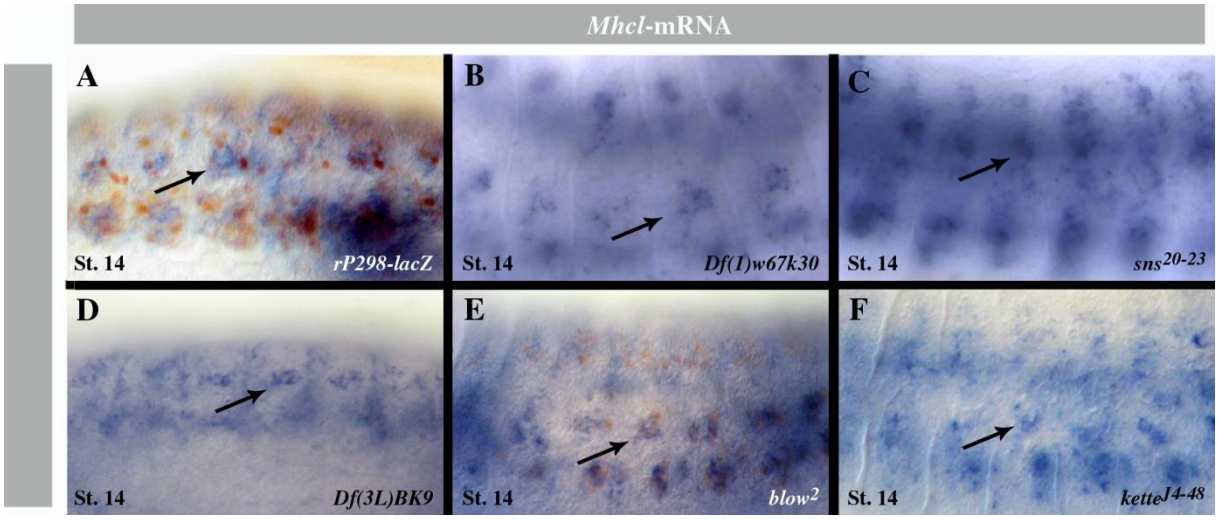

Abb. 5.4: Die Verteilung der *Mhcl*-mRNA wird durch den Funktionsverlust verschiedener Gene, die essentiell für die Myogenese sind, nicht beeinträchtigt
in situ-Hybridisierungen an mutanten Embryonen für *duf/kirre, rst/irreC* (**B**), *sns* (**C**), *rols7* (**D**), *blow* (**E**) oder *kette/Hem* (**F**) zeigen das gleiche *Mhcl*-Lokalisationsmuster wie in wildtypischen Embryonen (**A**). Es kann jeweils eine charakteristische Verteilung des Transkripts an distinkten Stellen, die wahrscheinlich den FC-FCM-Kontakt repräsentieren, detektiert werden (Pfeile). In **A** und **D** erfolgt der Blick auf die Embryonen von schräg ventral.

Obwohl teilweise mehr unspezifische Färbeergebnisse zu beobachten waren, konnte in allen Fällen eine wildtypische Verteilung des *Mhcl*-Transkripts beobachtet werden, auch wenn

nicht genauer untersucht wurde, ob die Transkriptmenge in FCs oder FCMs variierte. Hierbei fiel vor allem die charakteristische Lokalisation der mRNA an den Kontaktstellen zwischen FC und FCMs oder deren Zellmembranen auf (vgl. Abb. 5.4 B - F mit A, Pfeile). Besonders deutlich wurde dies bei den *blow*^{2}-Embryonen, die zusätzlich den schon beschriebenen FC-Marker *rP298-lacZ* enthalten (Abb. 5.4 E). In allen bisher analysierten mutanten Fliegenlinien finden zumindest zufällige Kontakte zwischen FCs und FCMs statt (D. Buttgereit, persönliche Mitteilung).

Es wurde gezeigt, dass die *Mhcl*-mRNA nicht maternal zur Verfügung gestellt wird, vielmehr ist die zygotische Expression spezifisch zum Zeitpunkt der Myoblastenfusionen im somatischen und viszeralen Mesoderm, wahrscheinlich ausschließlich in den FCs, nachweisbar. Zumindest im somatischen Mesoderm scheint eine Regulation durch DMef2 zu bestehen, was für Duf/Kirre, Rst/IrreC, Sns, Rols7, Blow oder Kette/Hem nicht der Fall ist. Diese Proteine nehmen auch keinen Einfluss auf die Lokalisation des Transkripts.

5.1.2 Die Analyse einer erzeugten *Mhcl*-defizienten Fligenlinie legte in allen analysierten Geweben keine Auffälligkeiten offen

5.1.2.1 Die Expression von *Mhcl* wird weder von einem 85 bp stromaufwärts des vorhergesagten Leserahmens inserierten P-Elements noch durch dessen unpräzise Entfernung gestört

Um die mögliche Funktion von Mhcl während der larvalen Myogenese zu charakterisieren, sollten Embryonen analysiert werden, die kein funktionales Mhcl-Protein bilden. Dafür wurde zunächst die vitale Linie *EY00454* untersucht, in welcher das P-Element P{EPgy2} etwa 100 bp stromaufwärts des postulierten START-Codons im putativen Promotor- oder 5´-UTR (UnTranslated Region)-Bereich (siehe 5.1.6) inseriert ist (Abb. 5.5, Flybase). In diesen Embryonen ist das *Mhcl*-Transkriptionsmuster nicht gestört (Abb. 5.6 A), zudem etablieren sie ein wildtypisches Muskelmuster (Abb. 5.6 B, Bonn, Diplomarbeit 2006). Da aber zu erwarten ist, dass eine Insertion an dieser Stelle die Bildung der mRNA und somit des Proteins behindert, sollte sich dies auch auf die larvale Muskulatur auswirken, falls Mhcl wie angenommen essentiell für deren Bildung ist. Deshalb wurde zunächst die Insertionsstelle mittels PCR an genomischer DNA dieser Fliegenlinie überprüft. Die Primer wurden so gewählt, dass einer im zweiten Exon des Gens in Richtung des P-Elements bindet (Primer 4) und drei innerhalb des P-Elements, davon zwei am 3´-Ende (Primer 2 und 3) und einer am 5´-Ende (Primer 1, Abb. 5.6 C). Die erzielten Amplifikate entsprachen in Auftreten und Größe jeweils den postulierten Daten (Abb. 5.6 I), die Sequenzierung eines dieser PCR-Produkte ergab die Insertion des P-Elements 85 bp stromaufwärts des vorhergesagten ATGs.

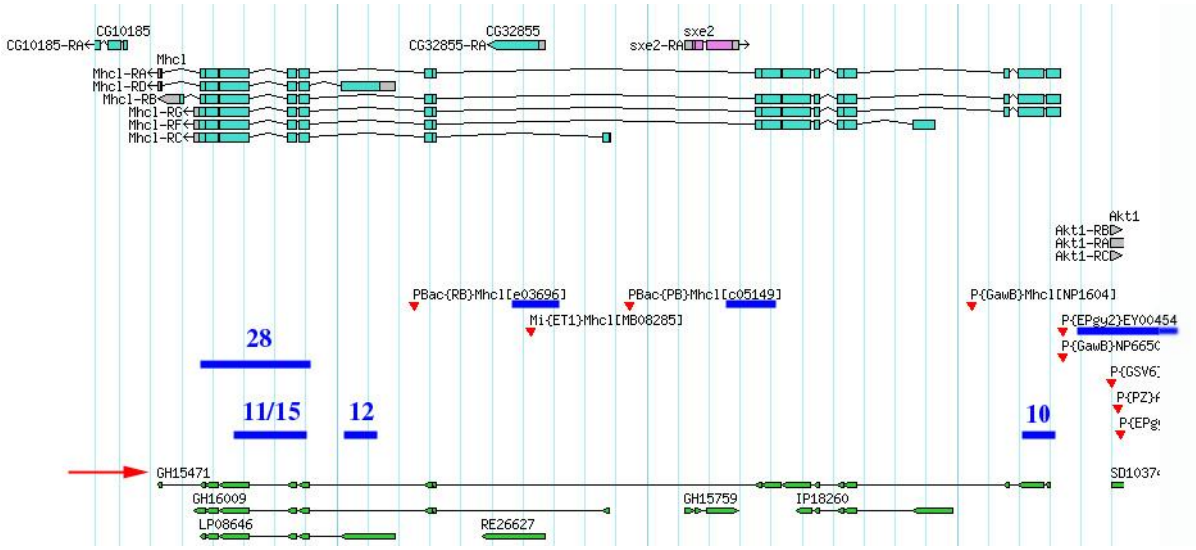

Abb. 5.5: Schematische Darstellung des genomischen Bereichs von *Mhcl*
Aktuell werden sechs Isoformen des Gens postuliert (*RA - RD, RF - RG*), im Intronbereich befinden sich die codierenden Sequenzen für die Gene *CG32855* und *sxe2*. Stromaufwärts von *Mhcl* liegt das Gen *Akt1*, stromabwärts *CG10185*. Es sind die zur Verfügung stehenden cDNAs vermerkt, in dieser Arbeit wurde ausschließlich GH15471 (Pfeil) verwendet. Die blauen Markierungen verweisen auf die analysierten Fliegenlinien *EY00454*, *e03696* und *c05149* sowie klonierte Bereiche des Gens (pBB10 bis 12, sowie 15 und 28, siehe 5.1.4 und 5.1.6) (verändert nach Flybase).

Das zugrunde liegende P-Element P{EPgy2} zeichnet sich durch eine interne UAS-Sequenz, gefolgt von einem Promotor, aus (Abb. 5.6 C´), weshalb diese Fliegenlinie benutzt werden kann, um *Mhcl* mit Hilfe eines entsprechenden GAL4-Treiberstamms ektopisch zu exprimieren. Bei Verwendung der *wg*-GAL4-Linie ist das ektopische *Mhcl*-Transkript mittels *in situ*-Hybridisierung in den charakteristischen epidermalen *wg*-Streifen detektierbar (Abb. 5.6 C, Pfeil). Dass diese mRNA in ektopisches Protein translatiert wird, wird aufgrund Immunhistologie gegen Mhcl (siehe 5.1.3) deutlich (Abb. 5.6 F, Pfeil). Die ektopische Expression des Proteins im Mesoderm mittels *DMef2*-GAL4 bzw. *twi*-GAL4 führt zu keiner Änderung des somatischen Muskelmusters oder Beeinträchtigung der Vitalität der Fliegen (Abb. 5.6 E bzw. Daten nicht gezeigt). Das P-Element kann mit Hilfe einer Transposase mobilisiert werden, weshalb versucht wurde, durch unpräzises Entfernen des P-Elements Teile des 5´-Bereichs von *Mhcl* zu zerstören, und so die Bildung funktionalen Proteins zu verhindern. Es wurden 139 potenziell mutante Linien etabliert, davon waren 44 letal. Zwei dieser letalen Linien, 101.2 und 119.1, werden von der Deletion *Df(3R)Exel7328*, die *Mhcl* und 16 weitere Gene, darunter auch *Akt1* entfernt, nicht komplementiert. Die Analyse dieser beiden zueinander allelischen Linien ergab keine Änderung des somatischen Muskelmusters und der Darmmorphologie, aber auch nicht der *Mhcl*-Transkription (Abb. 5.6 G, H). Dass diese nicht wie vermutet *Mhcl*-mutante, sondern *Akt1*-mutante Fliegenlinien darstellten, wurde durch

Komplementationskreuzungen gegen bekannte P-Element-Insertionslinien des Nachbargens (*Akt1*^{04226} bzw. *Akt1*^{EY10012}, Daten nicht gezeigt) ersichtlich.

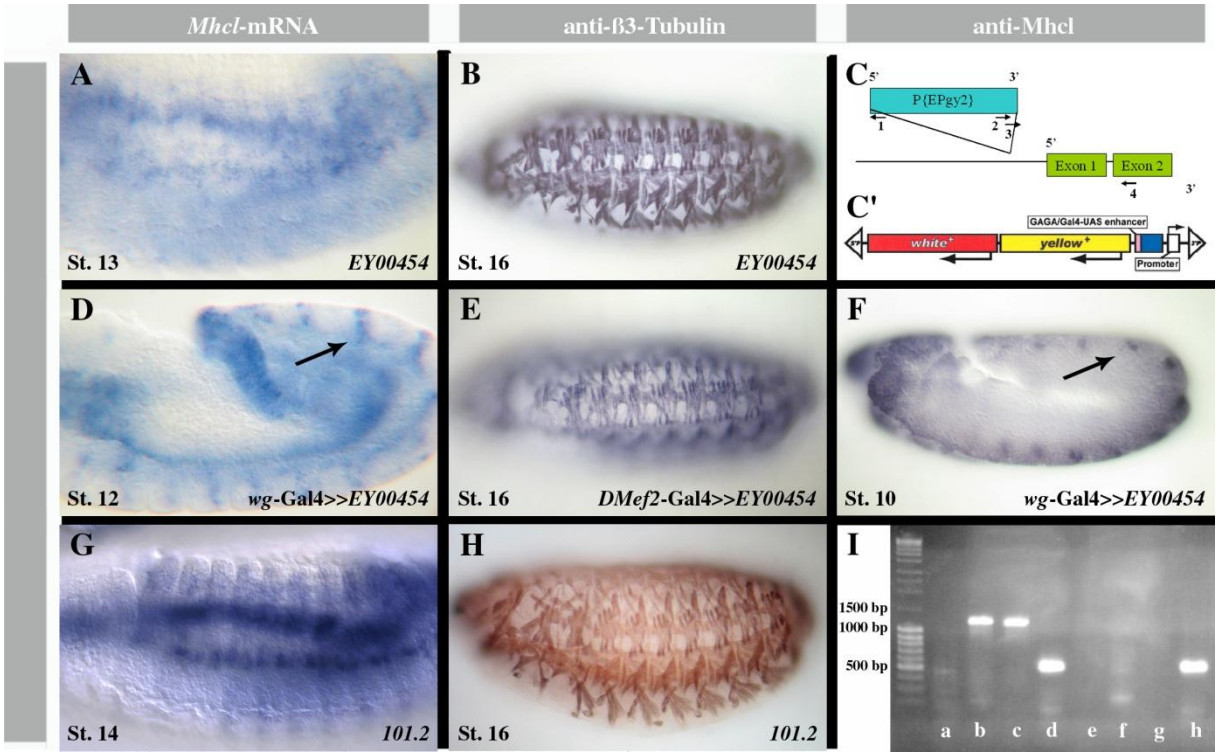

Abb. 5.6: Das *Mhcl*-Expressionsmuster wird weder von der Insertion des P-Elements *EY00454* noch von dessem unpräzisen Entfernen gestört
Sowohl die Verteilung des *Mhcl*-Transkriptes (**A**) als auch das somatische Muskelmuster (**B**) erscheinen in der P-Element-Insertionslinie *EY00454* wildtypisch. Anhand der postulierten Insertionsrichtung und –position wurden PCR-Analysen an genomischer DNA dieser Linie durchgeführt (**C**, verwendete Primer 1: Plac1, 2: Pry2, 3: EY.3F, 4: oBB10 welcher etwa 1050 bp stromabwärts des vorhergesagten ATGs bindet). Die erzielten Amplifikate entsprachen der Erwartung (**I**, a - d: genomische DNA aus *EY00454*, e - h: genomische DNA aus wildtypischen Embryonen, a und e Primer 1 + 4, b und f Primer 2 + 4, c und g Primer 3 + 4, d und h Primer B3 aa 23 und B3 aa 140, die als Positivkontrolle einen 490 bp großen Bereich des *ß3-Tubulin*-Gens amplifizierten). Durch die integrierte UAS-Sequenz mit folgendem Promotor (**C´**) kann *EY00454* benutzt werden, um *Mhcl* ektopisch zu exprimieren. Dies ist sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene nachweisbar (**D**, **F**, Pfeile). Die ektopische Expression im Mesoderm hat keinen Einfluss auf die somatische Muskulatur (**E**). Das unpräzise Entfernen von *EY00454* zerstört die *Mhcl*-Expression sowie das wildtypische Muskelmuster nicht (**G**, **H**).

5.1.2.2 Die Analyse einer mittels FLP/FRT-Systems generierten Deletion von *Mhcl* zeigte in allen untersuchten Geweben keine Auffälligkeiten

Da der Versuch, durch unpräzises Entfernen eines P-Elements eine *Mhcl*-Mutation zu erzeugen, nicht erfolgreich war (siehe 5.1.2.1), wurde im Rahmen einer angegliederten Bachelorarbeit mittels FLP/FRT-basierter Rekombination eine kleine Deletion erzeugt, die neben *Mhcl* die Gene *Akt1*, *sxe2*, *msps*, *CG32855* sowie *CG10185* entfernt (Abb. 5.7 A). Über eine mögliche Funktion von CG10185 ist bisher noch nichts bekannt, das Protein bildet wahrscheinlich vier WD40-Domänen aus. Andere Proteine, welche diese Domänen enthalten,

sind beispielsweise in die Transkriptionsregulation oder Apoptose involviert. CG32855 ist ein extrem basisches Protein ohne spezifische Domänen, das Protein Msps (Mini spindles) ist u. a. an der Elongation der mitotischen Spindeln und an der Organisation der Mikrotubuli beteiligt. Sxe2 (Sex specific enzyme 2) agiert wahrscheinlich als Phospholipase. Akt1 schließlich ist eine Proteinkinase, die an sehr vielfältigen regulatorischen Prozessen beteiligt ist, z. B. während der Entwicklung im Allgemeinen, der Apoptose oder der Neurogenese (alle Daten nach Flybase). In einer ersten Analyse wurden die erfolgreiche Rekombination in einigen der etablierten 102 letalen Linien per PCR verifiziert sowie in diesen Embryonen leichte Anheftungsdefekte postuliert (Daum, Bachelorarbeit 2008).

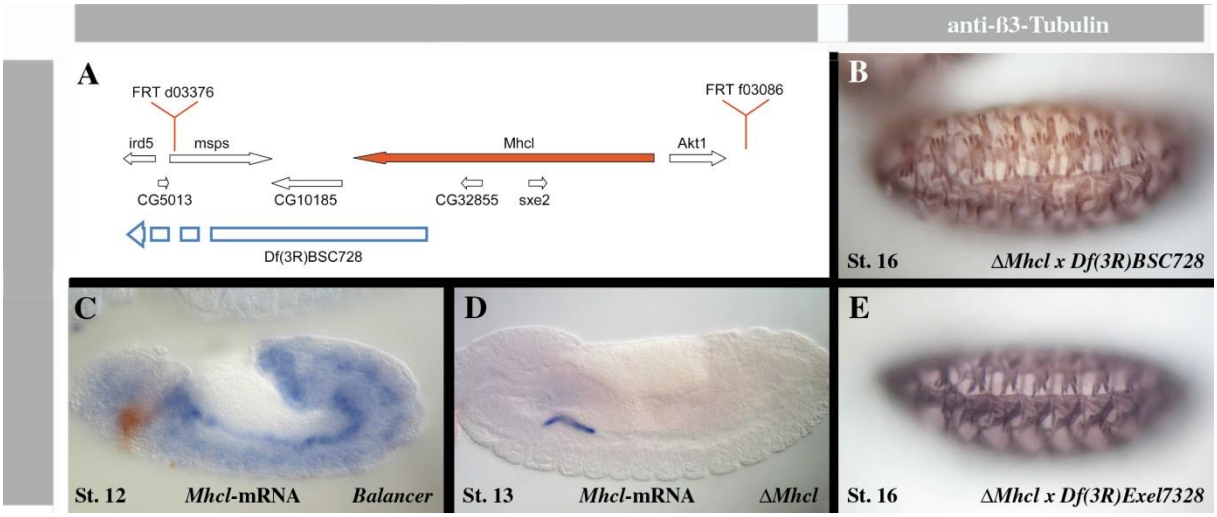

Abb. 5.7: Die Herstellung einer *Mhcl*-defizienten Fliegenlinie (*ΔMhcl*) war erfolgreich
Das Schema zeigt den genomischen Bereich, der bei Rekombination der beiden FRT-Elemente *d03376* und *f03086* entfernt wurde (**A**). Zusätzlich ist die Lage der verwendeten Defizienz *Df(3R)BSC728* vermerkt, die sich noch weitere 150 kb in Richtung des blauen Pfeils erstreckt. *in situ*-Hybridisierungen beweisen, dass *ΔMhcl*-Embryonen das Gen nicht mehr exprimieren (**C**, **D**). Transheterozygote Embryonen aus *ΔMhcl* und *Df(3R)BSC728* (**A**) bzw. *Df(3R)Exel7328*, in welcher ein 148 kb großer Bereich deletiert ist, der auch *ΔMhcl* beinhaltet, zeigen bei Analyse mit dem anti-β3-Tubulin-Antikörper ein wildtypisches Muskelmuster (**B**, **E**).

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst zehn zufällig ausgewählte Linien untersucht und, nachdem keine Unterschiede zu erkennen waren, ausschließlich die Linie B8.3 verwendet, welche in *ΔMhcl* umbenannt wurde. Per *in situ*-Hybridisierung gegen *Mhcl* wurde verifiziert, dass homozygote *ΔMhcl*-Embryonen, erkennbar an der fehlenden Balancer-Färbung (braun), kein Transkript mehr bilden (Abb. 5.7 C, D). Anschließend wurde mit Hilfe des anti-β3-Tubulin-Antikörpers das somatische Muskelmuster dieser *ΔMhcl*-Embryonen analysiert. Diese Embryonen lassen weder im dorsalen (Abb. 5.8 A, D, Pfeile markieren das Herz) noch im lateralen oder ventralen Bereich (Abb. 5.8 B, E) Störungen erkennen. Gleiches gilt für transheterozygote Embryonen aus *ΔMhcl* und *Df(3R)Exel7328*, in welchen der gesamte, in *ΔMhcl* deletierte Bereich, entfernt ist (Abb. 5.7 E).

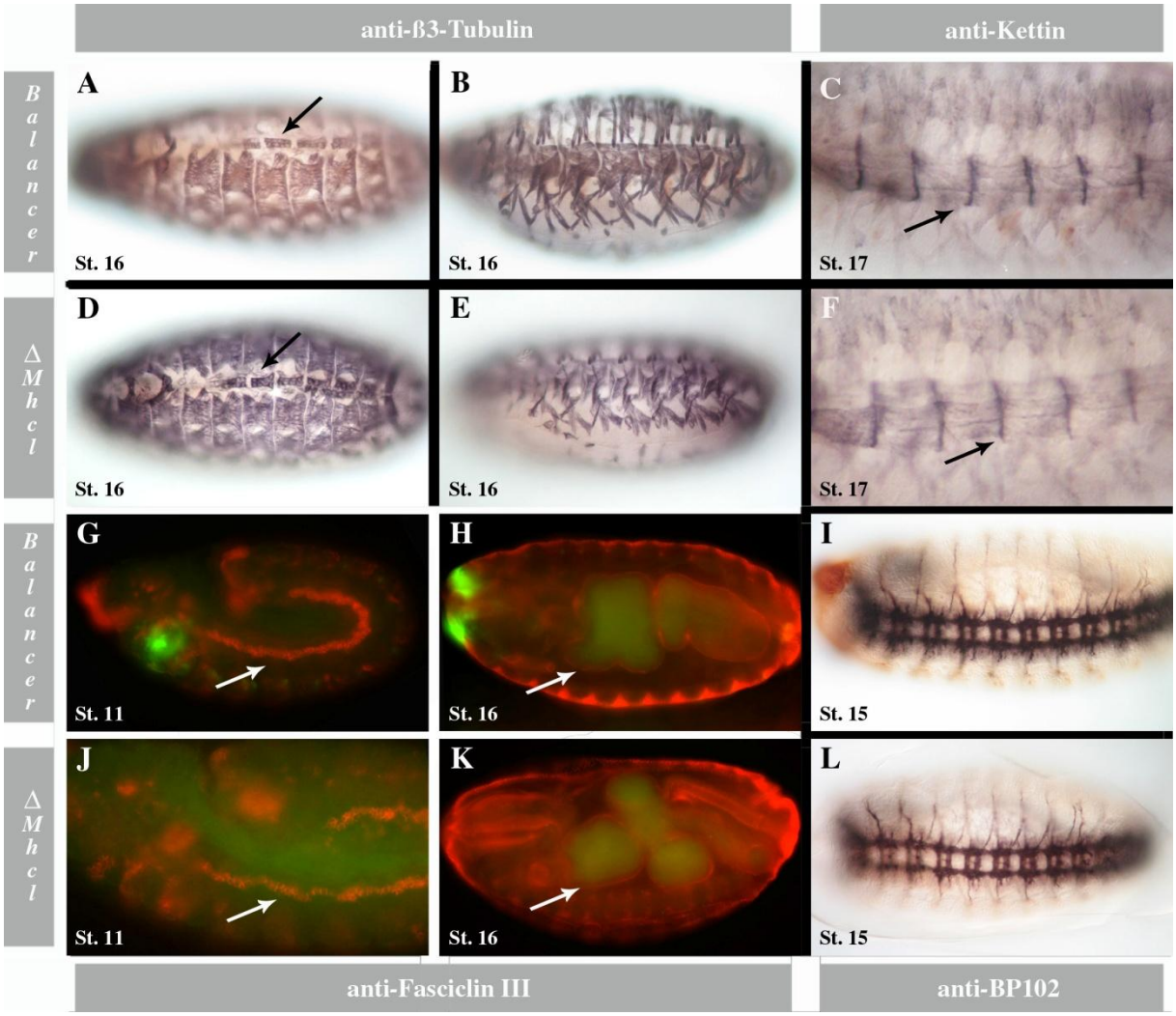

Abb. 5.8: Die Analyse diverser Gewebe in *ΔMhcl*-Embryonen legte keine Störungen offen Homozygote *ΔMhcl*-Embryonen (**D - F**, **J - L**) wurden mit wildtypischen Embryonen (**A - C**, **G - I**) verglichen. Dabei legte die Immunhistologie in keinen untersuchten embryonalen Stadien und Geweben (**A, B, D, E** somatisches Mesoderm mit Herz, Pfeile, **C, F** epidermale Muskelanheftungsstellen, Pfeile, **G, H, J, K** viszerales Mesoderm, Pfeile, **I, L** ZNS) Unterschiede offen. In **A** und **D** erfolgt der Blick auf die Embryonen von schräg dorsal, in **B**, **E**, **I** und **L** von schräg ventral.

Um herauszufinden, auf welcher Störung die Letalität dieser Fliegenlinie beruht, wurden weitere embryonale Gewebe immunhistologisch untersucht. Allerdings waren weder im viszeralen Mesoderm und den sich daraus bildenden Darmkonstriktionen (anti-Fasciclin III-Antikörper, Abb. 5.8 G, H, J, K Pfeile) noch in der Bildung des ZNS (anti-BP102-Antikörper, Abb. 5.8 I, L) Unregelmäßigkeiten zu erkennen. Auch die Anheftung der larvalen Muskulatur an die Epidermis (anti-Kettin-Antikörper, Abb. 5.8 C, F, Pfeile) erfolgt in diesen Embryonen wildtypisch. Mit diesem Nachweis sollten eigentlich die sich bildenen Sarkomere detektiert werden können (siehe 2.2.4), was allerdings auch in wildtypischen Embryonen, welche sich phänotypisch schon als Larve verhalten, nicht beobachtet werden kann. Anhand der Ergebnisse der unpräzisen Entfernung des P-Elements (siehe 5.1.2.1) lag die Vermutung nahe, die Letalität von *ΔMhcl* könnte auf das Fehlen von *Akt1* zurückzuführen sein. Deswegen

wurden transheterozygote Embryonen aus *ΔMhcl* und *Df(3R)BSC728* analysiert, in welchen die Expression von *Akt1* noch gewährleistet ist, der in allen Isoformen enthaltene C-Terminus von *Mhcl* aber deletiert wird (Abb. 5.7 A). Diese Einschränkung der Deletion kann die Vitalität nicht wiederherstellen, wie erwartet sind auch hier keine Auffälligkeiten im somatischen Mesoderm (anti-β3-Tubulin-Antikörper, Abb. 5.7 B) sowie an der epidermalen Anheftung der Muskeln zu erkennen (anti-Kettin-Antikörper, Daten nicht gezeigt).

Es bestand die Möglichkeit der larvalen Letalität der *ΔMhcl*-Linie, sodass aus diesem Grund keine embryonalen Störungen sichtbar werden. Um dies zu klären, wurde der Fliegenstamm über ein fluoreszenzmarkiertes Balancerchromosom gebracht und die sich entwickelnden Larven analysiert. Homozygote *ΔMhcl*-Larven, erkennbar an der fehlenden Fluoreszenz, treten zwar auf, sterben aber beim Übergang vom ersten zum zweiten Larvenstadium oder kurz darauf.

Die P-Insertion *EY00454* hat keine Auswirkungen auf die Verteilung des *Mhcl*-Transkripts sowie auf das Muskelmuster, was aufgrund der Insertion 85 bp stromaufwärts des postulierten ATGs überrascht. Durch unpräzises Entfernen dieses P-Elements konnte keine *Mhcl*-mutante Fliegenlinie generiert werden, die Letalität der entstandenen Linien lässt sich nicht auf Störungen der Muskulatur zurückführen. Die durch FRT/FLP-basierte Rekombination erzeugte Fliegenlinie *ΔMhcl* ist larval letal, was aber nicht auf die Deletion von *Akt1* zurückzuführen ist. Es konnte nicht geklärt werden, auf welcher Störung die Letalität beruht, da *ΔMhcl*-Embryonen in keinem der analysierten Gewebe Unregelmäßigkeiten zeigen.

5.1.3 Ein gegen ein Mhcl-Fragment generierter Antikörper detektiert im *Drosphila*-Embryo unspezifisch die Muskelanheftungsstellen

Um die Mhcl-Proteinlokalisation analysieren zu können, wurde ein Antikörper gegen ein C-terminales Mhcl-Fragment generiert. Dafür wurden zunächst die entsprechenden 822 bp (pBB15, siehe Abb. 5.5) in einen *E. coli*-Expressionsvektor kloniert, der zur besseren Löslichkeit des Proteins einen sogenannten Nus-Anhang und zur Detektierung einen His-Anhang enthält. Das Proteinfragment hat ein errechnetes Molekulargewicht von 32,6 kDa, mit den Anhängen sind etwa 100 kDa zu erwarten. Es wurden spezielle *E. coli*-Zellen zur Expression des Fusionsproteins induziert und dieses aus dem Zell-Lysat unter Verwendung des His-Anhangs spezifisch aufgereinigt. Das beobachtete Molekulargewicht stimmte mit dem berechneten überein, zudem war die Aufreinigung erfolgreich, da große Mengen des Fusionsproteins in den Eluatfraktionen nachweisbar waren (Abb. 5.9 A4 - 6). Nachdem die hohen Imidazolkonzentrationen des Elutionspuffers durch Dialyse entfernt worden waren, wurden die Anhänge von einer Enterokinase entfernt, die an einem spezifischen Erkennungs-

signal innerhalb des Vektors angreifen kann. Dies erfolgte über einen Zeitraum von etwa 20 Stunden, wobei eine lineare Zunahme des Proteinfragments mit errechnetem Molekulargewicht zu beobachten war (Abb. 5.9 D1 bzw. D5, Pfeile). Methodische Schwierigkeiten verhinderten die Entfernung der abgespaltenen Anhänge aus der Suspension, sodass diese lediglich ankonzentriert und zur Immunisierung von zwei Kaninchen verwendet wurde (Immunisierung durchgeführt von Pineda – Antikörper-Service, Berlin). Die Seren wurden an Embryonen getestet, wobei sich zeigte, dass nur das aus Kaninchen 2 ein Muster in hitzefixierten Embryonen erzeugt, nach Formaldehydfixierung oder mit Serum aus Kaninchen 1 entsteht nur unspezifische Färbung (Daten nicht gezeigt).

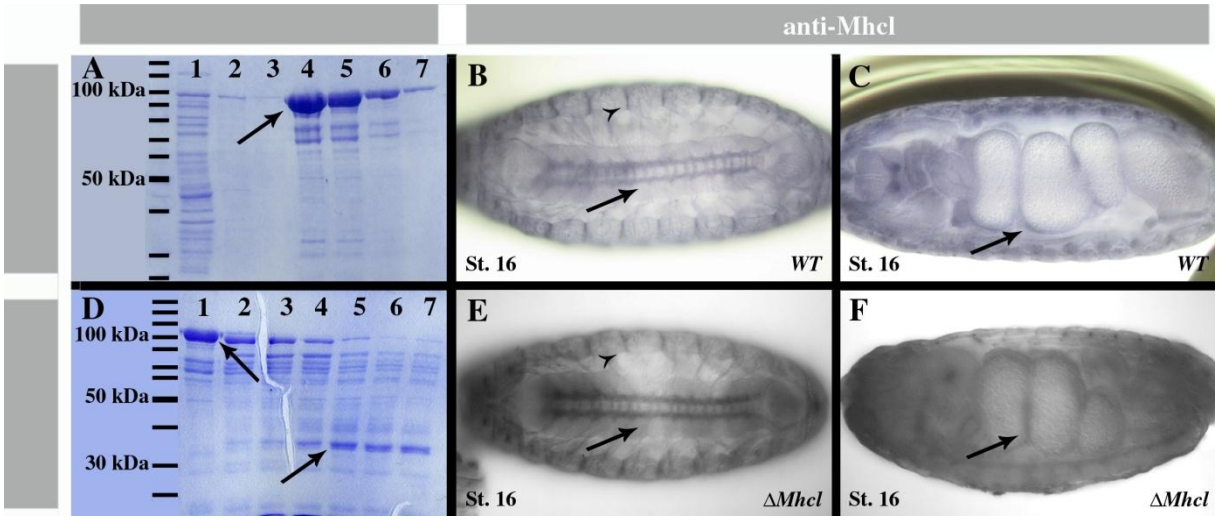

Abb. 5.9: Der gegen ein Proteinfragment generierte anti-Mhcl-Antikörper produziert nur unspezifische Färbung im Embryo
Ein 100 kDa schweres Fusionsprotein, bestehend aus 32,6 kDa Mhcl-Fragment und mehreren Anhängen, wurde in *E. coli* ektopisch exprimiert und aus dem Zell-Lysat gereinigt. Große Mengen dieses Fusionsproteins befanden sich dabei in den Eluatfraktionen (Pfeil, **A**, **1**: Durchfluss, **2**, **3**: Waschschritte 1 und 2, **4 - 7**: Eluatfraktionen 1 - 4). Durch Enterokinasebehandlung wurden die Anhänge des Fusionsproteins entfernt, es reicherte sich das Mhcl-Fragment an (Pfeile weisen auf Mhcl-Fragment mit bzw. ohne Anhänge, **D**, **1**: unbehandeltes Eluat, **2 - 7**: mit Enterokinase behandeltes Eluat, entnommen nach **2**: 2 h, **3**: 4 h, **4**: 8 h, **5**: 24 h, **6**: 16 h, **7**: 20 h bei RT). Dieses Proteinfragment wurde zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt, wobei das daraus gewonnene Serum sowohl in wildtypischen Embryonen (**B**, **C**) als auch in *ΔMhcl*-Embryonen (**E**, **F**) das ZNS (**B**, **E**, Pfeile), die epidermalen Muskelanheftungsstellen (**B**, **E**, Pfeilköpfe) sowie die Mitteldarmmuskulatur (**C**, **F**, Pfeile) detektiert (verwendete Konzentration: anti-Mhcl (Kaninchen 2) 1 : 250 nach Aufreinigung mittels NHS-aktivierter Sepharose, 1 : 50 nach Aufreinigung mittels Protein-A-Sepharose und NHS-aktivierter Sepharose). In **B**, **C** und **E** erfolgt der Blick auf die Embryonen von ventral.

Um die spezifische Detektierung zu intensivieren, wurde das Serum mittels Protein-A-Sepharose, welche alle IgGs erkennt, und NHS-aktivierter Sepharose, welche mit dem gereinigten Fusionsprotein gekoppelt worden war, aufgereinigt. Der so gereinigte anti-Mhcl-Antikörper markiert das ZNS zwischen Stadium 12 und 17 (Abb. 5.9 B, Pfeil) sowie die epidermalen Muskelanheftungsstellen (Abb. 5.9 B, Pfeilkopf) und die Mitteldarmmuskulatur

(Abb. 5.9 C, Pfeil). Wie Immunhistologie an *ΔMhcl*-Embryonen zeigt, beruht diese Färbung allerdings nicht auf spezifischer Detektierung des endogenen Mhcl-Proteins (vgl. Abb. 5.9 E, F mit B, C). Wird UAS-*Mhcl* ektopisch in der Epidermis exprimiert, ist der Antikörper durchaus in der Lage, dieses spezifisch zu detektieren (Abb. 5.6 F, Pfeil). Auch das Muster, welches der Antikörper in Western-Blot-Analysen an aufgereinigtem Proteineluat zeigt, stimmt mit dem überein, welches durch den anti-His-Antikörper erzeugt wird (Abb. 5.10 3, 2), die zusätzlichen Banden repräsentieren dabei wahrscheinlich Abbauprodukte. In embryonalen Proteinextrakten erkennt der anti-Mhcl-Antikörper mehrere Banden, zwei bei etwa 230 kDa, je eine bei 170 kDa, 105 kDa, 70 kDa und 67 kDa. Laut Flybase werden mehrere Isoformen des Proteins mit Molekulargewichten von 245 kDa, 242 kDa, 240 kDa, 216 kDa, 129 kDa bzw. 107 kDa vorhergesagt. Da der unspezifische Nachweis auch für diese Methode nicht ausgeschlossen werden konnte, ist keine endgültige Aussage über tatsächlich gebildete Isoformen zu treffen.

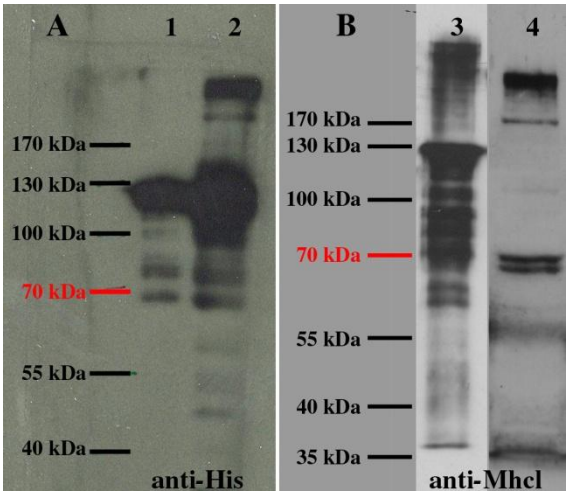

Abb. 5.10: Der anti-Mhcl-Antikörper erkennt spezifisch ein ektopisch exprimiertes Mhcl-Fragment
Ektopisch exprimiertes Mhcl-Fusionsprotein mit His-Anhang wird durch den anti-His-Antikörper spezifisch mit dem erwarteten Molekulargewicht von etwa 100 kDa detektiert (**1**, **2**). Der anti-Mhcl-Antikörper (verwendete Konzentration: 1 : 2 500 nach Aufreinigung mittels NHS-aktivierter Sepharose) zeigt das gleiche Muster (**3**), in embryonalem Proteinextrakt werden mehrere distinkte Banden detektiert (**4**). **1 - 3**: *E. coli*-Eluat des ektopisch exprimierten Fusionsproteins (**1**: 1 µl, **2**: 5 µl, **3**: 0,03 µl), **4**: 5 µl embryonaler Proteinextrakt

In der Körperwandmuskulatur dritter Larven detektiert der Antikörper zwei distinkte Streifen, die an den Z-Scheiben-Marker *sls*-GFP angrenzten, aber nicht damit kolokalisieren (Daten nicht gezeigt), was an die Verteilung von Rols7 erinnert (Kreisköther et al., 2006). Ähnliches wurde für die Muskulatur von Teilen des männlichen Reproduktionstrakts sowie für die adulte abdominale Muskulatur gezeigt (Hornbruch, Masterarbeit 2010, J. Kuckwa, Protokoll zum MSc-Vertiefungsmodul 2010). Da die Spezifität des Antikörpers jedoch nicht gegeben ist und die Z-Scheiben häufig unspezifische Färbung aufgrund der höheren Proteindichte zeigen, ist nicht eindeutig zu entscheiden, ob Mhcl tatsächlich an dieser Stelle lokalisiert.

Der gegen ein ektopisch in *E. coli* exprimiertes Proteinfragment generierte anti-Mhcl-Antikörper detektiert das Protein in Western-Blot-Analysen und bei ektopischer Expression im Embryo, endogenes embryonales Protein hingegen wird nicht spezifisch erkannt.

5.1.4 Die ektopische Expression mehrerer UAS-*Mhcl*-Konstrukte ist im *D. melanogaster*-Embryo nicht nachweisbar

Da der produzierte anti-Mhcl-Antikörper das endogene embryonale Protein nicht spezifisch detektiert, wurde der von der cDNA GH15471 abgeleitete *Mhcl*-Leserahmen in den pUAST-Expressionsvektor kloniert und mit einem einfachen Myc- bzw. Flag-Anhang versehen (pBB23 bzw. 48). Nach Etablierung transgener Fliegenlinien für pBB23 wurde die Expression des Fusionsproteins mit Hilfe passender Treiberstämme ektopisch in der Epidermis bzw. im Mesoderm induziert. Dies konnte allerdings weder auf Proteinebene mit anti-cMyc- oder anti-Mhcl-Antikörper, noch auf mRNA-Ebene mittels *in situ*-Hybridisierung gegen *Mhcl* nachgewiesen werden. Es konnte auch keine Auswirkung dieser ektopischen Expression im somatischen Mesoderm auf die Körperwandmuskulatur beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Ähnliches trifft auf ein Mhcl-Fragment inklusive Myc-Anhangs zu, welches den putativen coiled-coil-Bereich repräsentiert (pBB28 oder UAS-*Mhcl^{CC}-Myc*, 2,3 kb des C-terminalen Bereichs, Abb. 5.5). Da mit Hilfe dieses Bereichs wahrscheinlich die Homodimerisierung von Mhcl stattfindet (Daum, Bachelorarbeit 2008), sollte dessen ektopische Expression funktionales endogenes Protein kompetitiv entfernen und so dominant-negativ wirken. Dass die Konstrukte prinzipiell funktional sind, konnte durch ektopische Expression der Fusionsproteine in *Drosophila* Schneider-Zellen und anschließender Western-Blot-Analyse der Proteinextrakte gezeigt werden (siehe 5.1.5). In einem weiteren Versuch wurde das Mhcl^{CC}-Fragment mittels neuer Klonierungstechnik mit einem zehnfachen Myc-Anhang versehen, die Analyse der etablierten transgenen Fliegen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr abgeschlossen werden. Erste Experimente weisen allerdings darauf hin, dass Mhcl^{CC} nicht als dominant-negative Version des Proteins wirkt, da ektopische Expression in der *DMef2*- bzw. *twi*-Domäne die Vitalität der Fliegen nicht beeinträchtigt (Daten nicht gezeigt).

5.1.5 Die Interaktion zwischen Mhcl und Rols7 konnte nicht verifiziert werden

5.1.5.1 Gendosisexperimente mit *rols7*- und *ΔMhcl*-defizienten Embryonen weisen nicht auf eine Interaktion dieser Proteine hin

Da postuliert wurde, dass Mhcl ein Interaktionspartner von Rols7 ist, wurden die beiden Defizienzlinien, *ΔMhcl* und *Df(3L)BK9*, rekombiniert, um die Auswirkung der Deletion beider Gene analysieren zu können. Eine Verstärkung des Phänotyps der embryonalen Muskulatur würde hierbei den Ausfall des gleichen Signalwegs bedeuten und somit auf eine tatsächliche Interaktion hinweisen. Bei Betrachtung des β3-Tubulin-Nachweises in *Df(3L)BK9* wird im somatischen Mesoderm das charakteristische Muster mit sich bildenden PCs und vielen unfusionierten FCMs deutlich (Rau et al., 2001, Menon and Chia, 2001, Chen

and Olson, 2001, Abb. 5.11 B, Pfeil). *Df(3L)BK9, ΔMhcl*-Embryonen zeigen ebenfalls dieses Muster (Abb. 5.11 D, Pfeil), während die Entfernung einer Kopie *rols7* aus homozygoten *ΔMhcl*-Embryonen das wildtypische Muskelmuster (Abb. 5.11 A, E) sowie die epidermale Anheftung der somatischen Muskeln (Abb. 5.11 C, F, Pfeile) nicht stört.

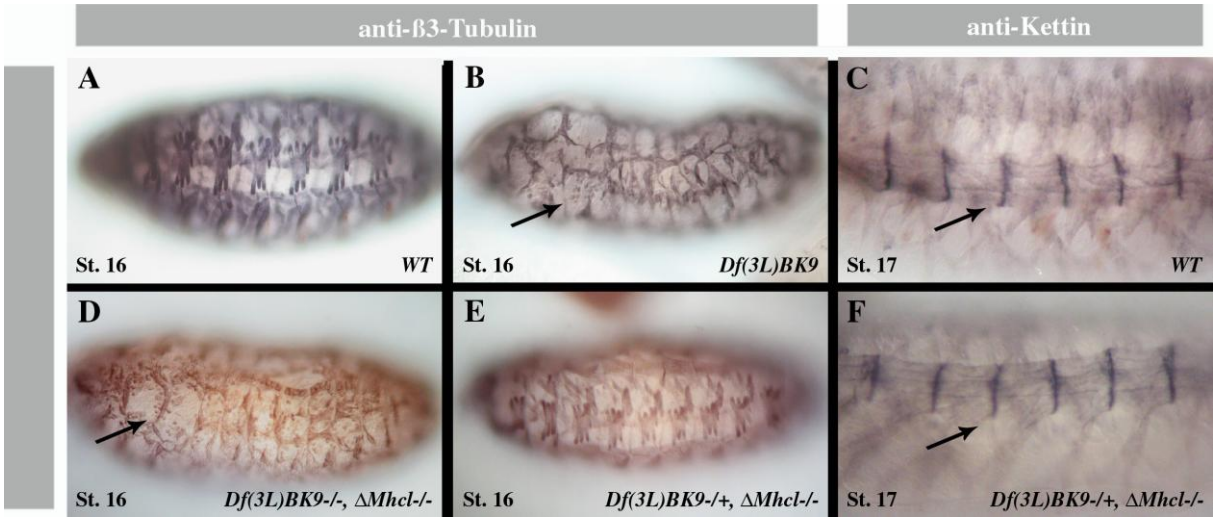

Abb. 5.11: Gendosisexperimente zwischen *rols7* und *Mhcl* können die Interaktion der Proteine nicht verifizieren
Immunhistologische Färbungen mit dem anti-β3-Tubulin-Antikörper verdeutlichen in *Df(3L)BK9*-Embryonen das charakteristische Muskelmuster mit PCs und vielen unfusionierten Myoblasten (**B**, Pfeil), das gleiche gilt für *Df(3L)BK9, ΔMhcl*-Embryonen (**D**, Pfeil). Das Einbringen einer Kopie *rols7* in diese Embryonen stellt das wildtypische Muskelmuster (**A**, **E**) sowie die wildtypische Anheftung der somatischen Muskeln in die Epidermis (**C**, **F**, Pfeile) wieder her.

5.1.5.2 Ektopisch in Zellkultur exprimierte Fusionsproteine lassen sich nachweisen

Der globale Hefe-zwei-Hybridscreen, in welchem die mögliche Interaktion zwischen Mhcl und Rols7 beschrieben wurde, ist aufgrund der benutzten Methodik ein eher artifizielles System, da der Test in Hefezellen und mit Proteinmengen, die nicht dem endogenen Niveau entsprechen, durchgeführt wird. Um die Wahrscheinlichkeit eines falsch-positiven Ergebnisses zu verringern, wurde die Interaktion in einem gezielten Einzeltest verifiziert und auch Autoaktivierung durch das gefundene *Mhcl*-Fragment ausgeschlossen (Kreisköther, Dissertation 2005). Dieser Einzeltest wurde im Rahmen einer angegliederten Bachelorarbeit wiederholt, auch hier konnte die Interaktion verifiziert werden (Daum, Bachelorarbeit 2008).
Trotzdem wurde versucht, die Interaktion zwischen Rols7 und Mhcl in einem anderen Testsystem zu verifizieren. Da die ektopische Expression von UAS-*Mhcl* in der Augen-imaginalscheibe nicht zu einem Phänotyp im *D. melanogaster*-Auge führt (*EY00454*, siehe 5.1.2.1), weshalb genetische Interaktionsstudien mittels dieses Systems unmöglich sind, wurden Vorbereitungen für Co-Immunopräzipitations-Studien getroffen. Dafür wurde zunächst die Funktionalität mehrerer zur Verfügung stehender UAS-Konstrukte in SL2-Zellen

und deren Nachweis mittels Western-Blot-Analyse untersucht, wobei das co-transfizierte *act*-GAL4-Konstrukt für die Induktion der Expression verantwortlich ist. Die Transfektion von SL2-Zellen mit UAS-*rols7-TAP* (C. Stute, unpubliziert) ergab ein spezifisches Signal, dessen erwartetes Molekulargewicht von 227 kDa (inkl. 22 kDa des TAP-Anhangs) mit dem beobachteten übereinstimmte (Abb. 5.12 B, Pfeil). Gleiches gilt für die ektopische Expression von UAS-*Mhcl-Myc* (pBB23), UAS-*Mhcl-Flag* (pBB48,) sowie UAS-*Mhcl*^{CC}*-Myc* (pBB28, Abb. 5.5) mit einem berechneten Molekulargewicht von 230 kDa bzw. 90 kDa, die mit anti-Mhcl-Antikörper, aber nicht anti-cMyc- oder anti-Flag-Antikörper, nachgewiesen werden konnten (Abb. 5.12 A, Pfeile).

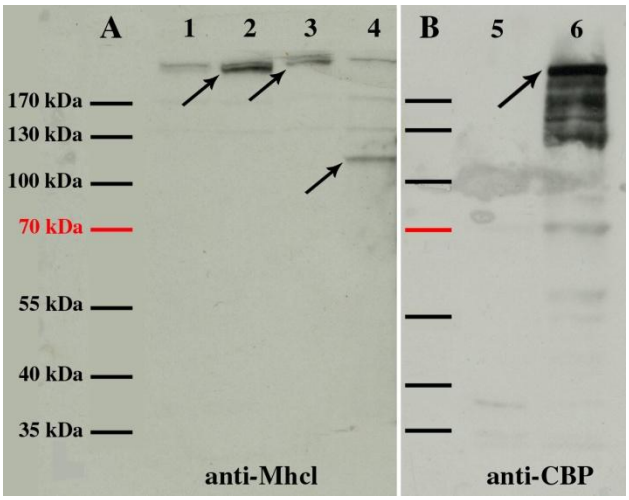

Abb. 5.12: Ektopisch in Zellkultur exprimierte Fusionsproteine lassen sich per Western-Blot-Analyse spezifisch nachweisen
Es wurden SL2-Zellen mit unterschiedlichen UAS-Konstrukten in Kombination mit *act*-GAL4 transfiziert und der daraus gewonnene Proteinextrakt mittels Western-Blot analysiert. Dabei detektieren die verwendeten Antikörper anti-CBP keinerlei unspezifische Bande (**5**), anti-Mhcl eine unspezifische Bande bei etwa 240 kDa (**1**), die sich aber von den spezifischen unterscheidet. **1**, **5**: Proteinextrakt aus untransfizierten Zellen, **2**: Proteinextrakt aus mit pBB48 transfizierten Zellen (erwartetes Molekulargewicht 230 kDa), **3**: pBB23 (230 kDa), **4**: pBB28 (90 kDa), **6**: UAS-*rols7-TAP* (227 kDa). Die spezifischen Banden sind durch Pfeile gekennzeichnet. Anti-CBP-Antikörper (Calmodulin Binding Peptide) weist den TAP-Anhang nach.

5.1.5.3 Durch Co-Immunopräzipitation erzielte Ergebnisse beruhen ausschließlich auf unspezifischen Reaktionen der benutzten Antikörper oder Agarosematrices

Für die eigentlichen Co-Immunopräzipitations-Studien wurden die bereits beschriebenen Konstrukte UAS-*rols7-TAP* und UAS-*Mhcl-Flag* (pBB48) benutzt. Auf die Co-Transfektion der Konstrukte in SL2-Zellen, ebenfalls mit dem die Expression aktivierenden *act*-GAL4, und die Gewinnung der Proteinextrakte folgte die Immunopräzipitation des TAP-Anhangs mittels Calmodulin-Affinitäts-Matrix bzw. IgG-Agarose-Matrix, die die beiden Fragmente des TAP-Anhangs, Calmodulin-bindendes Peptid bzw. Protein-A, spezifisch erkennen. Anschließend wurde mittels Western-Blot-Analysen die Bindung von Rols7-TAP an die entsprechende Matrix sowie eine evtl. Interaktion zwischen Rols7 und Mhcl überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass Mhcl mittels seiner Calmodulin-bindenden IQ-Domänen an die Calmodulin-Affinitäts-Matrix bindet, weshalb diese für einen spezifischen Interaktionsnachweis nicht benutzt werden kann (Daten nicht gezeigt). Andererseits produziert die IgG-Agarose-Matrix

in Kombination mit UAS-*rols7-TAP* eine unspezifische Bande bei etwa 230 kDa, die auch bei Verwendung des anti-Mhcl-Antikörpers detektiert wird (Abb. 5.13 3). Da das benutzte Mhcl-Konstrukt ein ähnliches Molekulargewicht aufweist (Abb. 5.12 A), konnte der Interaktionstest an dieser Stelle nicht weitergeführt werden, auch wenn die entsprechende Bande etwas stärker erschien. Alternative Konstrukte zur ektopischen Expression von Rols7 sind nicht funktional (Daten nicht gezeigt) und die benutzten UAS-*Mhcl*-Konstrukte mittels der verwendeten Anhänge nicht nachweisbar (siehe 5.1.5.2), sodass der Test nicht abgeschlossen werden konnte. Ferner zeigte sich, dass auch bei Verwendung von Myc- bzw. HA-gekoppelten Matrices in Kombination mit UAS-*rols7-TAP* starke unspezifische Banden detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

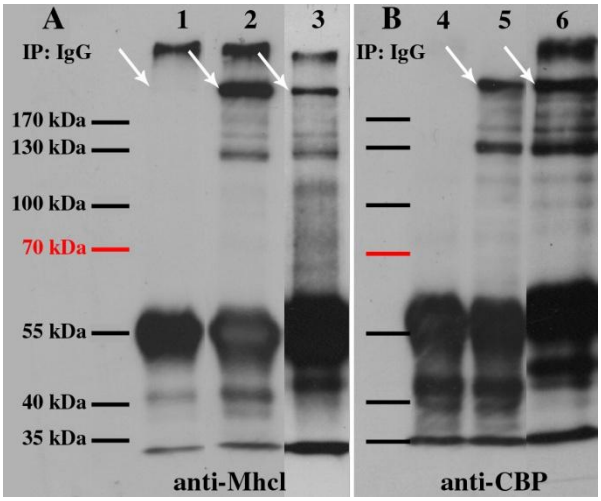

Abb. 5.13: Aufgrund unspezifischer Kreuzreaktivität sind die Co-Immunopräzipitations-Studien zwischen Rols7 und Mhcl nicht auswertbar
Proteinextrakte aus SL2-Zellen, die jeweils mit *act*-GAL4 co-transfiziert worden waren, wurden mittels IgG-Agarose-Matrix immunopräzipitiert und per Western-Blot analysiert. Der spezifische Nachweis geschah mittels anti-Mhcl-Antikörper (Mhcl) bzw. anti-CBP-Antikörper (TAP-Anhang). Dabei wurde deutlich, dass beide Antikörper auch bei Verwendung der Matrix mit UAS-*Mhcl-Flag*- bzw. *act*-GAL4-Proteinextrakt einige unspezifische Banden detektieren (**1**, **4** bzw. nicht gezeigt), allerdings nicht auf Höhe der untersuchten Proteine. An UAS-*rols7-TAP*/UAS-*Mhcl-Flag*-Proteinlysat wurde spezifisch das eingesetzte Rols7-Protein gezeigt (**5**, Pfeil). Die in diesem Ansatz mit dem anti-Mhcl-Antikörper detektierte Bande auf Höhe des Mhcl-Proteins, die eine Interaktion beweisen würde (**2**, Pfeil) ist allerdings auch ohne UAS-*Mhcl-Flag* detektierbar (**3**, Pfeil). **6**: UAS-*rols7-TAP*-Proteinextrakt.

Die postulierte Interaktion zwischen Rols7 und Mhcl konnte weder durch Gendosis-experimente noch durch Co-Immunopräzipitations-Studien verifiziert werden. Im ersten Fall hat die Deletion des einen Gens keine Auswirkung auf die Funktion des anderen während der Myogenese, im zweiten wird die Auswertung durch unspezifische Banden im Bereich der untersuchten Proteine unmöglich gemacht.

5.1.6 Der putative Promotorbereich von *Mhcl* kann nicht verifiziert werden

5.1.6.1 RT-PCR-Experimente deuten auf mindestens eine *Mhcl*-mRNA hin, die länger als vorhergesagt ist

Laut Flybase werden durch Kombination unterschiedlicher Exons sechs *Mhcl*-Isoformen gebildet (siehe Abb. 5.5). Allerdings wird nur für eine dieser Isoformen ein 5´-UTR-Bereich

der mRNA vorhergesagt. Da in diesem Bereich aber wichtige translationsregulatorische Schritte stattfinden, erscheint es eher ungewöhnlich, dass das START-Codon auch gleichzeitig den Beginn der mRNA markiert (Le Quesne et al., 2010, van der Velden and Thomas, 1999, Wilkie et al., 2003). Um zu überprüfen, ob sich die drei längsten mRNAs (*Mhcl-RA*, *-RB*, *-RG*) über den vorhergesagten Bereich hinaus erstrecken, wurden RT-PCR-Analysen durchgeführt. Dazu wurde jeweils gesamte RNA und polyA$^+$-RNA benutzt, die aus wildtypischen Embryonen, dritten Larven und Fliegen gewonnen worden war. Die Primer wurden so gewählt, dass das resultierende PCR-Produkt ein Intron von 62 bp Länge überspannt (Abb. 5.14 A), wodurch das die mRNA repräsentierende Amplifikat anhand der Größe identifiziert werden kann. Der verwendete Primer d wurde gegen den potenziellen 5´-UTR-Bereich gerichtet. Es zeigte sich, dass in allen drei Entwicklungsstadien mRNA-Bereiche nachweisbar sind, die über die vorhergesagte Region hinausgehen (Abb. 5.14 B, C, 7 - 9) und in ihrer Größe jeweils der Erwartung entsprechen. Die Konzentration der isolierten RNAs war nach einer groben gelelektrophoretischen Abschätzung vergleichbar, die Amplifikatmengen zeigen tendenziell, dass die embryonalen Transkriptmengen am höchsten (Abb. 5.14 B, C, 1, 4, 7) und die larvalen am geringsten sind (2, 5, 8). Dies entspricht Daten, die auf der Auswertung sogenannter Microarrays beruhen (Flybase).

Um einen Hinweis auf tatsächlich gebildete mRNAs zu bekommen, wurden drei Fragmente des Gens (Abb. 5.5, pBB10 - 12), die in drei, einer oder allen sechs Isoformen enthalten sind, kloniert. Gegen diese Bereiche sowie das Fragment der anti-Mhcl-Antikörper-Generierung (pBB15) wurden RNA-Sonden für die Durchführung von *in situ*-Hybridisierungen erstellt. Dabei wurde ersichtlich, dass nur die Sonden, die gegen alle sechs Isoformen gerichtet sind (pBB11, 15) ein Transkriptmuster detektieren, welches dem schon beschriebenen sehr ähnlich ist (vgl. Abb. 5.14 D, E mit Abb. 5.1 D). Mit den Sonden, die die mRNAs einer bzw. dreier Isoformen detektieren, kann keine spezifische Färbung erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Die Analyse der vitalen Fliegenlinie *c05149* zeigte, dass die P-Element-Insertion in einem von vier Isoformen geteilten Intron weder die wildtypische *Mhcl*-mRNA-Verteilung noch das Muskelmuster stört (Daten nicht gezeigt). Die Fliegenlinie *e03696* hingegen, die eine P-Element-Insertion in einem von fünf Isoformen geteilten Intron enthält, ist nur eingeschränkt vital, homozygote P-Element-Embryonen zeigen eine schwächere *Mhcl*-Expression im Vergleich zu wildtypischen Embryonen (Abb. 5.14 F) sowie ein ebenfalls wildtypisches Muskelmuster (Daten nicht gezeigt). Diese Erkenntnisse passen zu Daten, welche an *ΔMhcl*-Embryonen gewonnen wurden (siehe 5.1.2.2).

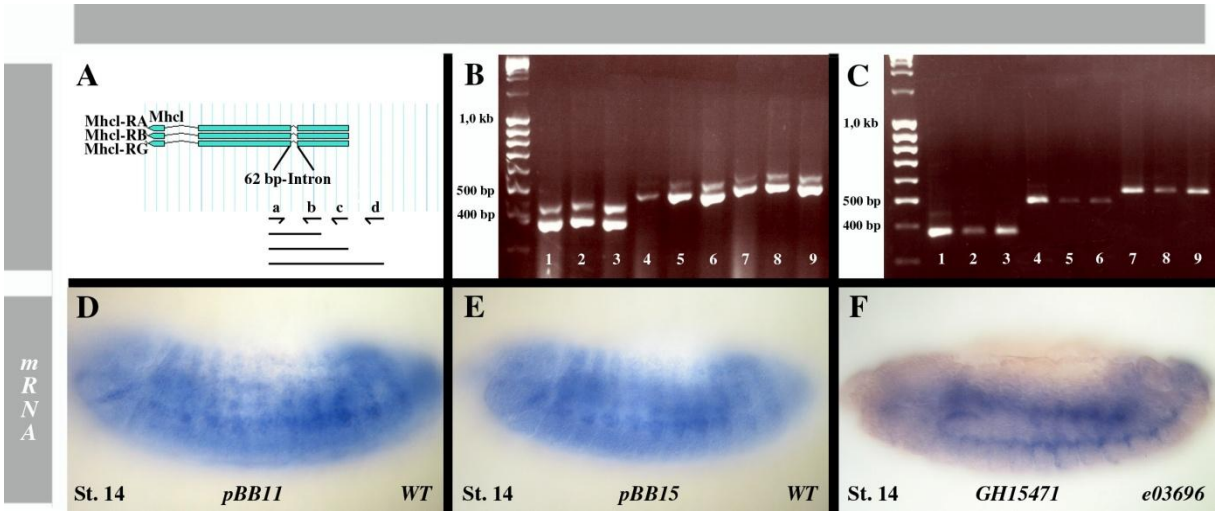

Abb. 5.14: Es werden unterschiedliche *Mhcl*-mRNA-Isoformen gebildet, die teilweise länger als postuliert sind
RT-PCR-Experimente an gesamter RNA (**B**) und poly-A^+-RNA (**C**) zeigen, dass Teile der *Mhcl*-mRNA länger als vorhergesagt sind, da auch die Primerkombination a + d noch ein Amplifikat liefert (**A - C**, a: oBB57, b: oBB56, c: oBB55, d: oBB59; 1, 4, 7: embryonale RNA, 2, 5, 8: RNA aus dritten Larven, 3, 6, 9: RNA aus Fliegen; 1-3: a + b, erwartete Fragmentlänge 380 bp gesamte RNA/442 bp poly-A^+-RNA, 4-6: a + c, 493 bp/555 bp, 7-9: a + d, 542 bp/604 bp). Sonden gegen zwei C-terminale Bereiche von *Mhcl* zeigen das gleiche mRNA-Verteilungsmuster wie bereits beschrieben (**D**, **E**). Die *Mhcl*-Expression in *e03696*-Embryonen scheint schwächer als in wildtypischen Embryonen (**F**).

5.1.6.2 Der putative Promotorbereich von *Mhcl* kann die Expression eines Reportergenkonstrukts nicht aktivieren

Für die Regulation verschiedener mesodermal exprimierter Gene ist bekannt, dass deren Promotoren häufig stromaufwärts des Gens und des Transkriptionsstarts lokalisiert sind (Kesper, Dissertation 2005, Philippakis et al., 2006). Um einen tieferen Einblick in die Organisation des *Mhcl*-Lokus zu bekommen, wurde der gesamte, etwa 1,6 kb große, genomische Bereich zwischen dem jeweils ersten Exon von *Mhcl* und *Akt1* (Abb. 5.5) in einen Reportergenvektor kloniert (pBB21). Falls in diesem Bereich einer der *Mhcl*-Promotoren liegt, sollte dieses Fragment in der Lage sein, die Expression des Reportergens *β-Galaktosidase* zu aktivieren, eine Aktivierung durch den *Akt1*-Promotor ist aufgrund der Direktionalität auszuschließen. Es wurden transgene Fliegenlinien für dieses Konstrukt etabliert. Der durchgeführte immunhistologische Nachweis von β-Galaktosidase zeigte allerdings keine spezifische Expression (Daten nicht gezeigt).

Es wurde gezeigt, dass es mindestens eine *Mhcl*-mRNA gibt, die sich stromaufwärts über das erste postulierte Exon hinaus erstreckt, was auf das Vorhandensein eines 5´-UTR-Bereichs hindeutet. Der genomische Bereich, in welchem der Promotor für diese mRNA vermutet wurde, kann die Expression eines Reportergens nicht aktivieren. Der Promotor befindet sich voraussichtlich in einem weiter stromaufwärts gelegenen Teil des Genoms, seine genaue

Position konnte allerdings nicht bestimmt werden, da der Transkriptionsstart nicht identifiziert wurde. Weitere Experimente befürworten die Expression unterschiedlicher Isoformen des Gens, wahrscheinlich durch Nutzung unterschiedlicher Promotoren.

5.1.7 Die Analyse potenzieller Mhcl-Interaktionspartner lieferte keinen Aufschluss über die Beteiligung des Proteins an bestimmten Signalwegen

Da es über die mögliche Funktion von Mhcl während der Myogenese keine Informationen gab, wurde versucht, über die Analyse potenzieller Interaktionspartner einen Anhaltspunkt über die Beteiligung an bestimmten Signalwegen zu bekommen. Dafür wurden aus Datenbanken, welche zumeist auf globalen Hefe-Interaktionstests beruhen, sieben postulierte Interaktionspartner zur näheren Analyse ausgewählt. Neben DCrk, welches schon als Interaktionspartner für myogeneserelevante Proteine beschrieben ist, waren dies die Proteine 26-29-p (26-29kD-Proteinase), welches beispielsweise als Endopeptidase fungieren könnte und CanB (Calcineurin B), das wahrscheinlich Ca^{2+}-Ionen oder Calmodulin bindet und z. B. den Kernimport reguliert. Außerdem wurde das Signaltransduktionsprotein Cka (Connector of Kinase to AP-1), sowie Flw (Flapwing), eine Myosin-Phosphatase, welche beispielsweise Transportmechanismen bzw. die Entwicklung adulter Muskulatur beeinflusst, ausgewählt. Desweiteren wurden Experimente durchgeführt, die das Membrantransport-Protein Scamp und Wts (Warts), einen Regulator der Zellproliferation, betreffen (Tabelle 1, Flybase).

Es wurden *in situ*-Hybridisierungen mit Sonden durchgeführt, die gegen cDNAs dieser Gene gerichtet waren. Sollten die Proteine tatsächlich mit Mhcl interagieren, wäre eine zeitlich und gewebespezifisch überlappende Expression zu erwarten. Allerdings konnte für keines der Gene eine spezifische mesodermale Expression detektiert werden (Tabelle 1, Daten nicht gezeigt). Die hier beschriebenen Expressionsmuster von *26-29-p*, *CanB* und *flw* verifizieren Daten von BGDP, für *DCrk* wurde, anders als in dieser Arbeit beobachtet, ein spezifisches Expressionsmuster in vielen embryonalen Geweben bereits berichtet (Galletta et al., 1999). Es ist davon auszugehen, dass dies nach Optimierung der Hybridisierungs-Parameter ebenfalls erreicht werden kann. Mittels Northern-Blot-Analyse ist die *wts*-mRNA während der gesamten Embryogenese nachweisbar (Xu et al., 1995), in der vorliegenden Arbeit konnte keine Aussage über die Expression des Gens getroffen werden, da Kontrollfärbungen immer mehr Signal zeigten als das eigentliche Experiment. Über die mRNA-Verteilung von *Cka* ist bisher nichts bekannt. *Scamp* kodiert ein Protein, das vielfältige Funktionen, z. B. während des Vesikeltransports, bei der Neurotransmitter-Ausschüttung und für das Langzeitgedächtnis ausübt (Fernández-Chacón and Südhof, 2000, Hubbard et al., 2000, Littleton, 2000, Zhao et al., 2009) und daher auch in diesen Geweben nachweisbar sein sollte.

Tabelle 1: Überblick über analysierte, potenzielle Interaktionspartner von Mhcl

Genname	**verwendete cDNA**	**Expressionsmuster**	**analysierte Fliegenlinie**	**Auffälligkeiten im somatischen Mesoderm**
26-29kD-proteinase (26-29-p)	RE18380	maternale Komponente, bis etwa Stadium 10 in den Polzellen	*P{lacW}26-29-p*^{s3635}, letale Insertion	nein
Calcineurin B (CanB)	RH02643	wahrscheinlich maternale Komponente, ab Stadium 15 im ZNS	n. d.	n. d.
Connector of kinase to AP-1 (Cka)	LD41760	wahrscheinlich maternale Komponente, bis Stadium 14 ubiquitär, danach spezifisch ausschließlich im ZNS	*P{PZ}Cka*^{05836}, letale P-Insertion im 5´-UTR *P{lacW}Cka*^{s1883}, letale P-Insertion	wenige unfusionierte FCMs, leichte Anheftungs-defekte; nein
DCrk	RE60886	ubiquitär	*Df(4)ED6369* *P{SUPor-P}Crk*^{KG00336}, P-Insertion im 5´-UTR	nein nein
flapwing (flw)	GH05039	ubiquitär	*P{lacW}flw*^{G0172}, letale P-Insertion im 5´-UTR	nein
Scamp	RH68403	maternale Komponente; endodermal oder ubiquitär	*Scamp*-RNAi	jeweils vital, keine Auffälligkeiten
warts (wts)	SD19495	n. a.	*wts*$^{3-17}$, letales Allel	n. a.

Legende: n. d.: nicht durchgeführt; n. a.: nicht auswertbar; benutzte Treiberlinien für die Expression von *Scamp*-RNAi: *1151*-GAL4, *sns*-GAL4, *rP298*-GAL4, *DMef2*-GAL4; UAS-*Dcr2*

Obwohl das Expressionsmuster keines der untersuchten Gene mit dem von *Mhcl* übereinstimmt und sogar teilweise eine spezifische mRNA-Verteilung in anderen Geweben gezeigt werden konnte, wurden, soweit erhältlich, Letalität verursachende Allele oder P-Element-Insertionslinien analysiert. Dabei waren, abgesehen von einer Ausnahme, keine

Phänotypen hinsichtlich des somatischen Mesoderms oder der Mitteldarmmorphologie zu erkennen (Tabelle 1, Daten nicht gezeigt). Da *P{PZ}Cka*^{05836}-Embryonen nur leichte Defekte zeigen und die Embryonen der P-Insertionslinie *P{lacW}Cka*^{s1883} ebenfalls ein wildtypisches Muskelmuster aufweisen, ist davon auszugehen, dass der Verlust von *Cka* maximal leichte Defekte hervorruft. Ob Wts essentiell für die somatische Myogenese ist, konnte nicht ausgewertet werden, da nur sehr wenige mutante Embryonen zu beobachten waren. Da keine *Scamp*-mutante Fliegenlinie erhältlich ist, wurden Experimente mittels RNAi (Interferenz) durchgeführt, wobei diese mit unterschiedlichen Treiberlinien in verschiedenen Geweben induziert wurde. Dafür wurden *sns*-GAL4, *rP298*-GAL4, *DMef2*-GAL4; UAS-*Dcr2* und *1151*-GAL4, welcher in der adulten Flugmuskulatur aktiv ist, benutzt. Alle Nachkommen dieser Kreuzungen sind vital und zeigen keine äußerlich sichtbaren Auffälligkeiten. Ähnliche Versuche zeigen, dass die Induktion von RNAi im Embryo nicht bzw. nur sehr unzureichend funktioniert, des Weiteren werden häufig falsch-positive Ergebnisse erzielt (D. Buttgereit, Ch. Hornbruch, persönliche Mitteilung). Aufgrund dessen müssen diese Resultate vorsichtig interpretiert und durch passende Kontrollexperimente verifiziert werden.

Da für DCrk bereits eine Funktion während der somatischen Myogenese angenommen wird (Abmayr and Kocherlakota, 2006), wurde die mögliche Interaktion des Proteins mit Mhcl genauer analysiert. Aufgrund der Lage auf dem vierten Chromosom sind keine mutanten Fliegenlinien für *DCrk* erhältlich, weshalb eine membrangebundene, myristylierte Form des Proteins ektopisch im Mesoderm exprimiert wurde. Dabei wurden die schon veröffentlichten leichten Fusions- und Anheftungsdefekte verifiziert (Abmayr and Kocherlakota, 2006, Daten nicht gezeigt). Erste Analysen zeigten keine Verstärkung des Phänotyps durch *ΔMhcl* (Daten nicht gezeigt). Die Induktion der *DCrk*-RNA-Interferenz mit Hilfe des *1151*-GAL4-, *sns*-GAL4- oder *rP298*-GAL4-Treiberstamms führt zu vitalen Nachkommen ohne äußerlich sichtbare Veränderungen. Bei Benutzung der Treiberlinie *DMef2*-GAL4; UAS-*Dcr2* sind die Nachkommen nicht vollständig pupal letal und die männliche Schlupfrate ist stark verringert. Dies könnte auf die X-chromosomale Insertion von UAS-*Dcr2* zurückzuführen sein, wodurch die hemizygoten Männchen stärker von der Interferenz betroffen sind als die heterozygoten Weibchen. Die meisten der geschlüpften Tiere sind nicht in der Lage, ihre Flügel zu entfalten. Eine sehr vorläufige Analyse der adulten thorakalen und abdominalen Muskulatur ergab aber keine Auffälligkeiten (Daten nicht gezeigt). Abschließend wurde die mögliche Interaktion von DCrk und Mhcl per Co-Immunopräzipitation überprüft. Dazu wurden SL2-Zellen zur Expression der Konstrukte UAS-*Mhcl-Flag* und UAS-*DCrk-HA* induziert und evtl. auftretende Komplexe mit Hilfe des HA-Anhangs isoliert. Der anti-HA-Antikörper ist in Western-Blot-

Analysen in der Lage, spezifisch das Fusionsprotein zu detektieren, sowohl bei Verwendung von Proteinextrakten aus Zellen, die UAS-*DCrk-HA* alleine als auch zusammen mit UAS-*Mhcl-Flag* exprimieren (Abb. 5.15 A, B, Pfeile). Der anti-Mhcl-Antikörper detektiert bei Co-Expression eine schwache Bande, die das Mhcl-Protein repräsentieren und auf eine mögliche Interaktion hinweisen könnte (Abb. 5.15 C, Pfeil).

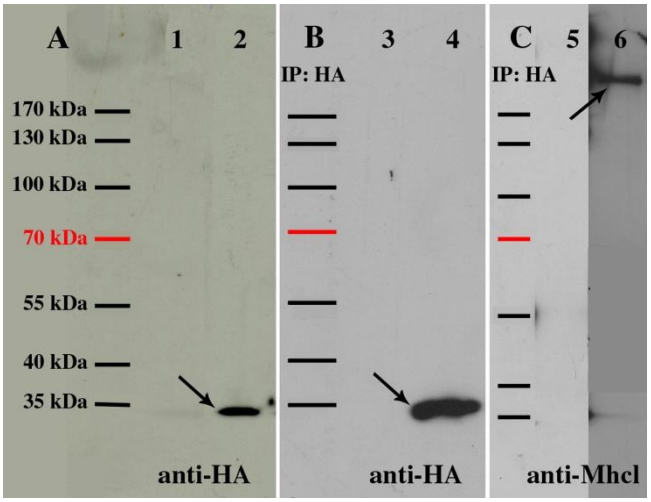

Abb. 5.15: Co-Immunopräzipitationsstudien deuten auf eine Mhcl-DCrk-Interaktion hin

Es wurden Western-Blot-Analysen an Proteinextrakten aus SL2-Zellen durchgeführt. Der anti-HA-Antikörper erkennt spezifisch das DCrk-HA-Fusionsprotein (berechnetes Molekulargewicht: 35 kDa, **2**, **4**, Pfeile). Nach Co-Immunopräzipitation mittels HA-Agarose-Matrix (**3 - 6**) detektiert der anti-Mhcl-Antikörper eine Bande, die Mhcl entsprechen könnte, welches mit DCrk interagiert (**6**, Pfeil). **1**: untransfizierte Zellen, **2**: UAS-*DCrk-HA* exprimierende Zellen, **3**, **5**: UAS-*Mhcl-Flag* exprimierende Zellen, **4**, **6**: UAS-*Mhcl-Flag* und UAS-*DCrk-HA* exprimierende Zellen (jeweils Co-Expression mit *act*-GAL4)

Da alle untersuchten Gene nicht spezifisch mesodermal exprimiert werden und auch keine der analysierten Mutanten zu einer Störung des somatischen Muskelmusters führt, konnte keiner der potenziellen Interaktionspartner für Mhcl eindeutig verifiziert werden. Für die Interaktion mit DCrk gibt es zwar einen Anhaltspunkt anhand der Co-Immunopräzipitation, dies kann aber aufgrund der beschriebenen Probleme allenfalls als weiterer Hinweis gewertet werden. Es gilt zu beachten, dass genetische Experimente eine Interaktion nicht unbedingt bestätigen.

5.1.8 Das Protein Zipper agiert während der Keimstreif-Verlängerung und der Myoblastenfusion in Redundanz zu Mhcl

5.1.8.1 *zip2*-mutante Embryonen zeigen maximal leichte Defekte während der Embryogenese

ΔMhcl-Embryonen zeigen zwar keinerlei Defekte, allerdings wird das Gen spezifisch im somatischen und viszeralen Mesoderm exprimiert, weshalb zu vermuten ist, dass das Protein dort auch eine Funktion ausübt. Daher wurde die Möglichkeit eines Redundanzpartners in Betracht gezogen, der bei Funktionsausfall die Aufgaben von Mhcl übernimmt. Aus den zwölf weiteren *D. melanogaster*-Myosinen wurden zunächst zwei zur näheren Analyse herangezogen, Myo95E und Zip (Zipper). Bisher wurde weder die mRNA- noch die Proteinverteilung von Myo95E beschrieben, das in die Klasse IC der Myosine eingruppiert wird. Das Protein weist etwa 21 % Sequenzidentität zu Mhcl auf und bildet aller Voraussicht nach

neben der Motordomäne noch zwei IQ-Domänen (Blast, Smart). Durchgeführte *in situ*-Hybridisierungen mit Sonden, die gegen die cDNA erstellt wurden, deuten auf eine Expression im ZNS hin (Daten nicht gezeigt). Es wurden *ΔMhcl, P{EPgy2}Myo95E*^{EY22671}- doppelmutante Fliegen per Rekombination erzeugt und die Embryonen analysiert. Wie in den einzelmutanten Embryonen wies das durch den anti-β3-Tubulin-Antikörper sichtbar gemachte somatische und viszerale Muskelmuster keinerlei Störungen auf (Daten nicht gezeigt).

Das Protein Zip ist ein nicht-muskelspezifisches Myosin der Klasse II. Es ist das Myosin mit der höchsten Sequenzidentität zu Mhcl, die etwa bei 30 % liegt, und bildet wahrscheinlich eine Motordomäne, eine IQ-Domäne sowie einen C-terminalen coiled-coil-Bereich aus (Blast, Smart, Tzolovsky et al., 2002). Eigene *in situ*-Hybridisierungen mit Sonden, die gegen die cDNA abgeleitet wurden, zeigen eine mehr oder weniger ubiquitäre Verteilung der mRNA (Daten nicht gezeigt). Es wurde bereits beschrieben, dass das maternal zur Verfügung gestellte Protein u. a. eine Rolle während des Dorsalschlusses, bei der Wegfindung der Axone und der Kopfeinstülpung spielt (Flybase, Young et al., 1993). Vor einigen Jahren wurde gezeigt, dass Zip an den Muskelenden lokalisiert und eine wichtige Komponente der larvalen Z-Scheiben darstellt. Es wurde postuliert, dass das Protein für die strukturelle Integrität der Sarkomere verantwortlich ist, da *zip*-defiziente Embryonen keine funktionalen Muskeln aufbauen (Bloor and Kiehart, 2001). Zur weiteren Analyse wurde das *zip*^{2}-Allel verwendet, für das neben den allgemeinen *zip*-Phänotypen auch ein Fehlen der sogenannten VA-Muskeln (ventrale acute) 1 bis 3 berichtet wurde (Bloor and Kiehart, 2001). Eigene Untersuchungen zeigten ein wildtypisches somatisches Muskelmuster (Abb. 5.16 A), auch die VA-Muskeln 1 - 3 erschienen, im Rahmen auftauchender Fixierungsartefakte, wildtypisch (Abb. 5.16 C, F, Pfeile). Der Dorsalschlussdefekt war klar zu erkennen, wohingegen sich sowohl das Herz als auch der Mitteldarm und die terminalen Z-Scheiben wildtypisch entwickelten (Abb. 5.16 B, D, E, Pfeile). Da mit Hilfe der anti-Kettin-Antikörperfärbung eigentlich die Bildung der Sarkomere nachvollziehbar sein müsste, sollten hier die für *zip*^{2}-Mutanten missgebildeten Sarkomere sichtbar werden. Allerdings wurde schon gezeigt, dass diese Strukturen auch in wildtypischen Embryonen nicht zu erkennen sind (siehe 5.1.2.2).

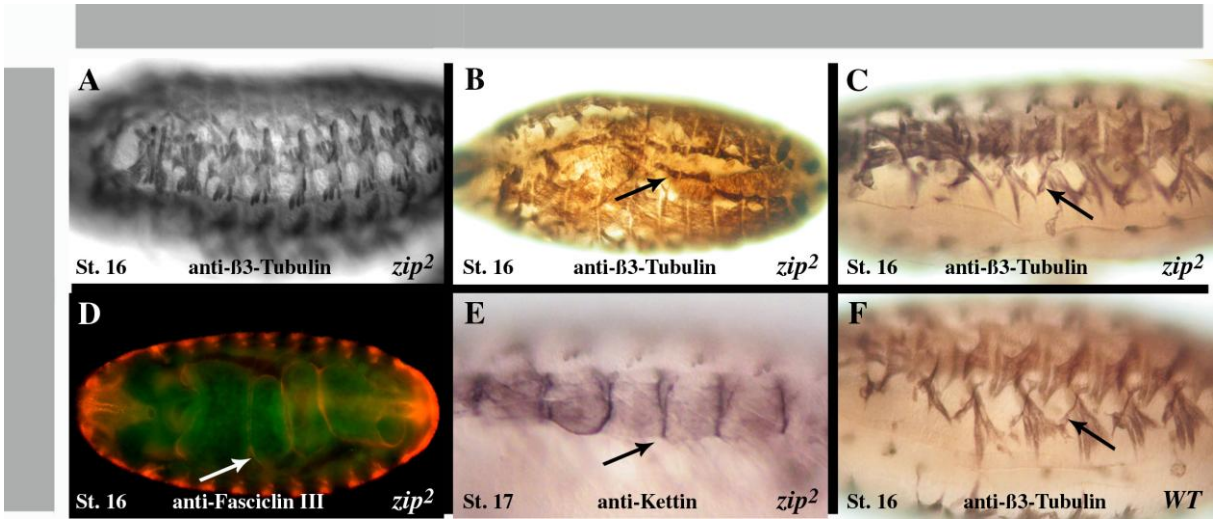

Abb. 5.16: *zip*^{2}-mutante Embryonen weisen einen Dorsalschlussdefekt auf, andere analysierte Gewebe erscheinen wildtypisch
Mittels Immunhistologie gegen β3-Tubulin wurde gezeigt, dass die mutanten Embryonen den Dorsalschluss nicht korrekt durchführen (**B**, Pfeil), die somatische Muskulatur erscheint hingegen wildtypisch (**A**). Anders als berichtet können im Vergleich zu wildtypischen Embryonen keine spezifischen Störungen in den VA-Muskeln 1 - 3 beobachtet werden (**C**, **F**, Pfeile). Der Mitteldarm ist, genauso wie die Anheftung der somatischen Muskeln in die Epidermis, korrekt ausgebildet (**D**, **E**, Pfeile, Nachweis mittels anti-Fasciclin III- bzw. anti-Kettin-Antikörper). In **B** erfolgt der Blick auf den Embryo von schräg dorsal, in **C**, **D** und **F** von schräg ventral.

5.1.8.2 *zip*^{2}*; ΔMhcl*-doppelmutante Embryonen zeigen neben einer starken Störung der allgemeinen Morphologie auch eine reduzierte somatische Fusionsrate

Um zu überprüfen, ob Zip tatsächlich der Redundanzpartner von Mhcl ist, wurde eine doppelmutante Fliegenlinie aus *zip*^{2} und *ΔMhcl* erstellt und immunhistologisch analysiert. Dabei war auffällig, dass diese Embryonen ein breites Spektrum an Phänotypen aufweisen, von beinahe wildtypisch bis fast komplett zerstört (Abb. 5.17). Teilweise sind die Embryonen gar nicht mehr als solche erkennbar, außerdem können viele unbefruchtete Eier beobachtet werden. Je nach Zerstörungsgrad der Tiere, der sich von posterior nach anterior ausdehnt (Abb. 5.17 L, Pfeil), ist Folgendes zu beobachten: die Embryonen sind nicht in der Lage, den Dorsalschluss abzuschließen (Abb. 5.17 E, Pfeilkopf), was auf das verwendete *zip*^{2}-Allel zurückzuführen ist, oder den Keimstreif korrekt zurückzuziehen (Abb. 5.17 D, Pfeil). Häufig erscheinen die Tiere um die eigene Achse verdrillt (Daten nicht gezeigt). In der somatischen Muskulatur werden ebenfalls vielfältige Phänotypen deutlich, die Muskeln erscheinen verkürzt, fehlorientiert oder spindelförmig zulaufend (Abb. 5.17 B, Pfeil, Pfeilkopf), teilweise weist das Muskelmuster große Löcher auf (Abb. 5.17 C, Pfeil). Es konnten viele Zellen beobachtet werden, die anhand ihrer Morphologie und des Nachweises der *lmd*-mRNA als FCMs identifiziert wurden (Abb. 5.17 F, Pfeil, L, Pfeilkopf). Das durch den anti-Kettin-Antikörper erzeugte Muster in den Stadien 11 bis 14 unterscheidet sich neben den verstärkt auftretenden FCMs und den auf

die allgemeine Morphologie der Tiere zurückzuführenden Störungen kaum von dem wildtypischer Embryonen, evtl. sind teilweise die FCs/wachsenden Muskeln stärker gefärbt (Daten nicht gezeigt).

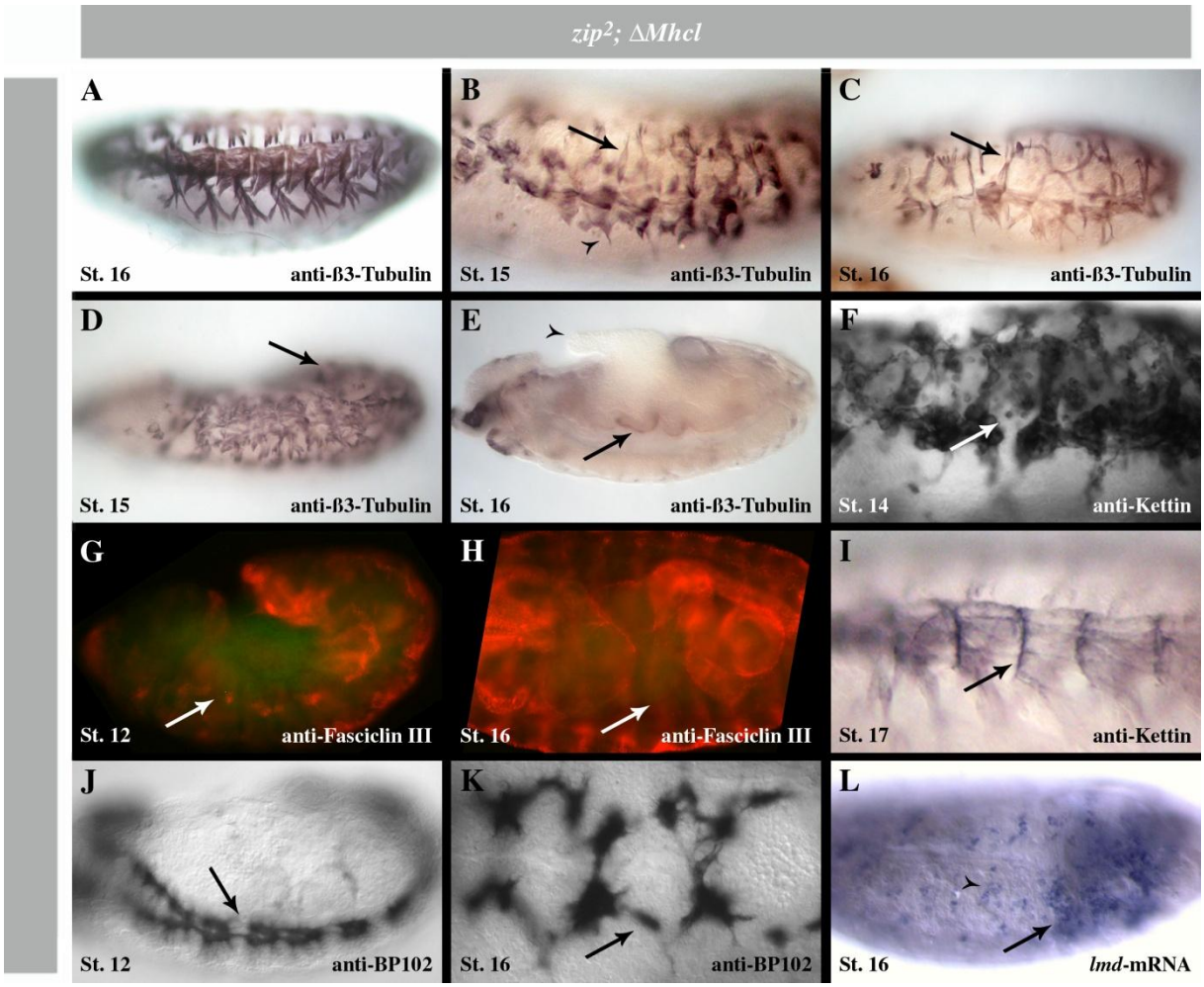

Abb. 5.17: *zip²; ΔMhcl*-doppelmutante Tiere zeigen Störungen in vielfältigen Geweben
Doppelmutante Embryonen zeigen keinen einheitlichen Phänotyp, es treten fast wildtypische (**A**) und in allen Geweben stark gestörte Tiere auf, dabei setzt sich die Störung von posterior nach anterior fort (**L**, Pfeil). Häufig sind eine Verzögerung des Keimstreifrückzugs (**D**, Pfeil) sowie der fehlende Dorsalschluss (**E**, Pfeilkopf) zu beobachten. In der somatischen Muskulatur zeigen sich verkürzte, fehlorientierte oder spindelförmige Muskeln (**B**, Pfeil, Pfeilkopf), teilweise können große Lücken im Muskelmuster beobachtet werden (**C**, Pfeil). Es fallen viele unfusionierte FCMs auf (**F**, Pfeil), deren Identität durch Nachweis der *lmd*-mRNA verifiziert wurde (**L**, Pfeilkopf). Die Anheftung der somatischen Muskeln an die Epidermis findet korrekt statt (**I**, Pfeil). Das Band des viszeralen Mesoderms ist häufig lückenhaft (**G**, Pfeil), die Darmmuskulatur fehlt komplett oder teilweise (**H**, Pfeil) oder ist missgebildet (**E**, Pfeil). Das ZNS zeigt ebenfalls Störungen, welche sich stärker auf die longitudinal verlaufenden Konnektive als auf die Kommissuren auswirken (**J**, **K**, Pfeile). In **K** erfolgt der Blick auf den Embryo von ventral, in **L** von schräg dorsal.

Das viszerale mesodermale Band, sichtbar gemacht durch den anti-Fasciclin III-Antikörper, ist oft unterbrochen, teilweise zeigen die Embryonen, zumindest in manchen Bereichen des Mitteldarms, kein viszerales Mesoderm (Abb. 5.17 G, H, Pfeile). Auch das ZNS, welches mittels anti-BP102-Antikörper dargestellt wird, ist zerstört, wobei die longitudinal

verlaufenden Konnektive stärker gestört erscheinen als die Kommissuren (Abb. 5.17 J, K, Pfeile). Bei Tieren mit weniger starkem Phänotyp konnte eine korrekte Anheftung der somatischen Muskeln an die Epidermis beobachtet werden (Abb. 5.17 I, Pfeil), wie schon bei *zip*^{2}-Embryonen beschrieben war die vermutlich fehlerhafte Bildung der larvalen Sarkomere nicht detektierbar. Mit Hilfe von Immunhistologie gegen Tinman konnte gezeigt werden, dass das Herz zwar spezifiziert, durch die gestörte Morphologie aber ebenfalls nicht korrekt gebildet wird (Daten nicht gezeigt).

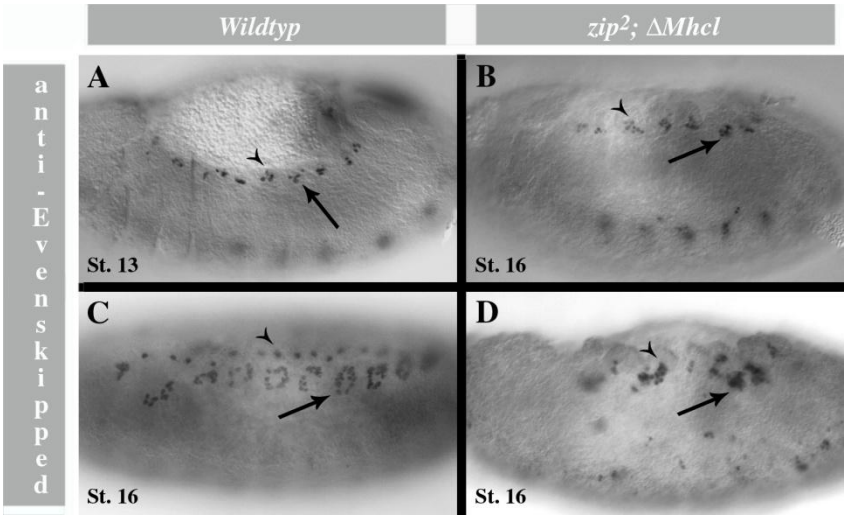

Abb. 5.18: Anti-Even-skipped-Antikörperfärbungen zeigen eine reduzierte mesodermale Fusionsrate in *zip*^{2}*; ΔMhcl*-Embryonen
Dieser Antikörper markiert pro Hemisegment zwei Pericardzellen (Pfeilköpfe) sowie die Kerne des sich bildenden DA-Muskels 1 (**A, C**). Doppelmutante Embryonen zeigen meist zwei- bis vierkernige Muskeln (**B**, Pfeil), die in etwa 25 % der Fälle auftauchenden Kernanhäufungen (**D**) sind wahrscheinlich auf fehllokalisierte Zellkerne anderer Hemisegmente zurückzuführen.

Alle analysierten Gewebe scheinen korrekt spezifiziert zu werden und nur aufgrund der morphologischen Besonderheiten der Embryonen nicht ihre wildtypische Struktur auszubilden. Ob die Störungen der somatischen Muskulatur ausschließlich auf diesen sekundären Effekt zurückzuführen sind oder die unfusionierten FCMs auf einen Defekt der Myoblastenfusion hinweisen, wurde mittels Immunhistologie gegen Eve (Evenskipped) untersucht. Der Transkriptionsfaktor Eve ist zwischen Stadium 11 und 16 pro Hemisegment in je zwei Pericardzellen (Abb. 5.18, Pfeilköpfe), sowie dem Kern der FC für den DA (dorsal acute)-Muskel 1 nachweisbar (Abb. 5.18 A, Pfeil). Nach Fusion mit dieser FC exprimieren alle FCM-Kerne ebenfalls *eve*, sodass gegen Ende der Embryogenese die charakteristische Form dieses Muskels erkennbar ist (Abb. 5.18 C, Pfeil). *zip*^{2}*; ΔMhcl*-Embryonen zeigen auch am Ende der Embryogenese meist nur zwei bis drei Eve-positive Kerne pro Hemisegment (Abb. 5.18 B, Pfeil), was dafür spricht, dass diese Tiere nur die erste Fusionsphase abschließen können. In etwa 25 % der doppelmutanten Tiere sind Eve-positive Kerne zu erkennen, die sich zu Gruppen anordnen (Abb. 5.18 D, Pfeil). Dies spricht hingegen für einen korrekten Fusionsablauf, ist aber nur in Embryonen zu beobachten, deren allgemeine Morphologie extrem gestört ist. Bei näherer Betrachtung zeigte sich, dass diese Kern-Ansammlungen wahrscheinlich auf

Zellen mehrerer Hemisegmente zurückzuführen sind, da an der entsprechenden Position anderer Hemisegmente keine Eve-positiven Kerne detektierbar sind (Abb. 5.18 D).

Abschließend wurden Gendosisexperimente durchgeführt, um herauszufinden, welche der beiden Mutationen den beschriebenen Phänotyp mehr beeinflusst. Dabei zeigte sich, dass das Entfernen einer Kopie *zip* aus *ΔMhcl*-Embryonen keinen mit dem anti-β3-Tubulin- oder anti-Eve-Antikörper detektierbaren Phänotyp hervorruft. zip^2-Embryonen mit nur einer Kopie *Mhcl* hingegen zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie homozygote zip^2; *ΔMhcl*-Embryonen (Daten nicht gezeigt).

Es wurde gezeigt, dass Myo95E nicht der Redundanzpartner von Mhcl ist, da doppelmutante Embryonen keinerlei Störungen im somatischen oder viszeralen Mesoderm aufweisen. Aufgrund der geringen Homologie der Proteine ist dies nicht verwunderlich. Zip hingegen ist zwar stärker konserviert, dessen Mutation verursacht aber ebenfalls keine schwerwiegenden Störungen. Zip wurde als Redundanzpartner eindeutig identifiziert, da zip^2; *ΔMhcl*-Embryonen vielfältigste Störungen in allen analysierten Geweben zeigen. Wahrscheinlich hat der Funktionsverlust Auswirkungen auf sehr frühe Embryonalstadien, da alle Gewebe angelegt werden, aber nicht korrekt differenzieren, die beobachteten Phänotypen wären dann nur sekundärer Natur. Die reduzierte Fusionsrate hingegen lässt auf eine essentielle Funktion der beiden Myosine am Fusionsprozess schließen.

5.2 CG10737

5.2.1 Nachweis der *CG10737*-mRNA in *D. melanogaster*-Embryonen

5.2.1.1 Die Expression des Gens *CG10737* ist im sich entwickelnden somatischen und viszeralen Mesoderm sowie dem ZNS detektierbar

Aus Studien diverser Fusionsprozesse ist bekannt, dass bestimmte Proteine mit Hilfe von C2-Domänen in Membranen inserieren, was zunächst zur Konformationsänderung und anschließend zur Fusion der Membranen führt (Martens and McMahon, 2008). Bisher wurden noch keine Moleküle identifiziert, die eine solche fusionsfördernde Aufgabe während der Myogenese übernehmen. Daher wurde die mRNA-Verteilung mehrerer C2-Domänen-Proteine analysiert, um durch das Expressionsmuster einen Hinweis auf eine mögliche Beteiligung an der Fusion von FC/wachsendem Muskel und FCM zu bekommen (D. Buttgereit, persönliche Mitteilung, Diemer, Bachelorarbeit 2009). Das in dieser Arbeit charakterisierte *CG10737* erstreckt sich über einen genomischen Bereich von etwa 14 kb auf dem rechten

Arm des zweiten Chromosoms bei 56C1. Für das Gen werden zwölf Isoformen postuliert, deren Transkriptlängen sich zwischen 2854 und 3513 bp und deren Proteinlängen sich zwischen 812 und 955 Aminosäuren bewegen (Abb. 5.19, Flybase).

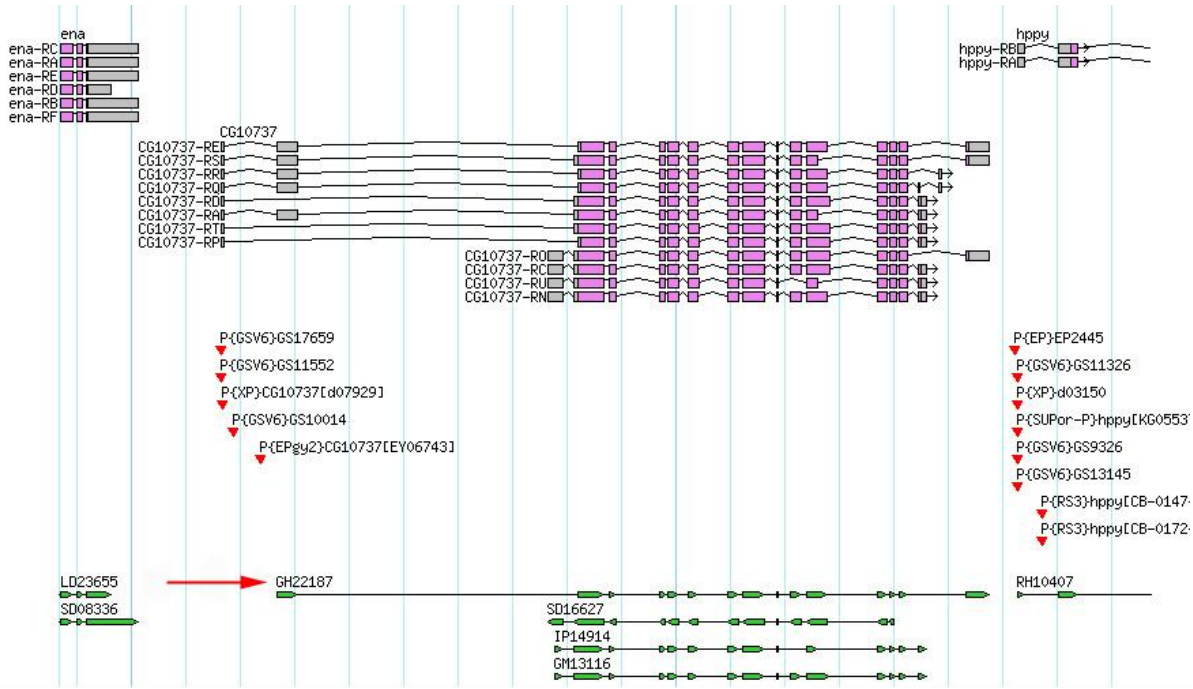

Abb. 5.19: Schematische Darstellung der genomischen Organisation von *CG10737*
Das Gen befindet sich auf dem rechten Arm des zweiten Chromosoms bei 56C1 und kodiert laut Vorhersagen zwölf Isoformen (*CG10737-RA, -RC bis -RE, -RN bis -RU*). Stromaufwärts ist das Gen *ena* (*enabled*), stromabwärts *hppy* (*happyhour*) lokalisiert. Die zur Verfügung stehenden P-Element-Insertionslinien sowie cDNAs sind vermerkt, in dieser Arbeit wurde ausschließlich GH22187 verwendet (Pfeil) (verändert nach Flybase).

Es wurden Sonden gegen die cDNA GH22187 erstellt, welche die Isoform CG10737-PE kodiert (Abb. 5.19, Pfeil), die neben einer intern lokalisierten C2-Domäne eine N-terminale Transmembrandomäne sowie eine C-terminale C1-Domäne besitzt (Abb. 5.20, Smart). C1-Domänen sind Cysteinreiche Domänen, die Phorbolester, Diacylglycerol oder RasGTP binden können, teilweise in Abhängigkeit von Zinkionen (Smart). Andere Isoformen des Gens kodieren teilweise eine zweite, ebenfalls N-terminal lokalisierte, Transmembrandomäne.

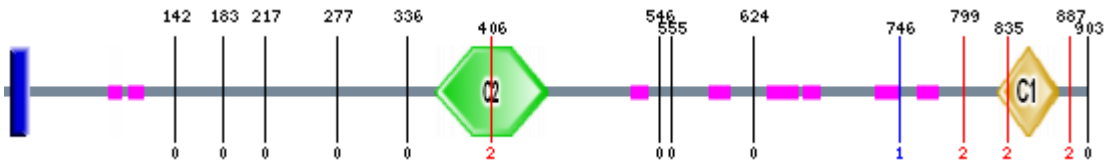

Abb. 5.20: Aktuelles Modell der Domänenstruktur von CG10737-PE
Das Protein besteht aus 903 Aminosäuren und bildet eine N-terminale Transmembrandomäne (blau), eine intern lokalisierte C2-Domäne (grün) und eine C-terminale C1-Domäne (orange) sowie mehrere Bereiche geringer Komplexität (pink) aus. Vertikale Linien markieren die Position der Intron-Exon-Übergänge, die darüber angeordneten Zahlen geben die exakten Aminosäurepositionen an (von Smart).

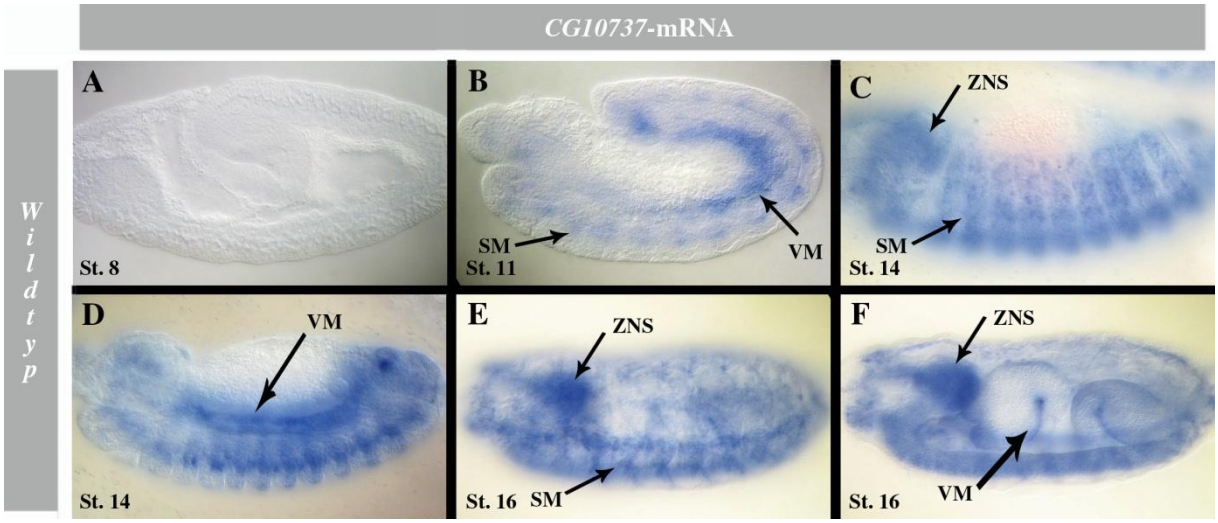

Abb. 5.21: Die mRNA von *CG10737* ist während der Myoblastenfusion zu detektieren
Gezeigt sind *in situ*-Hybridisierungen an wildtypischen Embryonen mit RNA-Sonden, die gegen die cDNA GH22187 erstellt wurden. Das Transkript ist ab Stadium 11 bis zum Ende der Embryonalentwicklung sowohl im viszeralen als auch im somatischen Mesoderm detektierbar (**B** - **E**, VM bzw. SM), zusätzlich kann ab Stadium 14 die Expression im ZNS beobachtet werden (**C**, **F**). Die Stadien 1 bis 10 sind ungefärbt (**A**), weshalb postuliert wird, dass das Protein nicht mittels maternaler Komponente zur Verfügung gestellt wird.

Es wird postuliert, dass die mRNA der hier verwendeten Isoform *CG10737-RE*, ebenso wie die der Varianten *CG10737-RC* und *-RU*, im Embryo am stärksten exprimiert wird (Flybase). Eigene *in situ*-Hybridisierungen an wildtypischen Embryonen zeigen, dass das *CG10737*-Transkript nicht maternal zur Verfügung gestellt wird, da weder im Stadium des synzytialen Blastoderms noch während der Gastrulation mRNA detektiert wird (Abb. 5.21 A). Die zygotische Expression ist ab Stadium 11 sowohl im viszeralen als auch im somatischen Mesoderm zu beobachten (Abb. 5.21 B, VM bzw. SM), ab Stadium 14 wird zusätzlich die Verteilung des Transkripts im ZNS detektiert (Abb. 5.21 C, Pfeil), dies bleibt jeweils bis zum Ende der Embryogenese bestehen (Abb. 5.21 D-F).

5.2.1.2 *Notch*-nullmutante Embryonen zeigen ein verbreitertes *CG10737*-Expressionsmuster

Da die *CG10737*-Expression spezifisch im somatischen und viszeralen Mesoderm nachweisbar ist, wurden *in situ*-Hybridisierungen an mutanten Embryonen durchgeführt, um einen Hinweis auf die zelltypspezifische Verteilung des Transkripts zu bekommen. *Notch*$^{264-39}$-Embryonen bilden mehr FCs als wildtypische Embryonen (Baker and Schubiger, 1996) und zeigen ein verbreitertes *CG10737*-Expressionsmuster (vgl. Abb. 5.22 A, B mit Abb. 5.21 C). Daher wird angenommen, dass das Gen hauptsächlich oder ausschließlich in den FCs transkribiert wird. Durch die starke Expression im Mesoderm musste die Färbereaktion noch vor der Detektierung der mRNA im ZNS abgestoppt werden (Abb. 5.22 A). Die ektopische

Expression der dominant-negativen Variante des EGF-Rezeptors im Mesoderm beeinträchtigt lediglich die Bildung weniger mesodermaler Gruppen (Carmena et al., 1998) und hat keine Auswirkungen auf das *CG10737*-Expressionsmuster (Abb. 5.22 C, D).

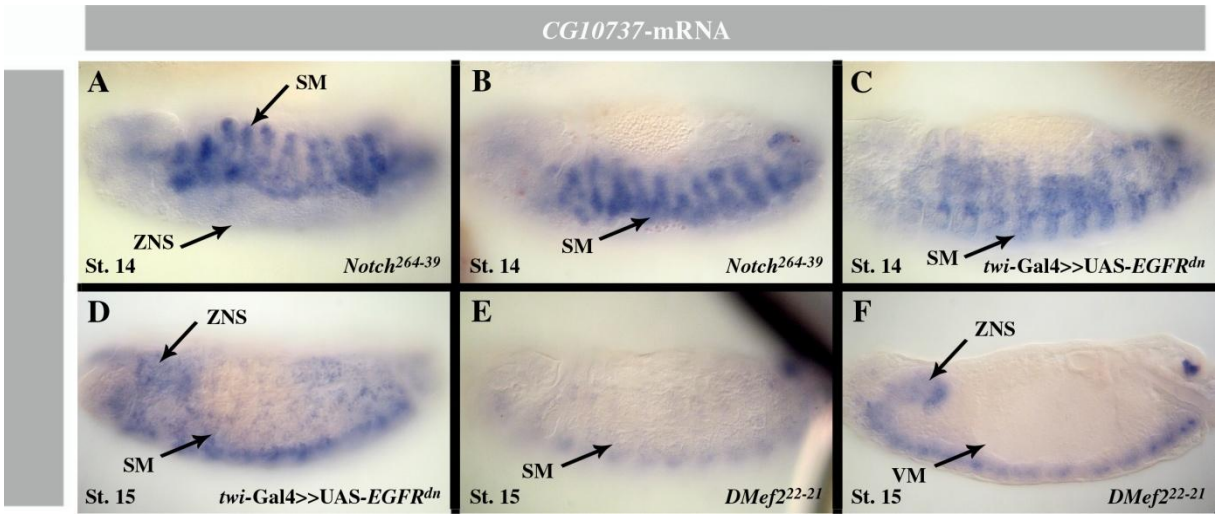

Abb. 5.22: *in situ*-Hybridisierungen an mutanten Embryonen geben Hinweise auf die Regulation der *CG10737*-Expression und deren Spezifität
Das Muster der mRNA-Verteilung im somatischen Mesoderm (SM) ist in *Notch*$^{264-39}$-nullmutanten Embryonen im Vergleich zu wildtypischen stark verbreitert, was auf eine FC-spezifische Expression des Gens hinweist (**A**, **B**). In diesen Embryonen kann kein mRNA-Nachweis im ZNS erkannt werden. Embryonen, die eine dominant-negative Variante des EGF-Rezeptors exprimieren, zeigen eine unveränderte Transkriptmenge im ZNS und somatischen Mesoderm (**C**, **D**, ZNS, SM). Letztere ist, ebenso wie die Expression im viszeralen Mesoderm, in *DMef2*$^{22-21}$-mutanten Embryonen fast nicht mehr nachweisbar, was für eine Regulation der *CG10737*-Expression durch diesen Transkriptionsfaktor spricht, die Expression im Nervensystem erscheint unverändert (**E**, **F**, SM, VM, ZNS).

5.2.1.3 Die mesodermale *CG10737*-Expression ist von DMef2 abhängig

Auch für *CG10737* wurde überprüft, ob die Regulation des Gens vom mesodermalen Transkriptionsfaktor DMef2 abhängig ist, indem *in situ*-Hybridisierungen an *DMef2*$^{22-21}$-Embryonen durchgeführt wurden. In diesen Embryonen ist die mesodermale *CG10737*-Expression im Vergleich zu wildtypischen stark vermindert (vgl. Abb. 5.22 E, SM und F, VM mit Abb. 5.21 E, SM), was für eine Regulation durch DMef2 spricht. Die Expression im ZNS hingegen erscheint unverändert (vgl. Abb. 5.22 F mit Abb. 5.21 F, ZNS). In Chromatin-Co-Immunopräzipitations-Experimenten wurde *CG10737* ebenfalls als Zielgen von DMef2 identifiziert, allerdings nur mit einer Wahrscheinlichkeit, die unterhalb des als signifikant anzusehenden Schwellenwertes lag (Sandmann et al., 2006).

Das Gen *CG10737* ist spezifisch im somatischen und viszeralen Mesoderm exprimiert, und zwar sowohl während der Myoblastenfusion als auch in späteren embryonalen Stadien. Diese Expression ist von der Regulation durch den Transkriptionsfaktor DMef2 abhängig und, zumindest im somatischen Mesoderm, auf die Population der FCs fokussiert.

5.2.2 Die Analyse *CG10737*-defizienter Embryonen ließ keine spezifischen Störungen erkennen

Die spezifische mesodermale Expression von *CG10737* ließ vermuten, dass das Protein in diesen Geweben eine essentielle Funktion übernimmt. Um diese zu analysieren, wurden drei zur Verfügung stehende, molekular charakterisierte Defizienzlinien kreuzungsgenetisch kombiniert, sodass neben *CG10737* noch fünf bzw. vierzehn weitere Gene deletiert werden (Abb. 5.23). Mittels geeigneter Antikörper gegen myogenese-relevante Proteine wurden transheterozygote Embryonen aus *Df(2R)ED3683* und *Df(2R)Exel6069* analysiert, deren *CG10737*-Verlust zusätzlich durch *in situ*-Hybridisierung verifiziert wurde (Daten nicht gezeigt). Dabei zeigte sich, dass der Mitteldarm wildtypisch entwickelt wird (Abb. 5.24 C, Pfeil). Im Gegensatz dazu weisen die Embryonen häufig einen nicht korrekt eingestülpten Kopf (Abb. 5.24 A, B, Pfeilköpfe) sowie Lücken im Muskelmuster auf, die hauptsächlich aus fehlender epidermaler Muskelanheftung resultierten (Abb. 5.24 A, B, Pfeile). Die Muskeln erscheinen teilweise fehlorientiert oder wachsen über die Mittellinie aus (Daten nicht gezeigt).

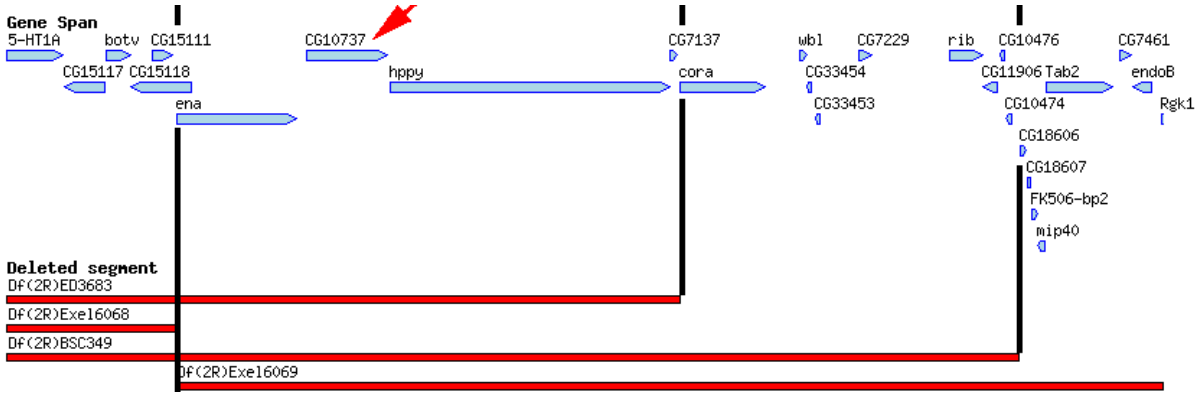

Abb. 5.23: Schematischer Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten *CG10737*-Deletionslinien
Es standen drei molekular charakterisierte Fliegenlinien zur Verfügung (*Df(2R)ED3683*, *Df(2R)BSC349*, *Df(2R)Exel6069*), die *CG10737* deletieren. Durch kreuzungsgenetische Kombination der Linien entstanden transheterozygote Embryonen, die fünf bzw. vierzehn weitere Gene entfernen (verändert nach Flybase).

Die fünf Gene, die in diesen transheterozygoten Embryonen ebenfalls deletiert werden, sind *CG15118*, *CG7137*, *ena (enabled)*, *hppy (happyhour)* und *cora (coracle)* (Abb. 5.23). Die Funktion, die CG7137-P ausübt, ist bisher unbekannt, das Protein verfügt über keine spezifische Domäne (Smart). *CG15118* ist gleichfalls nicht näher charakterisiert, das abgeleitete Protein enthält allerdings zwei Ankyrin-Domänen, die an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind, und vier Ubiquitin-interagierende Motive (Smart). Kürzlich wurde berichtet, dass *hppy* eine Proteinkinase kodiert, die u. a. für das Verhalten nach Ethanolgenuss verantwortlich ist (Corl et al., 2009). Cora wiederum ist das *D. melanogaster*-Homolog des Proteins 4.1 aus Vertebraten und u. a. am Dorsalschluss sowie der korrekten Bildung des Tracheen- und

Nervensystems beteiligt. Ena schließlich reguliert die kontinuierliche Aktinpolymerisierung und ist für die Wegfindung der Axone, der Bildung der Synapsen sowie die Augenentwicklung verantwortlich. *ena* wird von der Kinase Abelson reguliert, die in Vertebraten ebenfalls WASP phosphoryliert und so das Aktinzytoskelett beeinflusst (Flybase).

Um herauszufinden, ob die Defekte der transheterozygoten Embryonen auf den Verlust von *CG10737* oder eines der anderen Gene zurückzuführen sind, wurden verschiedene mutante Fliegenlinien für *cora* und *ena* analysiert. Aufgrund der Datenlage wurde es als eher unwahrscheinlich eingestuft, dass die anderen Gene dafür verantwortlich sein könnten. *P{lacW}cora*^{k08713} trägt eine letale P-Insertion im N-terminalen Bereich des Gens, die entsprechenden Embryonen zeigen ein wildtypisches somatisches Muskelmuster sowie einen unauffälligen Mitteldarm (Daten nicht gezeigt). Allerdings wurden weit weniger mutante Embryonen als erwartet beobachtet, was für diese Linie bisher nicht beschrieben wurde, vielmehr wurden nur Unregelmäßigkeiten an den Synapsen beobachtet (Flybase). *ena*^{210}-mutante Embryonen weisen einen Aminosäure-Austausch im ersten Exon des Gens auf, bisher wurden ausschließlich Defekte im Nervensystem berichtet. Es zeigte sich, dass ein Teil dieser Embryonen phänotypische Ähnlichkeiten zu den analysierten transheterozygoten Embryonen aufweist (Abb. 5.24 D, Pfeil, Pfeilkopf), es wurden allerdings auch Tiere beobachtet, deren Keimstreifrückzug verzögert ist (Abb. 5.24 E, Pfeil) oder die um ihre eigene Achse verdrillt und verkürzt erscheinen (Daten nicht gezeigt). Das anti-Fasciclin III-Muster ist, je nach Morphologie der Embryonen, relativ wildtypisch ausgeprägt oder kaum vorhanden (Daten nicht gezeigt). *P{PZ}ena*^{02029} liegt eine letale P-Insertion im N-terminalen Bereich des Gens, der mit dem N-terminalen Bereich von *CG15118* überlappt, zugrunde. Die mutanten Embryonen, die bisher noch nicht näher charakterisiert wurden, ähneln in eigenen Experimenten phänotypisch ebenfalls den transheterozygoten Embryonen, zusätzlich sind häufig extreme Dorsalschlussprobleme zu beobachten (Abb. 5.24 F, Pfeil, Pfeilkopf bzw. Daten nicht gezeigt). Ähnliche Ergebnisse wurden im Labor von S. Önel erzielt (persönliche Mitteilung). Dadurch ist davon auszugehen, dass die Mutationen der transheterozygoten Embryonen nicht auf das Fehlen von *CG10737* sondern vielmehr von *ena* zurückzuführen sind.

Zusätzlich wurden Experimente durchgeführt, in welchen *CG10737*-RNA-Interferenz mit den Treiberlinien *rP298*-GAL4, *sns*-GAL4 oder *1151*-GAL4 induziert wurde. Hier waren keine Auswirkungen auf das somatische Mesoderm zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Die Aktivierung der Interferenz mit *DMef2*-GAL4; UAS-*Dcr2* erzeugt hingegen pupale Letalität. Sehr vorläufige Analysen dieser Tiere zeigten schmalere abdominale Muskeln ohne korrekt etablierte Sarkomere bei 93 Stunden nach Bildung der Puppenhülle, wobei die Thorax-

muskeln entweder ganz fehlen oder sehr schmal sind (Daten nicht gezeigt). Wie unter 5.1.7 beschrieben, sollten diese Daten allerdings vorsichtig interpretiert und durch passende Kontrollen verifiziert werden.

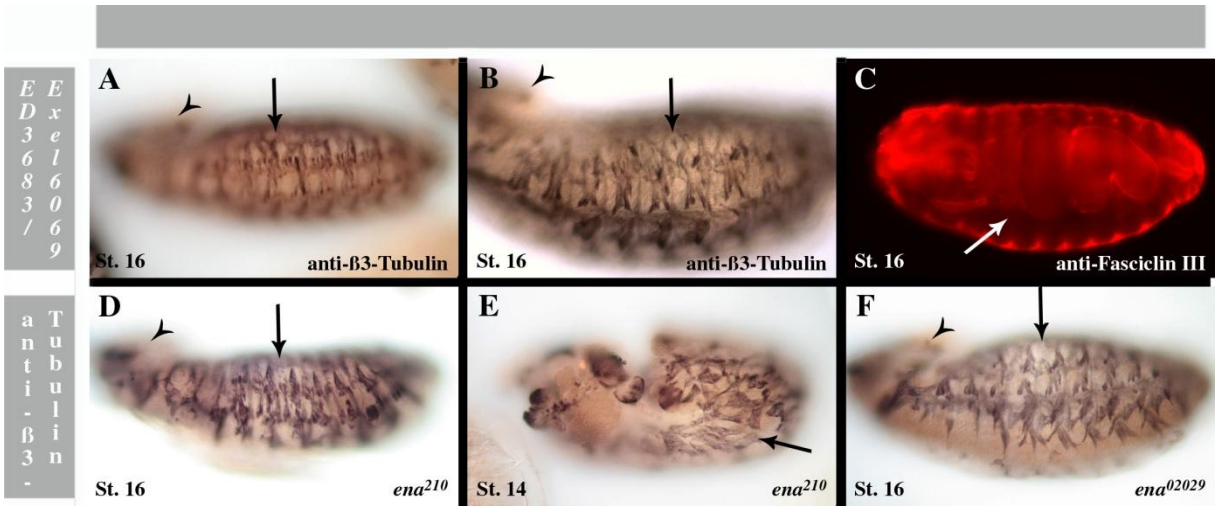

Abb. 5.24: Der in *Df(2R)ED3683/Df(2R)Exel6069*-transheterozygoten Embryonen beobachtete Phänotyp ist nicht auf das Fehlen von *CG10737* zurückzuführen
Transheterozygote Embryonen sind nicht in der Lage, den Kopf korrekt einzustülpen und zeigen einen wildtypisch entwickelten Mitteldarm sowie Unregelmäßigkeiten im somatischen Muskelmuster (**A** - **C**, Pfeile, Pfeilköpfe). Mutante Embryonen für das ebenfalls deletierte *enabled* zeigen die gleichen Auffälligkeiten im Kopfbereich und somatischen Mesoderm (**D**, **F**, Pfeile, Pfeilköpfe), teilweise ist der Keimstreifrückzug verlangsamt (**E**).

Die Analyse transheterozygoter Embryonen, die u. a. *CG10737* und *ena* deletieren, zeigte das Auftreten von Problemen bei der Kopfeinstülpung sowie nicht korrekt angeheftete somatische Muskeln, was wahrscheinlich auf Unregelmäßigkeiten in der Wegfindung der Muskeln beruht. Durch Experimente an *ena*-mutanten Embryonen wurde gezeigt, dass alle beobachteten Phänotypen auf das Fehlen dieses Gens zurückzuführen sind.

5.2.3 Ein Konstrukt zur ektopischen Expression von *CG10737* ist zwar funktional, das Fusionsprotein kann in transgenen Embryonen aber nicht nachgewiesen werden

Um die Lokalisation von CG10737-P auch auf Proteinebene verfolgen zu können, wurde der komplette Leserahmen inklusive eines HA-Anhangs in einen induzierbaren Expressionsvektor kloniert (pBB34) und transgene Fliegenlinien etabliert. Die ektopische Expression des Fusionsproteins im Mesoderm führt nicht zu Störungen dieses Gewebes (Daten nicht gezeigt), wobei aber der Nachweis des Konstrukts weder auf mRNA-Ebene mittels *in situ*-Hybridisierung noch auf Proteinebene mittels des anti-HA- oder anti-CG10737-P-Antikörpers (siehe 5.2.4) erfolgreich war (Daten nicht gezeigt). Allerdings ist das Konstrukt *per se* funktional, da in Western-Blot-Analysen an Proteinextrakten aus SL2-Zellen, die zur

ektopischen Expression des Konstrukt induziert wurden, das Fusionsprotein spezifisch und mit dem berechneten Molekulargewicht von etwa 100 kDa detektiert wird (Abb. 5.25).

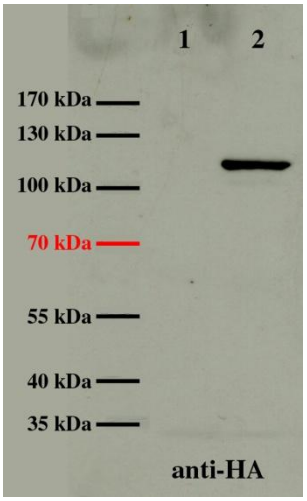

Abb. 5.25: Die Funktionalität eines UAS-*CG10737-HA*-Konstrukts in Zellkultur ist mittels Western-Blot-Analyse nachweisbar
Der anti-HA-Antikörper erkennt spezifisch das in SL2-Zellen ektopisch exprimierte Fusionsprotein mit einem berechneten Molekulargewicht von etwa 100 kDa (**2**, Co-Transfektion mit *act*-GAL4), wohingegen der Proteinextrakt untransfizierter Zellen als Negativ-Kontrolle kein Signal liefert (**1**).

Obwohl mittels Western-Blot-Analysen an Proteinextrakten aus SL2-Zellen gezeigt wurde, dass das UAS-*CG10737-HA*-Konstrukt funktional ist, war es nicht möglich, die ektopische Expression des Fusionsproteins in transgenen *D. melanogaster*-Embryonen nachzuweisen.

5.2.4 Ein aufgereinigter Peptidantikörper gegen CG10737-P erkennt Strukturen im somatischen Mesoderm

Da die mRNA von *CG10737* spezifisch im somatischen und viszeralen Mesoderm detektiert wird (siehe 5.2.1.1), ist davon auszugehen, dass auch das Protein dort lokalisiert. Um dessen subzelluläre Verteilung analysieren zu können, wurde ein Peptidantikörper generiert, wobei zwei unterschiedliche Peptide (Peptid 4, entspricht Aminosäureposition 251 - 268 und Peptid 14, entspricht Aminosäurepostition 858 - 874 des Proteins, Abb. 5.20) zur Immunisierung von je zwei Kaninchen und zwei Meerschweinchen verwendet wurden (Immunisierung durchgeführt von Pineda – Antikörper-Service, Berlin). Mit den gereinigten IgGs wurden immunhistologische Färbungen an wildtypischen Embryonen durchgeführt, wobei sich ein sehr uneinheitliches Bild bot. Die unterschiedlichen Fraktionen detektieren fast jedes embryonale Gewebe (Abb. 5.26, Tabelle 2), wobei keinerlei Regelmäßigkeit zu erkennen ist. In hitzefixierten Embryonen erkennen die Fraktionen anti-CG10737-P (Peptid 4 Kaninchen 2) und anti-CG10737-P (Peptid 4 Meerschweinchen 2) regelmäßig die voll entwickelten somatischen Muskeln (Abb. 5.26 A, B, Pfeile), bei anti-CG10737-P (Peptid 14 Kaninchen 1) ist dies nur manchmal der Fall. Nur diese Fraktionen wurden im Weiteren schwerpunktmäßig bearbeitet, da für diese Arbeit die somatische Myogenese im Vordergrund steht.

Tabelle 2: Zusammenfassung der detektierten Gewebe durch die unterschiedlichen, jeweils gegen das Peptid gereinigten, IgG-Fraktionen des anti-CG10737-P-Antikörpers

verwendete Fraktion und Konzentration (hf/faf)	**detektierte Gewebe**
Peptid 4	
Kaninchen 1 1 : 1 000/1 : 300	Herz, Pharynx und Hinterdarm (jeweils stark lokalisiert), Tracheen (-öffnungen des Hauptastes), Speicheldrüsen, Gonaden, segmentale Zellcluster in der Epidermis (wahrscheinlich zum PNS gehörig)
Kaninchen 2 1 : 1 000/1 : 300	entwickelte somatische Muskeln, epidermale Muskel-Anheftungsstellen, Gonaden, Pericardzellen, Vorderdarm, segmentale Zellcluster in der Epidermis (wahrscheinlich zum PNS gehörig)
Meerschweinchen 1 1 : 300/1 : 50	Gonaden, Pharynx, Bereiche der Tracheen
Meerschweinchen 2 1 : 200/1 : 50	Pharynx, Vorderdarm (jeweils stark lokalisiert), Tracheen (zwei bestimmte anteriore Äste), entwickelte somatische Muskeln
Peptid 14	
Kaninchen 1 1 : 2 000/1 : 100	Chromatin im synzytialen Blastoderm, Gonaden, Tracheen, Herz, Speicheldrüsen, Malpighische Gefäße, ZNS-Mittellinie, entwickelte somatische Muskeln (schwach)
Kaninchen 2 1 : 2 000/1 : 100	Tracheen (ab Stadium 11), Malpighische Gefäße, Speicheldrüsen
Meerschweinchen 1 1 : 300/1 : 50	Tracheenöffnungen in der Epidermis, Malpighische Gefäße, ZNS, Speicheldrüsen, Hinterdarm
Meerschweinchen 2 1 : 200/1 : 50	ZNS, Herz, Tracheen (-öffnungen), Speicheldrüsen

Es sind die Färbeergebnisse bei Verwendung von hitze- und paraformaldehyd-fixierten (hf bzw. faf) Embryonen angegeben. Generell gilt, dass die gleiche Fraktion in unterschiedlich fixierten Embryonen selten die gleichen Gewebe detektiert.

Ob die Färbung der somatischen Muskulatur auf einer spezifischen Detektierung durch den Antikörper beruht, konnte nicht abschließend geklärt werden, da trotz mehrmaliger Durchführung die immunhistologische Färbung an deletierten Embryonen nicht auswertbar war (Daten nicht gezeigt). Allerdings beruht zumindest die gleichzeitig auftauchende Färbung der Tracheen und Chordotonalorgane bei Verwendung des anti-CG10737-P-Antikörpers

(Peptid 14 Kaninchen 1) nicht auf einer spezifischen Reaktion, da diese auch in Embryonen identifiziert werden kann, die *CG10737* deletieren (Abb. 5.27 D, E).

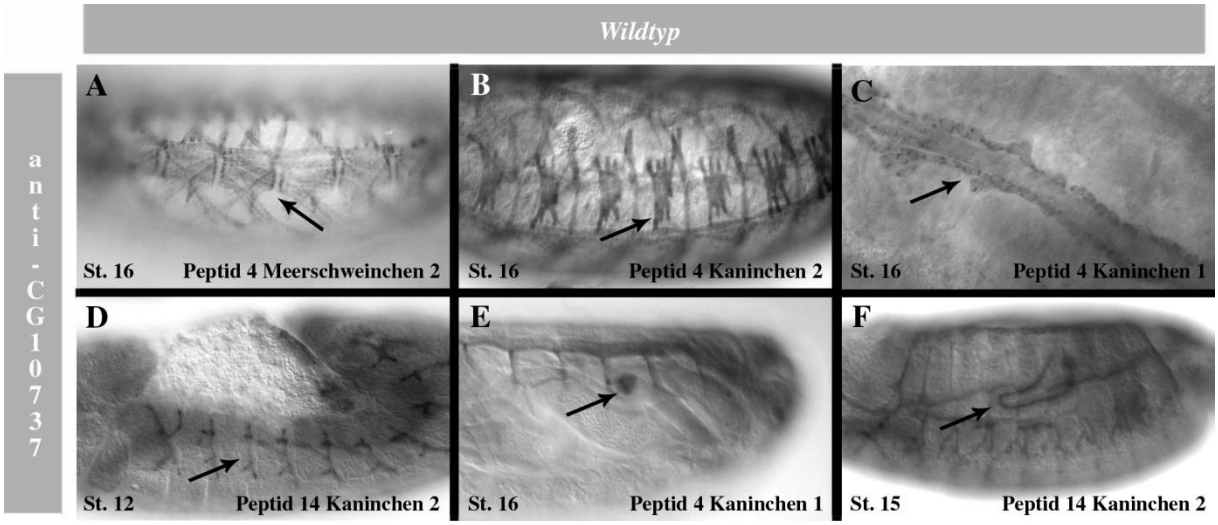

Abb. 5.26: Unterschiedliche Fraktionen des anti-CG10737-P-Antikörpers detektieren unterschiedliche embryonale Gewebe
Es wurde ein anti-CG10737-P-Antikörper gegen zwei unterschiedliche Peptide des Proteins generiert, wobei jeweils zwei Kaninchen und zwei Meerschweinchen immunisiert wurden (Peptid 4 und 14). In hitzefixierten wildtypischen Embryonen färben dabei die diversen Fraktionen ganz unterschiedliche Gewebe wie somatische Muskeln ab Stadium 16 (**A**, **B,** Pfeile), Pericardzellen (**C,** Pfeil) Tracheen (**D,** Pfeil), Gonaden (**E,** Pfeil) und Malpighische Gefäße (**F,** Pfeil). Es ist die jeweils verwendete Antikörperfraktion angegeben. In **C** erfolgt der Blick auf den Embryo von dorsal.

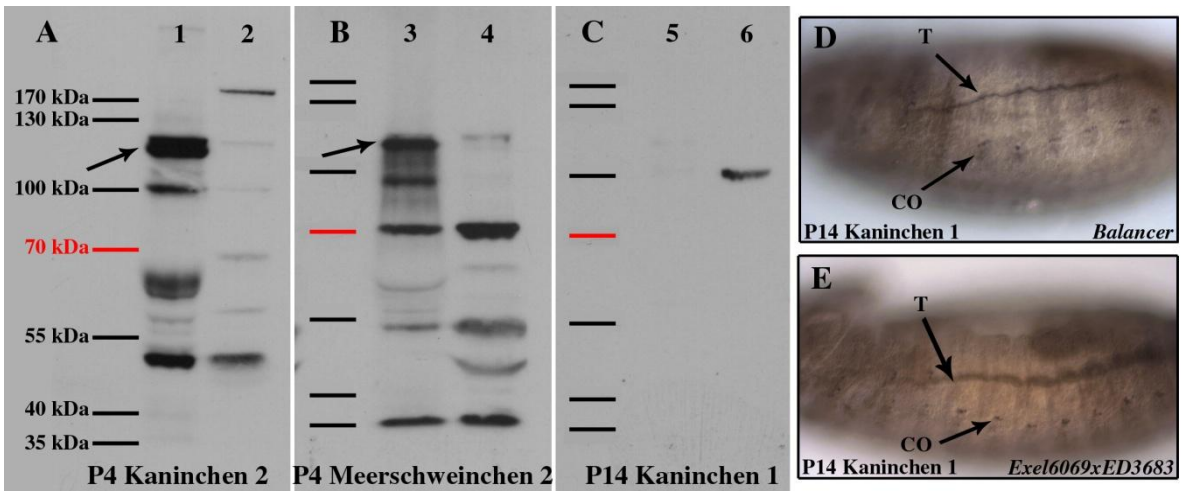

Abb. 5.27: Die Spezifität des anti-CG10737-P-Antikörpers konnte nicht bewiesen werden
In Western-Blot-Analysen an Proteinextrakten aus Zellen, die UAS-*CG10737-HA* ektopisch exprimieren, detektieren unterschiedliche Fraktionen des anti-CG10737-P-Antikörpers nicht ausschließlich das Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von 100 kDa (**1**, **3**, **5**, Pfeile). Die Muster sind nicht identisch, gleiches gilt für die Verwendung embryonaler Proteinextrakte (**2**, **4**, **6**). Es wurden folgende Verdünnungen verwendet: anti-CG10737-P-Antikörper (Peptid 4 Kaninchen 2) 1 : 1 000, (Peptid 4 Meerschweinchen 2) 1 : 250, (Peptid 14 Kaninchen 1) 1 : 2 000. Die Färbung in den Tracheen (T) und Chordotonalorganen (CO) bei Verwendung des anti-CG10737-P-Antikörpers (Peptid 14 Kaninchen 1) beruht nicht auf einer spezifischen Detektierung des Proteins (**D**, **E**).

Es wurden Western-Blot-Analysen an Proteinextrakten aus SL2-Zellen durchgeführt, welche zur Expression von UAS-*CG10737-HA* induziert worden waren (siehe 5.2.3). Hier detektieren zwei der drei Fraktionen eine Bande, die dem ektopisch exprimierten Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 100 kDa entsprechen könnte, aber auch noch einige weitere (Abb. 5.27 1, 3, 5, Pfeile, vgl. mit Abb. 5.25 2). Zudem ist auch hier das detektierte Muster nicht einheitlich, gleiches gilt für die Verwendung von embryonalen Proteinextrakten (Abb. 5.27 2, 4, 6).
Es wurde ein anti-CG10737-P-Antikörper generiert, indem zwei unterschiedliche Peptide zur Immunisierung von je zwei Kaninchen und Meerschweinchen eingesetzt wurden. Die gereinigten Fraktionen erkennen unterschiedliche embryonale Gewebe, wobei keine Regelmäßigkeit erkennbar ist. Mit drei Fraktionen können entwickelte somatische Muskeln detektiert werden, allerdings war es nicht möglich, die Spezifität dieses Signals zu beweisen.

5.2.5 Der putative Promotorbereich von *CG10737* konnte nicht verifiziert werden

Es wurde versucht, einen tieferen Einblick in die Regulation von *CG10737* zu bekommen, indem nach dem Promotor des Ges gesucht wurde. Wie bereits beschrieben (siehe 5.1.6.2) liegen die Promotoren somatisch exprimierter Gene häufig stromaufwärts des 5´-UTR-Bereichs. Aus diesen Gründen wurden etwa 1,5 kb in einen Reportergenexpressionsvektor kloniert (pBB30) und transgene Fliegenlinien etabliert. Der klonierte Abschnitt stellt den genomischen Bereich zwischen dem 3´-UTR-Exon von *ena* und dem Exon, welches den 5´-UTR der acht längeren *CG10737*-Isoformen kodiert, dar (Abb. 5.19). Immunhistologische Färbungen gegen β-Galaktosidase an diesen transgenen Embryonen liefern aber nur unspezifische Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).
Der Promotor für die Expression von *CG10737* im somatischen Mesoderm liegt nicht im genomischen Bereich zwischen *ena* und *CG10737*, da diese Region nicht in der Lage ist, die Expression des Reportergens *β-Galaktosidase* zu induzieren.

5.2.6 Die Analyse des putativen Interaktionspartners Sec5 ergab keinen Aufschluss über eine mögliche Beteiligung von CG10737-P an bestimmten Signalwegen

Bisher konnte keine Klarheit über die Funktion von CG10737-P im Embryo und speziell während der somatischen Myogenese gewonnen werden. Daher wurde versucht, über die Analyse putativer Interaktionspartner einen Hinweis auf eine mögliche Beteiligung an bestimmten Signalwegen zu bekommen. Sec5 und Mus201, welches wahrscheinlich an der Reparatur von DNA-Brüchen beteiligt ist, wurden durch globale Hefetests als solche identifiziert (DroID). Für Sec5 wurde eine Beteiligung am Membrantransport bereits gezeigt, überdies stellt das Protein ein Mitglied des Exozysten-Komplexs dar, der an Fusionsprozessen beteiligt ist. Da-

her erschien dieses Gen als der wahrscheinlichere Kandidat und wurde genauer untersucht. Zunächst wurde die Expression von *sec5* analysiert, um durch eine mögliche Überlappung des Expressionsbereichs erste Hinweise auf eine tatsächliche Interaktion mit CG10737-P zu bekommen. *in situ*-Hybridisierungen zeigen eine ubiquitäre Expression des Gens (Daten nicht gezeigt), was mit den Daten von BDGP übereinstimmt, hier wird zusätzlich noch postuliert, dass die mRNA durch die Oozyte zur Verfügung gestellt wird. Das somatische Muskelmuster in homozygoten *Df(2L)Exel7016*-Embryonen, welche neben *sec5* noch weitere 22 Gene deletieren, erscheint nicht vollständig wildtypisch, es entsteht häufig der Eindruck zu dünner Muskelfasern, die nicht korrekt an die Epidermis angeheftet sind (Abb. 5.28 A, Pfeil). Auch der Kopfbereich dieser Embryonen ist teilweise nicht korrekt entwickelt (Abb. 5.28 A, C, Pfeilköpfe). Andere homozygote Embryonen dieser Linie hingegen erscheinen wildtypisch (Abb. 5.28 B). Zusätzlich wurden Experimente mit einer *sec5*-RNAi-Linie durchgeführt, wobei die Ergebnisse auch hier, wie bereits beschrieben, mit Vorsicht zu interpretieren sind (siehe 5.1.7). Bei Induktion der RNA-Interferenz mit Hilfe der *sns*-GAL4-, *rP298*-GAL4- oder *1151*-GAL4-Treiberlinie sind die Nachkommen vital und keine Auffälligkeiten zu erkennen. Bei Verwendung der *DMef2*-GAL4; UAS-*Dcr2*-Linie sind die Nachkommen nicht vollständig pupal letal, viele dieser Tiere sind nicht in der Lage, den Vorgang des Schlüpfens abzuschließen. Eine sehr vorläufige Analyse der adulten abdominalen und thorakalen Muskulatur der geschlüpften Tiere ließ aber keine offensichtlichen Defekte erkennen.

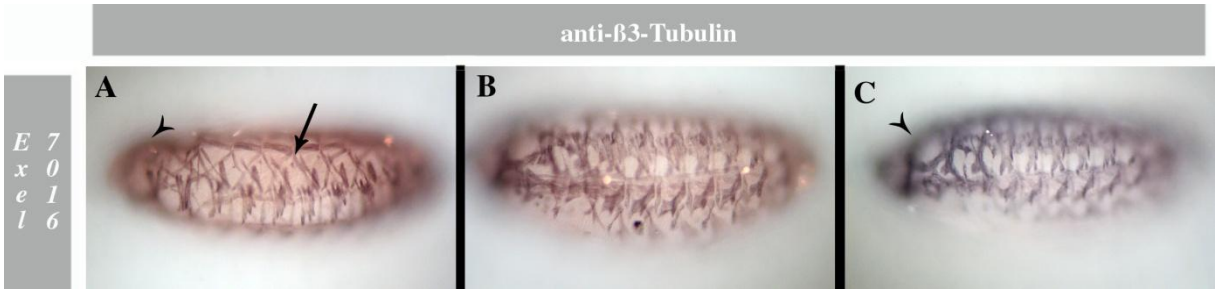

Abb. 5.28: Die Deletion von *sec5* führt zu keinen schwerwiegenden Defekten der somatischen Muskulatur
Homozygote *Df(2L)Exel7016*-Embryonen, die neben *sec5* noch 22 weitere Gene deletieren, zeigen oft eine wildtypische somatische Muskulatur (**B**). Teilweise aber erscheint der Kopfbereich missgebildet (**A**, **C**, Pfeilköpfe) oder die Muskeln schmaler und nicht korrekt an die Epidermis geheftet (**A**, Pfeil).

Die vorläufige Analyse des potenziellen CG10737-P-Interaktionspartners Sec5 lieferte keinen Aufschluss darüber, ob diese Interaktion tatsächlich besteht und an welchem Signalweg die Proteine beteiligt sein könnten. Die ubiquitäre Expression von *sec5* schließt die Interaktion zumindest nicht aus, allerdings konnte nicht abschließend geklärt werden, ob die Deletion des Gens zu einem Phänotyp im somatischen Mesoderm führt oder nicht.

6. Diskussion

6.1 Mhcl

6.1.1 Mhcl wird während der Myoblastenfusionen spezifisch im viszeralen und somatischen Mesoderm exprimiert

6.1.1.1 Mhcl wird zelltypspezifisch in den somatischen und viszeralen FCs exprimiert

Mhcl war ein vielversprechender Kandidat für ein neu zu charakterisierendes Protein mit essentieller Bedeutung für die Myogenese von *D. melanogaster*, beispielsweise als Motorprotein für aktinvermittelte Bewegungungen oder den Transport entlang von F-Aktin. Dieses Myosin wurde als möglicher Interaktionspartner von Rols7 identifiziert (Kreisköther, Dissertation 2005), dessen Funktion während der Myoblastenfusion und epidermalen Anheftung der Muskeln bekannt ist (Chen and Olson, 2001, Kreisköther et al., 2006, Menon and Chia, 2001, Menon et al., 2005, Rau et al., 2001). In einer früheren Arbeit wurde bereits mit der Analyse der mesodermspezifischen Expression des Gens begonnen (Bonn, Diplomarbeit 2006).

Detaillierte Analysen zeigten eine spezifische *Mhcl*-Expression während der myogeneserelevanten Stadien in den FCs, da das Expressionsmuster sowohl bei vermehrter FC-Bildung auf Kosten der FCMs in *Notch*$^{264\text{-}39}$-Embryonen als auch bei eingeschränkter Lmd-Bildung verbreitert ist. Dieser FCM-spezifische Transkriptionsfaktor könnte in den viszeralen FCMs FC-spezifische Gene reprimieren (Cunha et al., 2010, Perissi et al., 2010), was bei Funktionsverlust entfiele. Alternativ könnte es in *lmd*^{E202}-Embryonen zu einer verstärkten Bildung viszeraler FCs auf Kosten der FCMs kommen. Eine solche Auswirkung wurde für den *lmd*-Funktionsverlust bisher weder berichtet noch ausgeschlossen. Für Bereiche des somatischen Mesoderms wurde aber gezeigt, dass sich die FCMs dann zu Perikardzellen oder Vorläufer-Zellen adulter Muskulatur entwickeln (Sellin et al., 2009). Dass das somatische *Mhcl*-mRNA-Muster in *lmd*^{E202}-Embryonen schmaler als in wildtypischen Embryonen erscheint, ist wahrscheinlich auf Unterschiede in der Genregulation zurückzuführen, wie es für *sns* als Lmd-Zielgen bereits gezeigt wurde (Ruiz-Gómez et al., 2002). Zudem ist die *Mhcl*-Expression, resultierend aus der eingeschränkten Fusion, auf die FCs beschränkt. Das nachgewiesene Transkript in Zellen ohne *rP298-lacZ*-Expression belegt daher eher, dass die β-Galaktosidase-Färbung aufgrund methodischer Schwierigkeiten fehlt, als dass es sich hierbei um FCMs handelt. Klarheit über die zelltypspezifische Expression könnten ebenfalls analoge Experimente an Embryonen einer charakterisierten *lmd*-mutanten Linie bringen. Alternativ können auch Embryonen verwendet werden, deren FCMs eindeutig identifizierbar sind oder welche vermehrt FCMs bilden.

6.1.1.2 Die *Mhcl*-Expression wird durch den Transkriptionsfaktor DMef2 reguliert

Chromatin-Immunopräzipitations-Experimente wiesen *Mhcl* mit einem nicht signifikanten Wert als ein direktes Zielgen des Transkriptionsfaktors DMef2 aus (Sandmann et al., 2006). Durch Verwendung mutanter Embryonen wurde allerdings in dieser Arbeit die Regulation von *Mhcl* durch DMef2 im somatischen Mesoderm klar bewiesen. Daher handelt es sich bei *Mhcl* höchstwahrscheinlich um ein indirekt reguliertes Gen. Dies entspricht neuen Daten, wonach *Mhcl* nicht von DMef2 und Lmd direkt reguliert wird (Cunha et al., 2010). Obwohl DMef2 auch im viszeralen Mesoderm aktiv ist, nimmt es dort keinen Einfluss auf die *Mhcl*-Expression, ähnliches wurde bereits für *Mhc* gezeigt (Bour et al., 1995, Sandmann et al., 2006). In den beiden Geweben könnten verschiedene Transkript-Isoformen gebildet werden, deren Bildung durch DMef2, wie schon für Lmd vermutet, unterschiedlich reguliert wird.

Im Gegensatz dazu ist weder die *Mhcl*-Transkription noch die Lokalisation der mRNA von anderen myogeneserelevanten Proteinen oder erfolgreicher Zelladhäsion abhängig, gleichgültig, ob in den analysierten Fusionsmutanten nur die zweite oder beide Fusionsphasen betroffen sind. Da die untersuchten Gene aber keine Transkriptionsfaktoren kodieren, war dies auch nicht zu erwarten. Am wahrscheinlichsten erscheint eine Auswirkung fehlender potenzieller Interaktionspartner auf die Lokalisation des Proteins. Dies könnte mit Hilfe eines funktionalen Antikörpers oder eines Fusionsproteins gezeigt werden, welches mittels eines spezifischen Anhangs zu detektieren ist (siehe 6.3.1).

6.1.2 Ein erzeugter anti-Mhcl-Antikörper detektiert kein endogenes Protein

Um Mhcl auch auf Proteinebene untersuchen zu können, wurde ein Antikörper generiert, welcher ektopisch exprimiertes Protein sowohl in Embryonen als auch in Western-Blot-Analysen an Zell-Extrakten erkennt. Auch nach mehreren Reinigungsschritten, welche die Spezifität des Antikörpers erhöhen sollten, wird dagegen endogenes Protein nicht detektiert. Dies zeigte sich bei Immunhistologie an *Mhcl*-defizienten Embryonen. Zudem stimmen die in Western-Blot-Analysen an embryonalen Proteinextrakten beobachteten Banden nur teilweise mit dem Molekulargewicht der postulierten Isoformen überein, wobei nicht klar ist, inwiefern diese den real gebildeten entsprechen. Durch alternatives Spleißen und die Verwendung unterschiedlicher Promotoren können aus der großen Anzahl an Exons eine Vielzahl von, auch nicht postulierten, Isoformen gebildet werden. Für Mhc und Zip wurde gezeigt, dass so diverse Varianten mit teilweise unterschiedlichen Funktionen entstehen (Eddinger and Meer, 2007, Mansfield et al., 1996, Odronitz and Kollmar, 2008, Suggs et al., 2007, Zhang and Bernstein, 2001). Inwieweit das durch den Antikörper erkannte Bandenmuster der Western-Blot-Analyse

Spezifität widerspiegelt, könnte durch Verwendung embryonaler *ΔMhcl*-Proteinextrakte geklärt werden. Im Sarkomer reifer Muskeln werden zwei distinkte Banden detektiert, welche an die Z-Scheiben angrenzen. Obwohl die Spezifität dieses Musters nicht abschließend geklärt werden konnte, weist es doch sehr große Ähnlichkeit zum Nachweis des homologen Proteins in Mäusen auf (Ajima et al., 2008). Die ektopische Expression von Mhcl in larvalen Muskeln könnte zur Klärung der Spezifität dieser Färbung beitragen. Eindeutige Ergebnisse sind allerdings nur bei der Verwendung von Tieren ohne funktionales Mhcl zu erwarten.

Fünf zufällig durch das Immunsystem ausgewählte und prozessierte Aminosäuren definieren die Spezifität eines Antikörpers (Frank, 2002). Daher ist es nicht verwunderlich, wenn trotz Verwendung eines einzigartigen Protein-Fragments kein spezifischer Antikörper gebildet wird. Der anti-Mhcl-Antikörper detektiert u. a. ektopisches Protein, was darauf hindeutet, dass endogenes Mhcl in geringerer Konzentration als ektopisches vorliegt oder das zu detektierende Epitop für den Antikörper unzugänglich ist. Dies kann beispielsweise auf Mitglieder von Protein-Komplexen zutreffen. Bei ektopischer Expression könnten diese Komplexe aufgrund fehlender Interaktionspartner nicht etabliert werden. Verschiedene Techniken können Protein-Komplexe auflösen, z. B. die Fixierung von Embryonen mit Hitze anstelle von Paraformaldehyd oder die Benutzung von SDS in der Western-Blot-Analyse. Die Verwendung präparierter Gewebe könnte zudem die Färbung intensivieren, da die Zugänglichkeit des Antikörpers zu den zu detektierenden Epitopen erhöht ist (Guerin and Kramer, 2009b).

6.1.3 Es konnte nicht geklärt werden, ob die Expression eines C-terminalen Mhcl-Fragments als eine dominant-negative Version des Protein wirkt

Wie die rote Augenfarbe der etablierten transgenen Fliegen eindeutig beweist, hat die P-Element-vermittelte Integration eines induzierbaren Konstrukts zur Expression des kompletten Mhcl-Proteins inklusive Myc-Anhangs stattgefunden. Allerdings konnte das Fusionsprotein weder auf RNA- noch auf Protein-Ebene nachgewiesen werden. Dies könnte auf der zufälligen Integration des P-Elements in genomische Bereiche beruhen, welche keine hohe Genaktivität aufweisen oder ständig reprimiert werden. Die ektopische Expression ist auch nicht durch Kultivierung der Fliegen bei 29 °C induzierbar. Das verwendete UAS-GAL4-System basiert auf einem Transkriptionsaktivator der Bäckerhefe und zeigt bei dieser optimalen Temperatur höchste Aktivität (Brand and Perrimon, 1993, Kramer and Staveley, 2003). Mehrfache Anhänge erhöhen die Sensitivität der Detektion im Vergleich zu einfachen Anhängen (Zhang et al., 2001), welche häufig für einen Nachweis in Embryonen, im Gegensatz zu Zellkultur-basierten Methoden, nicht ausreichen (Beobachtungen der AG Renkawitz-Pohl).

Die ektopische Expression des Mhcl^{CC}-Fragments mit einfachem Anhang konnte embryonal ebenfalls nicht nachweisbar induziert werden. Dieses entspricht dem Bereich der coiled-coil-Domänen, mit deren Hilfe unterschiedliche Proteine, beispielsweise auch Mhc, homodimerisieren (Lowey et al., 1991, Lupas, 1996, Tzolovsky et al., 2002). In einer angegliederten Bachelorarbeit wurde gezeigt, dass dies auch für Mhcl der Fall sein könnte (Daum, Bachelorarbeit 2008). Es ist zu erwarten, dass dieses Fragment mit den endogenen Proteinen Dimere bildet, auf diese Weise funktionale Homodimere kompetitiv entfernt und daher als dominant-negative Version fungiert. Dieser Effekt wurde bei ektopischer Expression eines analogen Mhc-Fragments in der Flugmuskulatur gezeigt (Cripps et al., 1999). Weitere Experimente deuten allerdings auf die endogene Expression eines ähnlichen, N-terminal verkürzten, Fragments hin (siehe 6.1.4). Ein möglicherweise hervorgerufener Phänotyp wäre durch entsprechende Immunhistologie zu detektieren. In ersten Analysen ruft die ektopische Expression des Mhcl^{CC}-Fragments mit zehn Myc-Anhängen, welche mit Hilfe des anti-cMyc-Antikörpers verifiziert wurde, keine äußerlich sichtbaren Veränderungen der Nachkommen hervor. Dadurch sind auch keine schwerwiegenden Störungen der embryonalen Muskeln zu erwarten. Dies spricht für die Hypothese der endogenen, verkürzten Variante oder für einen Redundanzpartner. Wie im Falle der verkürzten Mhc-Variante könnte die ektopische Expression in der Flugmuskulatur induziert werden, um eine Funktion von Mhcl innerhalb der Sarkomere zu analysieren, welche evtl. in Redundanz zu Mhc auftreten könnte.

6.1.4 Verschiedene Experimente deuten auf die Bildung mehrerer, unterschiedlich regulierter, Mhcl-Isoformen hin

Mhcl ist ein komplex organisiertes Gen mit zwanzig Exons, die wahrscheinlich durch alternatives Spleißen zu einer Vielzahl von Transkripten kombiniert werden (siehe 6.1.2). Computerprogramme postulieren aber nicht für alle Isoformen einen 5´-UTR-Bereich (Flybase), welcher, gemeinsam mit dem 3´-UTR-Bereich die Translation und deren Effizienz reguliert. Mit Hilfe der 5´-Kappe finden beispielsweise die Rekrutierung der Translations-Initiationsfaktoren und ribosomalen Untereinheiten statt. Im 5´-UTR-Bereich sind zudem Regionen lokalisiert, welche von translationsreprimierenden oder –aktivierenden Faktoren beeinflusst werden (Le Quesne et al., 2010, van der Velden and Thomas, 1999, Wilkie et al., 2003). Vor diesem Hintergrund erscheint es sehr unwahrscheinlich, dass das START-Codon auch gleichzeitig den Beginn der mRNAs repräsentieren soll. Obwohl die zur Verfügung stehende längste cDNA etwas stromabwärts des am weitesten 5´ gelegenen Exons endet und deswegen zur Klärung dieser Frage nicht zu Rate gezogen werden kann, bewiesen RT-PCR-Experimente eindeutig ein längeres Transkript als postuliert. Durch die Sequenzierung von poly-

A+-RNAs (RNA-seq, Flybase) wurden, neben den postulierten Exons, ebenfalls zusätzliche in dem hier untersuchten genomischen Bereich zwischen *Mhcl* und *Akt1* identifiziert.

In diesem Bereich liegen keine regulatorischen Elemente, welche Einfluss auf die embryonale *Mhcl*-Expression nehmen, was mittels Promotorstudien belegt wurde. Die spezifische Transkriptions-Regulation erfolgt über *cis*-regulatorische Sequenzen der DNA, welche aus dem eigentlichen Promotor und sogenannten Enhancer-Elementen bestehen, und den damit interagierenden Transkriptionsfaktoren. Der basale Promotor gewährleistet eine gewisse Grundexpression und liegt üblicherweise im den Transkriptionsstart umgebenden genomischen Bereich. Die Expressionshöhe eines Gens wird von proximalen Promotor-Elementen, welche sich unmittelbar stromauf- oder –abwärts des basalen Promotors befinden, oder von distalen Elementen moduliert. Diese Enhancer oder Silencer fördern bzw. unterdrücken die Transkription und liegen häufig mehrere Kilobasen entfernt, teilweise auch in Introns (Hampsey, 1998, Kesper, Dissertation 2005, Philippakis et al., 2006, Sandelin et al., 2007). Da gezeigt wurde, dass sich die *Mhcl*-mRNA über diesen Bereich hinaus erstreckt, ist es nicht überraschend, dass die getestete Region die Reportergenexpression nicht induzieren kann. Um die genaue Lokalisation des Promotors zu bestimmen, müsste zunächst der korrekte Transkriptionsstart des Gens ermittelt werden, beispielsweise durch weitere RT-PCR-Experimente. Die schon erwähnten RNA-seq-Daten lassen diesen nahe dem Transkriptionsstart von *Akt1* vermuten (Flybase). Weiter stromaufwärts befindet sich ein etwa 30 kb großer genomischer Bereich ohne postulierten Leserahmen oder sequenzierte RNAs, bevor sich der Leserahmen des Gens *Stubble* anschließt. Computerbasierte Analysen identifizieren einen putativen Promotor für *Mhcl* in diesem Bereich, etwa 29 kb von der kodierenden Sequenz des Gens entfernt (McPromoter). Ob diese, ungewöhnlich weit entfernte, Region tatsächlich die *Mhcl*-Expression induzieren kann, wäre gegebenenfalls durch passende Promotorstudien zu überprüfen.

Die Analysen von P-Element-Insertionslinien sowie der Nachweis unterschiedlicher mRNA-Bereiche bestätigten die Vermutung, es könnten verschiedene Transkripte durch die Regulation mehrerer Promotoren gebildet werden. *in situ*-Hybridisierungen zeigten deutlich, dass verschiedene Transkriptbereiche unterschiedlich stark exprimiert werden. Durch die P-Element-Insertionen hingegen sind ausschließlich Introns betroffen, was nur dann zu einer fehlerhaften Transkription oder Translation führen sollte, wenn distale Promotor-Elemente oder spleiß-relevante Bereiche beeinträchtigt sind.

6.1.5 Die Interaktion zwischen Mhcl und Rols7 konnte weder bestätigt noch ausgeschlossen werden

Es wurde mehrmals versucht, die vermutete Interaktion zwischen Mhcl und Rols7 während der Myoblastenfusion zu verifizieren. Die FC-spezifische Expression von *Mhcl* schließt dies zumindest nicht aus, da sie zeitlich und zelltypspezifisch mit der von *rols7* überlappt. Vielfältige Schwierigkeiten verhinderten aber die Auswertung weiterer Experimente. Die Durchführung genetischer Interaktionstests scheiterte, da die ektopische Expression von *Mhcl* in der Augenimaginalscheibe keine Störungen der Augenentwicklung auslöst. Wäre dies der Fall und würde die parallele Expression eines putativen Interaktionspartners diese Störungen mildern oder verstärken, wären dadurch Rückschlüsse auf die Art der Interaktion bzw. die Eingliederung in den entsprechenden Signalweg möglich (Thomas and Wassarman, 1999). Ektopische Expression führt in der Regel zu einer hohen Kopienzahl des Proteins. Dies stört die Augenentwicklung nicht, entweder weil Mhcl währenddessen keine Funktion hat und deswegen die nicht-vorhandenen Interaktionspartner nicht übermäßig stimuliert, oder weil es endogen schon stark exprimiert ist. Welche der beiden Möglichkeiten zutrifft, wäre im Ansatz durch den Nachweis der endogenen Proteinmenge in der Augenimaginalscheibe zu klären. Zusätzlich könnte auch die verkürzte Variante, $Mhcl^{CC}$-10xMyc, getestet werden.

Co-Immunopräzipitations-Studien scheiterten an den zur Verfügung stehenden Konstrukten. Da UAS-*Rols7-TAP* als einziges Rols7 nachweisbar ektopisch exprimiert, wurden die entsprechenden Matrices, Calmodulin-Affinitäts-Matrix und IgG-Agarose, benutzt. Aufgrund der Bindung der IQ-Domänen von Mhcl an die Calmodulin-Affinitäts-Matrix schied diese als Hilfsmittel für den Interaktionsnachweis aus. Allerdings enthält der verwendete TAP-Anhang einen Protein-A-Teil, welcher generell mit IgGs interagiert, wodurch das Fusionsprotein durch alle Antikörper detektiert wird. Da Rols7 ein ähnliches Molekulargewicht wie Mhcl aufweist, können die Proteine nicht durch Gelelektrophorese getrennt werden. Werden Proteine mit TAP-Anhang in großem Maßstab gereinigt, beispielsweise um aus embryonalen Proteinextrakten putative Interaktionspartner zu isolieren, erfolgt nach einer Anreicherung mittels IgG-Agarose die Entfernung des Protein-A-Fragments (Puig et al., 2001). Aufgrund der geringen Probenmenge ist dies hier nicht möglich. Eine quantitave Abschätzung der Bandenstärke der Western-Blot-Analyse ist nicht sehr aussagekräftig. Zudem ist vermutlich der Anteil, welcher Mhcl repräsentiert, relativ gering, da Rols7 mittels Matrix aufgereinigt wird, aber nicht jedes Molekül mit einem Molekül Mhcl interagiert. Es konnte nicht geklärt werden, worauf die zusätzlichen Artefaktbanden beruhen, welche bei Reinigung von Rols7-TAP mit Hilfe der IgG-Agarose, aber nicht der Calmodulin-Affinitäts-Matrix, entstanden. Hier wurden, ebenfalls mit allen verwendeten Antikörpern, starke Signale im Bereich von

etwa 55 kDa produziert, die aber zu vernachlässigen waren, da sie sich vom Molekulargewicht der analysierten Proteine unterschieden. Diese Banden könnten endogene Proteine der SL2-Zellen repräsentieren, welche mit vielen, aber nicht allen Matrices interagieren. Um diese Probleme zu umgehen, müsste sowohl für Rols7 als auch für Mhcl ein weiteres UAS-Konstrukt mit mehrfachen Anhängen erstellt werden, welche die Nachweis-Sensitivität erhöhen. Die entsprechenden Antikörper werden in Western-Blot-Analysen routinemäßig benutzt und sind sehr spezifisch. Die Kopplung des anti-Mhcl-Antikörpers an eine native Matrix kommt als Alternative aufgrund der beschrieben Schwierigkeiten nicht in Frage.

Gendosisexperimente verifizierten die Interaktion von Mhcl und Rols7 ebenfalls nicht. Bei Bestehen einer genetischen Interaktion würde bei Entfernung beider Gene, teilweise auch nur in einer Kopie, ein Phänotyp in den entsprechenden Geweben sichtbar oder verstärkt (Anholt, 2004, Paaby and Schmidt, 2009). Dies wurde hier nicht beobachtet, wobei die Muskeln der *Df(3L)BK9, ΔMhcl*-Embryonen nicht auf die Anzahl der Kerne hin untersucht wurden. Die Interaktion beider Proteine wird dadurch allerdings auch nicht ausgeschlossen, da der Redundanzpartner Zip (siehe 6.1.8) auch in diesem Fall die Funktion von Mhcl ersetzten könnte.

Eine weitere Möglichkeit, die Interaktion von Mhcl und Rols7 zu testen, stellt das sogenannte Split-YFP-System dar (Zhang et al., 2004). Dafür werden die kodierenden Sequenzen der zu testenden Proteine mit dem N- bzw. C-terminalen Fragment des Leserahmens von YFP (Yellow Flourescent oder gelb-fluoreszierendes Protein) fusioniert und in SL2-Zellen bzw. *D. melanogaster*-Embryonen ektopisch exprimiert. Interagieren die beiden Proteine, werden die Fragmente des YFP in räumliche Nähe gebracht und die Fluoreszenz wird wiederhergestellt. In Zellkultur ist dieses System mittlerweile etabliert (V. Groth, persönliche Mitteilung), sodass sich eine Anwendung für die hier bearbeitete Fragestellung anbietet.

6.1.6 Mhcl konnte nicht in bestimmte Signalwege eingegliedert werden

Für die Analyse der sieben potenziellen Interaktionspartner von Mhcl, 26-29-p, CanB, Cka, DCrk, Flw, Scamp und Wts, wurde zunächst deren Expression untersucht, um bei zeitlicher und gewebespezifischer Überlappung Rückschlüsse auf eine reale Interaktion zu ziehen. Im Anschluss daran wäre es möglich gewesen, durch Informationen über die analysierten Gene Signalwege zu identifizieren, in welche Mhcl involviert sein könnte.

Die Endopeptidase 26-29-p übt wahrscheinlich proteolytische Funktion für den Proteinabbau aus, verwandte Enzyme sind auch in viele weitere zelluläre Prozesse involviert (aktuelle Übersichtsartikel: Brix et al., 2008, Burster et al., 2010, Kos et al., 2009). Calpain 3 z. B. bindet an Titin und andere Zytoskelettkomponenten und kann so die Funktionalität der

Muskulatur regeln (Duguez et al., 2006). 26-29-p wurde analysiert, da Protein-Abbau in fast allen zellulären Vorgängen eine wichtige Rolle spielt, u. a. auch für die Entfernung extrazellulärer Matrix vor bzw. FCM-spezifischer Proteine nach der Myoblastenfusion. Durchgeführte *in situ*-Hybridisierungen sprechen allerdings gegen eine Funktion des Proteins für diese Vorgänge, da es nur in den Polzellen spezifisch exprimiert wird.

Die Proteinphosphatase Calcineurin reguliert, mit Hilfe der Ca^{2+}-bindenden Untereinheit CanB, z. B. durch die Modifikation von Transkriptionsfaktoren die Expression bestimmter Gene, auch während der Myogenese in Säugern. So nimmt sie Einfluss auf die Entwicklung und Differenzierung der Herz- und Skelettmuskulatur (Übersichtsartikel: Schulz and Yutzey, 2004). CanB2, welches zu CanB stark konserviert ist, zeigt sich für die Bildung der indirekten Flugmuskulatur verantwortlich (Gajewski et al., 2006). Zudem sind Kalzium sowie damit interagierende Proteine sowohl während der Entwicklung als auch der Kontraktion der Muskeln nachweisbar (siehe 5.2 und 6.2, Hornbruch, Masterarbeit 2010, Übersichtsartikel: Tupling, 2009). Andere Calcineurin-Untereinheiten von *D. melanogaster* regulieren den EGFR-Signalweg (Sullivan and Rubin, 2002) oder interagieren genetisch mit *DMef2*. Eigene *in situ*-Hybridisierungen zeigen neben spezifischer neuronaler Expression kein Signal im embryonalen Mesoderm, was mit der publizierten *calcineurin*-Expression übereinstimmt.

Cka wurde aufgrund seiner Beteiligung an der JNK-Kaskade ausgewählt. Dieser während der gesamten Entwicklung benötigte Signalweg reguliert beispielsweise die apoptotische Entfernung von Zellen aus Geweben, wenn sie entartet sind oder dort nicht mehr benötigt werden (Igaki, 2009). Regulatoren dieses Signalwegs beeinflussen nachweislich die Myogenese bzw. die Regulation von Myosinen (siehe unten), daher kam dies auch für Cka in Frage. Das Protein ist am Dorsalschluss beteiligt (Chen et al., 2002) und besitzt mehrere Protein-Protein-Interaktionsmodule, u. a. auch eine Calmodulin-bindende Domäne. Obwohl die Bindung des Ca^{2+}-Interaktionspartners Calmodulin, wie bereits für CanB beschrieben, besonders interessant erscheint, scheidet das Protein aufgrund der hier gezeigten ausschließlich neuronalen Expression als potenzieller Regulator der Myogenese aus.

Ein weiterer Regulator dieser JNK-Kaskade ist DCrk, dessen spezifische Expression im viszeralen und somatischen Mesoderm der Stadien 10 bis 14 bereits gezeigt wurde (Galletta et al., 1999). Das Transkript wird maternal zur Verfügung gestellt und ist während der Gastrulation im invaginierenden Mesoderm sowie dem Ektoderm und später im ZNS nachweisbar. Mittels *in vitro*-Experimenten wurde zwar gezeigt, dass DCrk mit Mbc (Balagopalan et al., 2006), Sns und Vrp-1/Sltr/Wip interagiert (Kim et al., 2007), welche Funktion DCrk während der Myogenese ausübt, ist allerdings, auch aufgrund genetischer Unzulänglichkeiten, noch nicht

klar. Daten, welche über die homologen Proteine der Vertebraten gewonnen wurden, lassen vermuten, dass DCrk als Mitglied eines Komplexes für die Aktivierung der Rac-GTPasen benötigt wird, welche auch für die Myogenese von *D. melanogaster* essentiell sind (siehe 2.3.3).
Flw, eine katalytische Untereinheit einer weiteren Proteinphosphatase, ist das einzige der hier analysierten Proteine, welches auch einen (potenziellen oder verifizierten) Interaktionspartner für den Mhcl-Redundanzpartner Zip darstellt. Die essentielle Funktion dieses Proteins besteht darin, die Aktivität von Zip durch Dephosphorylierung dessen regulatorischer leichter Kette, Spaghetti Squash, zu modulieren. Der Funktionsverlust von Flw führt zur Inaktivierung von Zip und einem fehlorganisierten Aktinzytoskelett (Vereshchagina et al., 2004). Flw reguliert überdies verschiedene Mitglieder der JNK-Kaskade und wird dabei u. a. von Zip beeinflusst (Kirchner et al., 2007). Proteinphosphatasen dieses Typs sind an der Regulation der Muskelkontraktion beteiligt (Ceulemans and Bollen, 2004, Cohen, 2002). Aufgrund der strukturellen und funktionalen Ähnlichkeit von Zip und Mhcl ist es möglich, dass Flw auch Mhcl reguliert, die hier gezeigte ubiquitäre Verteilung der mRNA schließt dies nicht aus.
Scamp verkörpert das *Drosophila*-Homolog der SCAMP-Proteine. Diese sind ubiquitär exprimiert, in diversen Membranen detektierbar und am Membrantransport oder der Endo- und Exozytose beteiligt, wo sie die hierbei entstehende Fusionspore regulieren (Castle and Castle, 2005, Fernández-Chacón and Südhof, 2000, Hubbard et al., 2000, Liao et al., 2008). Obwohl *Drosophila*-Scamp bisher nachweislich nur an verschiedenen neuronalen Prozessen wie der Bildung larvaler neuromuskulärer Verbindungen beteiligt ist (Zhao et al., 2009), könnten die Zell-Zell- bzw. Zell-Vesikel-Fusionen während der Myogenese unter dessen Beteiligung ablaufen. Die hier gezeigte ubiquitäre Expression lässt diese Möglichkeit bestehen. Hinzu kommt, dass SCAMP2 *in vitro* mit Arf6 interagiert (Liu et al., 2005), dessen *Drosophila*-Homolog wahrscheinlich ebenfalls in die Muskelentwicklung involviert ist (siehe 2.3.3).
Die Proteinkinase Wts ist ein Mitglied des hoch konservierten Hippo-Signalwegs, welcher eine zentrale Rolle bei der Wachstumsregulation, der Apoptose und der Differenzierung von Zellformen bzw. der Ausbildung von Zellpolaritäten bei der Epithelbildung spielt. Die Regulation von Wts wird von einem der unkonventionellen Myosine beeinflusst, daher ist es denkbar, dass dies auch auf Mhcl zutrifft (aktuelle Übersichtsartikel: Badouel et al., 2009, Kango-Singh and Singh, 2009, Zhang et al., 2009). Eigene *in situ*-Hybridisierungen schließen die Möglichkeit nicht aus, dass die Bildung der Muskulatur in *D. melanogaster*, ähnlich wie in Vertebraten (Watt et al., 2010), durch Mitglieder dieses Signalwegs reguliert wird.
In dieser Arbeit wurde kein spezifisch mesodermal-exprimiertes Gen oder Störungen des somatischen Muskelmusters der entsprechenden mutanten Embryonen identifiziert. Anhand

der gezeigten Transkriptverteilung kommen die Proteine 26-29-p, CanB und Cka als Interaktionspartner für Mhcl während der Myogenese nicht in Betracht. Am vielversprechendsten erscheinen der Zip-Regulator Flw, das Transmembranprotein Scamp, dessen Vertebraten-Homolog an der Vesikelfusion beteiligt ist, und DCrk. Für die untersuchte *flw*-mutante Linie sind bisher nur das Fehlen der indirekten Flugmuskulatur beschrieben, daher ist eine Auswirkung auf die larvale Muskulatur nicht notwendigerweise zu erwarten. Je nach Stärke des Allels sind *flw*-Mutanten entweder vital, aber flugunfähig, oder die Larven entwickeln eine wildtypische Körperwandmuskulatur, die degeneriert (Raghavan et al., 2000). Möglicherweise werden Störungen der embryonalen Muskeln sichtbar, wenn in diesen Linien *Mhcl* entfernt wird. Dies wäre an entsprechenden doppelmutanten Fliegen zu analysieren. Außer auf das neuronale System sind für *Scamp*-mutante Fliegen bisher keine Auswirkungen beschrieben, die hier untersuchte RNAi-Linie erzeugte auch in einer weiteren Studie wildtypische Nachkommen (Schnorrer et al., 2010). Eventuell könnte die Kombination einer vitalen P-Element-Insertion in *Scamp* mit *ΔMhcl* eine Störung des Muskelmusters hervorrufen. DCrk ist aufgrund der viert-chromosomalen Lokalisation schwierig zu analysieren, die alternativ verwendendete RNAi-Linie führt auch in einer weiteren Studie zu flugunfähigen Nachkommen (Schnorrer et al., 2010). Die mögliche Interaktion mit Mhcl, die mittels Co-Immunopräzipitation gezeigt wurde, ist aufgrund der methodischen Schwierigkeiten lediglich als ein weiterer Hinweis anzusehen. Stärkeres Gewicht sollte dementsprechend auf die Auswertung der Embryonen gelegt werden, welche eine membrangebundene Variante von DCrk im *ΔMhcl*-Hintergrund exprimieren. Eine erste Analyse zeigte keine Verstärkung des Phänotyps, wobei auch dafür ein möglicher Redundanzpartner einer der Proteine verantwortlich sein kann.

6.1.7 Mhcl ist für die Myogenese von *D. melanogaster* nicht essentiell

Die erzeugte *ΔMhcl*-Fliegenlinie zeigt bisher keine Störungen, obwohl die Letalität der Tiere wahrscheinlich spätestens im zweiten Larvenstadium eintritt. Auch weil Mhcl nicht maternal zur Verfügung gestellt wird, ist dies überraschend, da vermutet wurde, das Protein sei essentiell für die Myogenese. Allerdings zeigen sich Redundanzen für immer mehr Proteine, wahrscheinlich um zufällig entstehenden Funktionsverlust ausgleichen zu können. Zudem zeigen auch nur Embryonen des Funktionsverlust-Allels Mhc^{1} Beeinträchtigungen der embryonalen Muskeln, andere *Mhc*-Mutationen wirken sich lediglich auf die Etablierung und Funktion adulter Muskulatur aus (Flybase, Mogami et al., 1986, O'Donnell et al., 1989). Einschränkend ist zu sagen, dass nicht klar ist, ob die Sarkomere der *ΔMhcl*-Embryonen korrekt etabliert werden, da diese mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht sichtbar gemacht werden

können. Als Alternative bietet sich hier die Verwendung des anti-Mhc-Antikörpers an. Die Beobachtung lebender *ΔMhcl*-Embryonen oder -Larven könnte zumindest Aufschluss darüber geben, ob die Muskeln in der Lage sind zu kontrahieren. Mittels geeigneter Immunhistologie könnten zudem Hinweise auf die Art der Störung gewonnen werden, welche für die Letalität der *ΔMhcl*-Larven verantwortlich ist, da bisher nicht geklärt wurde, welches der deletierten Gene (*Mhcl*, *Akt1*, *sxe2*, *msps*, *CG32855* und *CG10185*) diese hervorruft. Die unvollständige Letalität der Fliegenlinie *e03696* ist aber ein Hinweis dafür, dass Mhcl eine essentielle Funktion hat, wenn auch nicht im Embryo. Da das Einbringen von Akt1 in den *ΔMhcl*-mutanten Hintergrund keine phänotypische Veränderung hervorruft, ist das Protein zumindest nicht ausschließlich für die hervorgerufene Letalität verantwortlich.

Die menschlichen Akt/PKB-Kinasen kontrollieren vielfältige Funktionen wie Wachstum, Überleben und Proliferation von Zellen, z. B. bei der Entwicklung des Nervensystems, aber auch den Stoffwechsel, beispielsweise den Insulin-Signalweg. Sie sind Mitglieder des hochkonservierten mTOR-Signalwegs und werden durch zelluläre Reaktionen auf extrazelluläre Stimuli an die Membran rekrutiert. Nachdem sie durch Phosphorylierung aktiviert wurden, phosphorylieren und stimulieren sie ihrerseits diverse Substrate, u. a. Mitglieder der Translationsmaschinerie, und regulieren so verschiedene zelluläre Funktionen (aktuelle Übersichtsartikel: Bozulic and Hemmings, 2009, Gonzalez and McGraw, 2009, Huang and Manning, 2009). In *D. melanogaster* existiert nur eine Isoform, Akt1, wobei Mutationen dieses Signalwegs auch hier die Größe von Zellen, Geweben und damit des gesamten Körpers beeinflussen (aktueller Übersichtsartikel: Hietakangas and Cohen, 2009). Dadurch ist es durchaus vorstellbar, dass der Funktionsverlust von *Akt1* die Letalität der *ΔMhcl*-Fliegen verursacht.

Msps ist der *D. melanogaster*-Vertreter der MAP215/Dis1-Familie Mikrotubuli-assoziierter Proteine. Diese regulieren die Assemblierung und Organisation von Mikrotubuli und sind z. B. für die Funktion mitotischer oder meiotischer Spindeln verantwortlich (Übersichtsartikel: Gard et al., 2004). Während der Wegfindung der Axone interagiert Msps u. a. mit der zytoplasmatischen Kinase Abl (Lowery et al., 2010), die möglicherweise Blow phosphorylieren könnte, welches eine wichtige Rolle für die Myogenese spielt (Sickmann, Dissertation 2010). *msps*-mutante Fliegen zeigen Beeinträchtigungen der pronukleären Fusion direkt nach der Befruchtung, der Oozytenentwicklung sowie der adulten Kutikula (Cullen et al., 1999, Pokrywka et al., 2009). Daher wären Auswirkungen auf frühe Abschnitte der Entwicklung zu erwarten, falls der Verlust von *msps* für die Letalität der *ΔMhcl*-Linie verantwortlich ist. Zudem lokalisiert das P-Element, welches zur Generierung der *ΔMhcl*-Linie benutzt wurde, im

5´-UTR-Bereich des Gens und verhindert damit wahrscheinlich die Bildung funktionalen Proteins, beeinträchtig die Vitalität der Fliegen aber nur partiell (Daum, Bachelorarbeit 2008).
Die Phospholipase Sxe2 wird von Mitgliedern der Kaskade zur Etablierung des Geschlechts reguliert und männlich-spezifisch exprimiert. Sie beeinflusst wahrscheinlich spezielle neuronale Prozesse durch Bildung oder Freisetzung eines Signalmoleküls (Fujii and Amrein, 2002, Goldman and Arbeitman, 2007). Es sind noch keine phänotypischen Auswirkungen bei Verlust der Proteinfunktion beschrieben, Mutationen in Komponenten dieses Signalwegs verhindern die Ausbildung geschlechtsspezifischer Charakteristika oder führen zu Sterilität. Falls Sxe2 eine essentielle Funktion hat, wären Auswirkungen auf die Männchen der *ΔMhcl*-Linie, aber keine Letalität zu erwarten. Da über CG32855 und CG10185 nichts bekannt ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Verlust dieser Proteine die Letalität hervorruft.
Falls der Verlust der längeren Mhcl-Isoformen die Vitalität der Fliegen nicht beeinflusst, wäre es denkbar, dass bei der unpräzisen Entfernung des P-Elements *EY00454* aus dem putativen 5´-UTR-Bereich eine mögliche mutante Fliegenlinie für dieses Gen übersehen wurde. Mittels PCR hätte überprüft werden können, ob die etablierten Fliegenlinien die kodierende Region von *Mhcl* dieses Abschnitts noch enthielten. Somit wären dann Fliegenlinien verfügbar gewesen, welche ausschließlich eine Mutation in *Mhcl* tragen. Diese beträfe allerdings die kürzeren Isoformen des Gens nicht, deren Funktionen für die Entwicklung wahrscheinlich wichtiger sind (siehe 6.1.4). Die ursprüngliche P-Element-Insertion könnte ebenfalls die Bildung funktionalen Proteins verhindern. Mittels Western-Blot-Analyse wäre zu überprüfen, ob der anti-Mhcl-Antikörper an Proteinextrakten dieser sowie wildtypischer Fliegen unterschiedliche Banden-Muster detektiert. Die auch hier zu erwartende Bildung kürzerer Isoformen könnte erklären, warum die *Mhcl*-Expression in *EY00454* unverändert erscheint, welche hauptsächlich auf dem mRNA-Nachweis der weiter 3´ lokalisierten Exons beruht.

6.1.8 Das nicht-muskelspezifische Myosin Zip ist ein Redundanzpartner von Mhcl

6.1.8.1 Nicht-muskelspezifische Myosine der Klasse II vermitteln Zellbewegungen

Die erstellte *zip*^{2}*; ΔMhcl*-doppelmutante Fliegenlinie beweist eindeutig die bestehende Redundanz zwischen diesen beiden Proteinen. Das nicht-muskelspezifische Myosin Zip weist die stärkste Aminosäuresequenz-Konservierung zu Mhcl auf und wird wie Mhc in die Klasse II dieser Proteine eingeordnet, aus welcher sich Mhcl evolutionär entwickelt haben soll (Foth et al., 2006; Abb. 6.1). Diese Proteine kommen, anders als es der Name vermuten lässt, auch in der Muskulatur vor, sind dort aber nicht für die Kontraktion verantwortlich. Sie bestehen aus zwei schweren Ketten, welche mittels ihres C-terminalen coiled-coil-Bereichs dimerisieren

und mit je zwei regulatorischen und essentiellen leichten Ketten interagieren, wobei letztere stabilisierend wirken. Sie können sowohl mit F-Aktin als auch mit Mikrotubuli interagieren (Burnette et al., 2008) und werden über ihren Phosphorylierungszustand reguliert. Sie sind generell an Form- und Positions-Änderungen einzelner Zellen oder Zellverbände, wie Adhäsion, Migration, Kernpositionierung oder Zell- bzw. Kernteilung, beteiligt, indem sie beispielsweise Cadherine oder Integrine lokalisieren und so Zell-Zell-Kontakte bilden oder stabilisieren (Übersichtsartikel: Eddinger and Meer, 2007, Sellers, 2000, Vicente-Manzanares et al., 2009).

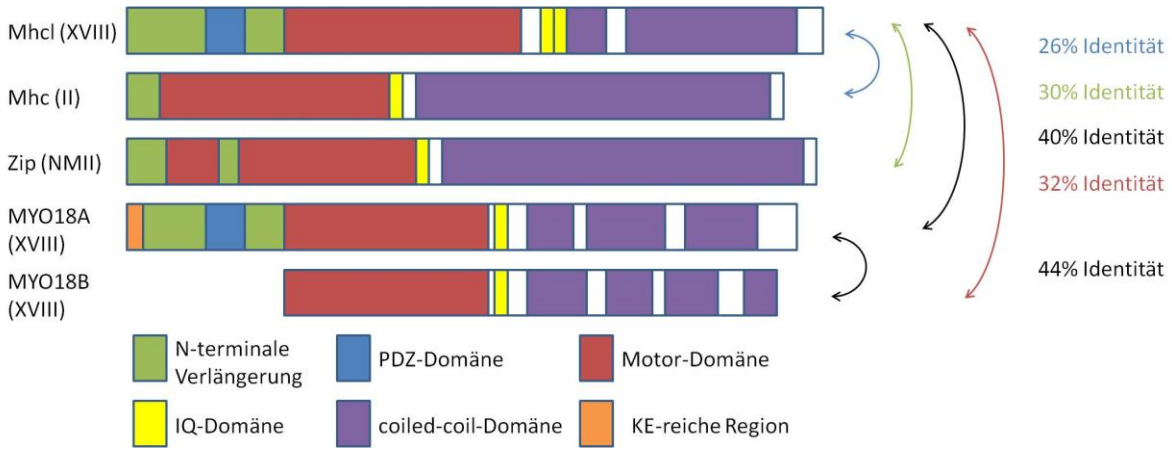

Abb. 6.1: Schematischer Überblick über die Domänenstruktur ausgewählter Myosine
Dargestellt ist die schwere Kette von Mhcl im Vergleich zu den schweren Ketten der *D. melanogaster*-Proteine Mhc und Zip sowie der Vertebraten-Proteine MYO18A und B, mit Angabe prozentualer Sequenzidentitäten. Römische Zahlen geben die Klasse an, in welche die Myosine eingeordnet werden. NM: nicht-muskelspezifisch (verändert nach Berg et al., 2001, Tzolovsky et al., 2002).

Zip, dessen regulatorische leichte Ketten von *spaghetti squash* kodiert werden (Karess et al., 1991), wird maternal exprimiert und dort z. B. für die Kernteilungen im synzytialen Blastoderm benötigt. Während der Mesoderm-Invagination und der Keimstreif-Verlängerung koordiniert es die Interkalation von Zellen (Martin et al., 2009, Übersichtsartikel: Pilot and Lecuit, 2005). Das Protein übernimmt zudem wichtige Funktionen während der Morphogenese der Amnioserosa-Zellen, der Neurogenese, der Tracheen-Invagination und des Dorsalschlusses (Brodu and Casanova, 2006, Pope and Harris, 2008, Young et al., 1993). Zip ist an den sich entwickelnden Muskelenden zu finden, wo es die Z-Scheiben der Sarkomere stabilisiert und so die Bildung gestreifter Muskulatur beeinflusst (Bloor and Kiehart, 2001).

6.1.8.2 Die Phänotypen *zip*^{2}*; ΔMhcl*-mutanter Embryonen gehen wahrscheinlich auf Interkalations-Störungen während der Keimstreif-Verlängerung sowie eine Beeinträchtigung der zweiten Fusionsphase zurück

In dieser Arbeit wurden trotz intensiver Analyse neben dem Dorsalschlussdefekt keine Phänotypen beobachtet, obwohl verschiedenen Publikationen Störungen diverser Gewebe homozy-

goter *zip*^{2}-Mutanten (auch bekannt als *zip*^{IIF107}) beschreiben. So werden z. B. Fehlbildungen des ZNS und der Kutikula (Zhao et al., 1988) sowie Probleme bei der Kopf-Einstülpung berichtet. Desweiteren sollen die Speicheldrüsen und Malpighischen Gefäße missgebildet sein (Blake et al., 1998) und häufig die Muskeln VA 1 - 3 fehlen. Bis zu 20 % homozygoter *zip*^{2}-Embryonen zeigten demnach Interkalations-Störungen während der Keimstreif-Verlängerung (Bertet et al., 2004). Die potenziell fehlerhaften Sarkomere (Bloor and Kiehart, 2001) waren allerdings mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht zu analysieren (siehe 5.1.8.1).

zip^{2}*; ΔMhcl*-doppelmutante Embryonen zeigen starke Störungen in allen analysierten Geweben, wobei die Ausprägungs-Intensität innerhalb des gleichen Experiments stark variiert. Dies war für das amorphe Allel *zip*^{2} bereits beschrieben worden (Zhao et al., 1988). Die verschiedenen Zelltypen werden generell angelegt, scheinen aber im Embryo eher zufällig angeordnet zu sein, wodurch die entsprechenden Gewebe nicht gebildet werden. Dies könnte auf Störungen früher morphogenetischer Prozesse, beispielsweise der schon angesprochenen Verlängerung des Keimstreifs, beruhen. Dass kaum Hemisegmente mit mehr als drei oder vier Eve-positiven Kernen beobachtet werden, weist allerdings darauf hin, dass der Fusionsprozess nach der ersten Phase stoppt oder zumindest stark verlangsamt ist und Mhcl und Zip dementsprechend eine Funktion in der zweiten Fusionsphase ausüben. Die Anhäufung von Kernen in etwa 25 % der doppelmutanten Embryonen ist wahrscheinlich auf Wanderungsdefekte der Kerne benachbarter Hemisegmente oder andere Fehllokalisationen zurückzuführen. Ein ähnlicher Phänotyp konnte bei Mutation des Rho-GEFs Pebble gezeigt werden, welcher nachweislich an der Zellwanderung beteiligt ist (Schumacher et al., 2004).

6.1.8.3 Die zu Mhcl homologen Proteine MYO18A und B modulieren das Aktinzytoskelett und regulieren die Bildung und Stabilität der Sarkomere

MYO18A, das Vertebraten-Homolog von Mhcl, besitzt neben den für Myosinen üblichen Bereichen (siehe 2.5) eine Motordomäne mit unüblicher ATP-Bindestelle sowie einen einzigartigen N-Terminus mit KE-reicher Sequenz und PDZ-Domäne (Abb. 6.1). Wie für Mhcl bisher nur vermutet, wurden N-terminal verkürzte Varianten des Vertebraten-Proteins ohne diese beiden Interaktionsmodule oder die Motordomäne identifiziert. Wahrscheinlich übernimmt das Protein verschiedene Funktionen für die epitheliale Zellbewegung, die Zellmorphologie und den Membrantransport, beispielsweise als Teil eines mobilen Gerüstkomplexes (Cross et al., 2004, Furusawa et al., 2000, Mori et al., 2003). MYO18A lokalisiert mit seiner PDZ-Domäne an der Innenseite der Zellmembran und über eine innerhalb der KE-reichen Region gelegene, ATP-insensitive Bindestelle an F-Aktin, weshalb vermutet wird, das Dimer könnte Aktinfilamente miteinander verknüpfen und so das Zytoskelett stabilisieren (Isogawa et al.,

2005, Mori et al., 2005). Das Protein interagiert über den β-PIX/GIT1-Komplex mit der Kinase PAK2, welche u. a. das Aktinzytoskelett und die Zellmotilität moduliert (Hsu et al., 2010).
Das eng verwandte MYO18B (Abb. 6.1) lokalisiert hauptsächlich an den Z-Scheiben, da es für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Muskelstruktur essentiell ist, ist dort aber weniger abundant als das konventionelle Myosin an der A-Bande. Wie bei MYO18A ist der einzigartige N-Terminus und nicht die Motordomäne oder der coiled-coil-Bereich für die Lokalisation an F-Aktin verantwortlich (Ajima et al., 2008, Salamon et al., 2003).
Vermutlich fungiert Mhcl auf eine ähnliche Weise wie die beschriebenen Vertebraten-Homologe, z. B. bei der Stabilisierung des Aktinzytoskeletts oder dem Sarkomer-Aufbau.

6.1.8.4 PDZ-Domänen vermitteln diverse Protein-Protein-Interaktionen

PDZ-Domänen, die charakteristischen Merkmale der Myosin-Klasse XVIII, welcher auch Mhcl zuzurechnen ist, sind sehr weitverbreitete Protein-Protein-Interaktionsmodule. Sie binden andere Proteine meist an deren C-Terminus und können zur Bildung komplizierter supramolekularer Komplexe beitragen. PDZ-Domänen enthaltende Proteine spielen z. B. eine wichtige Rolle für die Zelladhäsion bzw. die asymmetrische Zellteilung und polares Wachstum. Sie können als Co-Aktivatoren von Transkriptionsfaktoren agieren und sind am Vesikeltransport oder der Endozytose beteiligt. Sehr häufig übernehmen sie eine Rolle als Adapterprotein zwischen der Membran und dem Aktinzytoskelett, auch durch ihre Fähigkeit, mit Phosphoinositiden zu interagieren (Zimmermann, 2006, Übersichtsartikel: Bilder, 2001, Jelén et al., 2003, Sheng and Sala, 2001, Sierralta and Mendoza, 2004). PDZ-Domänen können zudem eine Interaktion mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren vermitteln. Diese regulieren viele Vitalfunktionen, üblicherweise durch Weitergabe des Signals an heterotrimere G-Proteine, z. B. Rho-GTPasen (Sun et al., 2007). Bisher gibt es noch keine Evidenzen für die Involvierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren in die Myogenese von *D. melanogaster*, obwohl für die glatte Vertebraten-Muskulatur gezeigt wurde, dass sie durch Ausübung unterschiedlicher Funktionen Einfluss auf die Kontraktilität nehmen (Gunst and Zhang, 2008). Rho-GTPasen werden von Rho-GEFs aktiviert, welche häufig selbst eine PDZ-Bindedomäne besitzen, wodurch ihre spezifische Funktion zeitlich und räumlich beschränkt wird. Dies trifft auch auf β-PIX, einen Austauschfaktor für Cdc42 und das myogeneserelevante Rac1, zu (Übersichtsartikel: García-Mata and Burridge, 2007). Es wurde bereits besprochen, dass MYO18A mit dem β-PIX/PAK/GIT-Komplex interagiert. Dieser Komplex existiert auch in *D. melanogaster*, wobei DGit an den embryonalen Muskelenden und deren Anheftungsstellen lokalisiert und für die korrekte Entwicklung sowie Wegfindung der Muskeln verantwortlich ist (Bahri et al., 2009). Weitere myogeneserelevante Proteine wie Schizo/Loner oder Duf/Kirre bzw.

Rst/IrreC enthalten ebenfalls je ein PDZ-Bindemotiv. Die Funktionalität dieser Motive ist aber entweder, wie für Schizo/Loner, noch nicht geklärt (Ch. Dottermusch, persönliche Mitteilung), oder sie sind für die Myoblastenfusion nicht essentiell (Bulchand et al., 2010). Daher erscheint eine Interaktion mit Mhcl während der Myoblastenfusion relativ unwahrscheinlich.
Es bestehen vielfältigste Möglichkeiten, wie Mhcl durch seine PDZ-Domäne die Myogenese beeinflussen könnte. Auch wenn bisher nicht bestätigt, könnte Mhcl beispielsweise mit seiner PDZ-Domäne Proteinkomplexe in den Z-Scheiben stabilisieren oder weitere, für die Muskelentwicklung essentielle, Proteine zu deren Funktionsort rekrutieren.

6.1.8.5 Verschiedene unübliche Myosine kontrollieren sehr unterschiedliche Prozesse

Durch den Vergleich mit anderen unüblichen Myosinen ergeben sich weitere mögliche Funktionen für Mhcl. Obwohl es ungewohnt erscheint, dass verkürzte Protein-Versionen ohne die charakteristischen Merkmale gebildet werden, im Falle von Mhcl die PDZ- und die Motordomäne, ist es doch nicht außergewöhnlich. Auch von Mhc wird eine N-terminal verkürzte Variante gebildet, welche aus der C-terminalen coiled-coil-Domäne und 77 weiteren Aminosäuren besteht. Dieses Protein ist ein wichtiger Bestandteil der direkten Flugmuskulatur, kann aber auch in Sarkomeren anderer Muskeltypen nachgewiesen werden. Muskeln mit einem hohen Anteil des Proteins weisen eine ungeordnete Struktur auf, da einige Querverbindungen fehlen, sind aber ebenfalls funktional (Polyák et al., 2003). Solche ungeordneten Sarkomere sind auch in der larvalen Muskulatur zu finden (Dettman et al., 1996), daher ist es durchaus denkbar, dass verkürzte Versionen von Mhc und Mhcl an deren Aufbau und Funktion beteiligt sind.
Unkonventionelle Myosine gehören per Definition nicht der Klasse II an, sind aber trotzdem auch in der Muskulatur nachweisbar. Sie stellen üblicherweise Motorproteine dar, welche in Abhängigkeit von ATP an F-Aktin binden und membranhaltige Organellen entlang der Aktinfilamente transportieren. Je nach Klasse sind sie aber auch an der Organisation von F-Aktin, der Regulation der Transkription sowie dem mRNA-Transport beteiligt. Es wurde eine Beteiligung an der Zellmigration sowie der Endo- und Exozytose gezeigt, wo sie die Bildung der Fusionspore beeinflussen. Durch die Assoziation mit Mikrotubuli und deren Motorproteinen regulieren sie die mitotische oder meiotische Spindel und stellen den Transport über beide Zytoskelett-Varianten sicher. Sie sind bekannt dafür, stabilisierende Funktion auszuüben, beispielsweise, indem sie das Aktinzytoskelett aufbauen und mit der Membran verbinden. Vertreter verschiedener Klassen besitzen unterschiedliche Domänen, welche sie zur Phosphorylierung diverser Substrate, zur Bildung von Protein-Protein- bzw. Protein-Lipid-Interaktionen oder zur Ausübung von Signaltransduktionen befähigen (Übersichtsartikel: Gonsalvez et al., 2005, Oliver et al., 1999, Redowicz, 2007, Woolner and Bement, 2009, Wu et al., 2000).

6.1.9 Es ergeben sich mehrere mögliche Funktionen für Mhcl

Außer der Beteiligung an der Interkalation von Zellen während der Keimstreif-Verlängerung konnte keine abschließende Aussage über die Funktion von Mhcl getroffen werden. Bezüglich der larvalen Myogenese erscheinen aber, auch im Hinblick auf vorgestellte Redundanzpartner, homologe sowie verwandte Proteine, folgende Hypothesen als wahrscheinlich:

Mhcl könnte für die Ausübung von Bewegungs- und Transportvorgängen benötigt werden. Auch aufgrund einer möglicherweise stattfindenden Interaktion mit Mikrotubuli oder deren Motorproteinen könnte so die Verbreitung von Proteinen oder mRNAs durch die Zelle sichergestellt werden. Im Besonderen könnte Mhcl in den Transport der elektronendichten Vesikel zum Fusionsort involviert sein, auch wenn diese Funktion bisher nur für andere Myosinklassen beschrieben wurde. Zudem könnte es, in Redundanz mit Zip, dafür verantwortlich sein, dass sich FCMs zu den FCs/wachsenden Muskeln bewegen und mit diesen fusionieren. Die FCs liegen in der Peripherie des Embryos, wohingegen sich die FCMs weiter im Inneren befinden. Zu Beginn der Myogenese liegen alle Zellen dicht beieinander, wodurch es auch ohne Migration zur Fusion kommt, während später in der Muskelentwicklung wenige FCMs gezielt auf die wachsenden Myotuben zuwandern müssen (Beckett and Baylies, 2007). Dies würde erklären, warum frühe Fusionen in *zip*^{2}*; ΔMhcl*-mutanten Embryonen noch stattfinden. Alternativ könnte das Protein, evtl. durch Interaktion mit dem β-PIX/PAK/GIT-Komplex, an der Bewegung reifer Muskeln in Richtung der epidermalen Anheftungsstellen beteiligt sein.

Analog zu Myosinen, welche die Fusionsporen der Endo- und Exozytose regulieren, könnte Mhcl die Weitung der FuRMAS-Struktur nach folgendem Modell beeinflussen: Das Ig-Domänen-Protein Duf/Kirre ist in die Membran von FC/wachsendem Muskel inseriert und interagiert mittels intrazellulärem Abschnitt mit der TPR-E-Wiederholung des Adaptermoleküls Rols7 (Kreisköther et al., 2006). Dieses rekrutiert über die Ankyrin-Wiederholungen, sofern sich die Interaktion verifizieren lässt, Mhcl über dessen C-terminalen Teil (Daum, Bachelorarbeit 2008). Dieses Rols7-Fragment wurde bereits als essentiell für die Myogenese identifiziert (Kreisköther et al., 2006, Menon et al., 2005). Mhcl wiederum bewegt sich mit Hilfe der Motordomäne entlang des F-Aktins, wodurch es zur Weitung der Fusionspore als Voraussetzung für eine erfolgreiche Fusion kommt (Abb. 6.2 A). Diese Überlegungen werden von der Tatsache unterstützt, dass sowohl in Embryonen der Linie *zip*^{2}*; ΔMhcl,* als auch der *rols7*-Deletionslinie *Df(3L)BK9* (Menon and Chia, 2001, Rau et al., 2001), die zweite Fusionsphase beeinträchtigt ist. Klarheit könnte durch den immunhistochemischen Nachweis der myogeneserelevanten Proteine Duf/Kirre, Sns oder Rols7 in *zip*^{2}*; ΔMhcl*-mutanten Embryonen erzielt werden, da hier sich weitende Fusionsporen sichtbar werden (Kesper et al., 2007). Dies

scheiterte bisher, da die entsprechenden Antikörper nur nach Hitzefixierung der Embryonen ein zufriedenstellendes Ergebnis liefern, was den Nachweis des Balancer-Markers, β-Galaktosidase, unmöglich macht. Zudem wurde kein eindeutiges morphologisches Kriterium zur Identifikation doppelmutanter Embryonen gefunden. Daher konnten auch keine elektronenmikroskopischen Untersuchungen durchgeführt werden, um den Fusionsstopp anhand ultrastruktureller Kriterien einzuordnen und die Hypothese auf diese Weise zu verifizieren.

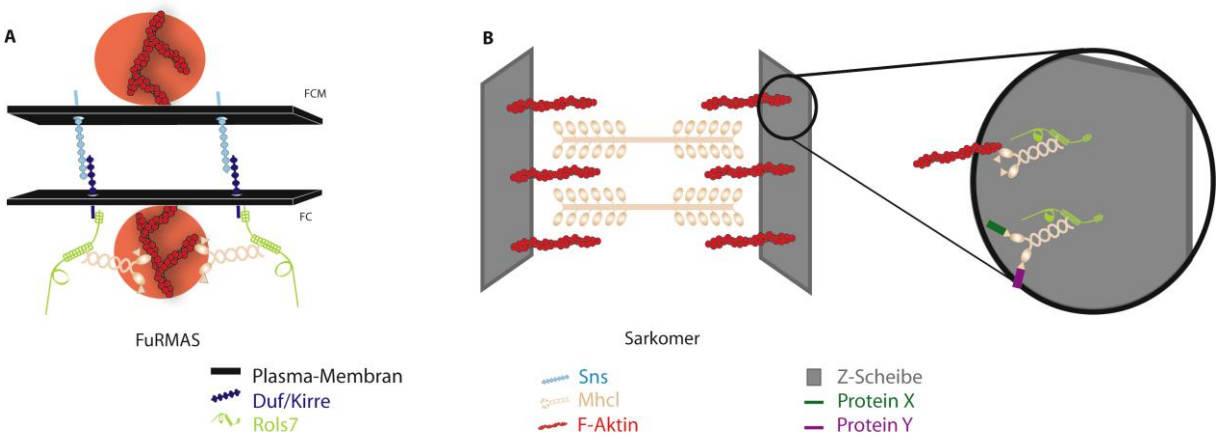

Abb.6.2: Schematische Darstellung der hypothetischen Funktionen von Mhcl
Falls sich die Interaktion zwischen Mhcl und Rols7 verifizieren lässt, erscheint folgendes Modell sehr wahrscheinlich: Das Ig-Domänen-Protein Duf/Kirre (dunkelblau) ist in die Membran (schwarz) von FC/wachsendem Muskel innerhalb des FuRMAS (A) integriert, wo es zusammen mit dem FCM-spezifischen Sns für den Zellkontakt verantwortlich ist. Es rekrutiert mittels seines intrazellulären Teils das Adapterprotein Rols7 (grün) über dessen TPR-E-Wiederholung. Dieses interagiert seinerseits über die Ankyrin-Repeats mit dem C-terminalen Teil von Mhcl (beige), das mit Hilfe der Motordomäne aktinbasierte Bewegungen vermittelt, wodurch es zur Weitung der Fusionspore kommt. Alternativ könnte Mhcl in den Z-Scheiben (grau) der Sarkomere (B) mit dem ebenfalls dort lokalisierenden Rols7 interagieren und dort entweder die Verknüpfung der Aktin-Filamente (rot) in die Z-Scheibe stabilisieren oder zur Bildung von Proteinkomplexen beitragen, deren Mitglieder (grün bzw. violett) noch zu identifizieren sind (verändert nach Önel and Renkawitz-Pohl, 2009).

Durch seine Adapterfunktion könnte Mhcl an der Stabilisation des Aktinzytoskeletts beteiligt sein, auch wenn einer der dafür verantwortlichen Abschnitte, die KE-reiche Region des Vertebraten-Homologs, fehlt. Das Protein könnte das Aktinzytoskelett mit der Zellmembran verbinden, an welche es evtl. durch seine PDZ-Domäne rekrutiert wird. Mit deren Hilfe könnte Mhcl zudem an der Bildung von Protein-Komplexen beteiligt sein. Hierbei erscheint eine Funktion für die Etablierung und Stabilisierung der Muskelanheftungsstellen und Sarkomere besonders interessant, da die Z-Scheiben aus einer Vielzahl von Proteinen aufgebaut sind und erste Experimente Mhcl dort zeigen (siehe 5.1.3). Da für Rols7 ähnliche Funktionen postuliert werden (Kreisköther et al., 2006), könnte die Interaktion, sofern sie zu verifizieren ist, mit diesem Protein auch dort stattfinden (Abb. 6.2 B). Eventuelle Interaktionspartner sind durch

entsprechende experimentelle Ansätze zu finden, möglicherweise geschieht so aber auch eine stabilere Verankerung der Aktin-Filamente in die Z-Scheiben (Abb. 6.2 B).
Schließlich könnte Mhcl in den dicken Filamenten der Sarkomere zu finden sein und dort in Redundanz zu Mhc agieren. Dafür kommen sowohl volle-Länge Proteine als auch verkürzte Varianten in Frage, da der Kopf-Bereich von Mhc lediglich für eine definierte Filamentlänge sowie den Durchmesser der Muskeln essentiell ist (Cripps et al., 1999), die Assemblierung und Funktionalität der Myosin-Filamente ist auch weiterhin gegeben.
Alle hier vorgestellten Hypothesen sind mit passenden Experimenten zu überprüfen. Falls in analysierten *ΔMhcl*-mutanten Embryonen der erwartete Phänotyp nicht sichtbar wird, könnte dies wiederum an einem Redundanzpartner, welcher nicht zwingendermaßen von Zip dargestellt werden muss, liegen. Sollte Mhcl, im Gegensatz zu den homologen Proteinen der Säuger, nicht unabhängig von seiner Motordomäne an Aktin binden können, ist bei allen Aktin-basierten Prozessen gleichzeitig ein Rückschluss auf gebildete Isoformen möglich.

6.2 CG10737

6.2.1 CG1073 wird während der Myoblastenfusionen spezifisch im viszeralen und somatischen Mesoderm exprimiert

Das hier analysierte CG10737-P ist eines von 42 *D. melanogaster*-Proteinen, welche wahrscheinlich eine oder mehrere C2-Domänen besitzen. Viele dieser Proteine sind in neuronale Prozesse involviert, meist die Neurotransmitter-Ausschüttung oder die Bildung neuromuskulärer Verbindungen, wenige sind molekular noch nicht charakterisiert (Adolfsen et al., 2004, McMahon et al., 2010, Rizo and Rosenmund, 2008). Obwohl Rab11, der Interaktionspartner des C2-Domänen-Proteins Rip11, an der Myoblastenfusion beteiligt ist (Bhuin and Roy, 2009), wurde bisher nur für Mbc als C2-Domänen-Protein eine eindeutige Beteiligung während der Myogenese gezeigt, kein weiteres der bisher analysierten Gene zeigt eine spezifische mesodermale Expression (Flybase, Diemer, Bachelorarbeit 2009, D. Buttgereit, persönliche Mitteilung). Ihre Fähigkeit, die Fusion von Membranen zu fördern (Martens and McMahon, 2008), lässt sie auch für die Myogenese interessant erscheinen.
In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *CG10737* spezifisch im somatischen und viszeralen Mesoderm exprimiert ist, sowohl während der Myoblastenfusionen als auch in reifen Muskeln. Zusätzlich kann das Transkript im ZNS detektiert werden, eine maternale Komponente, welche häufig die Auswertung zygotischer Deletionen erschwert, ist aber auszuschließen. *in situ*-Hybridisierungen an mutanten Embryonen weisen deutlich auf eine FC-spezifische Expression im somatischen Mesoderm hin. Um dies vollständig zu klären, sind analoge Experimente

an Embryonen der Linien *rP298-lacZ* sowie *sns-lacZ* durchzuführen, in welchen die FCs bzw. FCMs anhand β-Galaktosidase-Expression identifizierbar sind. Des Weiteren könnten Embryonen benutzt werden, welche verstärkt FCMs auf Kosten der FCs bilden. *in situ*-Hybridisierungen an *lmd*-mutanten Embryonen könnten eventuelle Unterschiede der Transkriptionsregulation zwischen somatischem und viszeralem Mesoderm aufdecken. *CG10737* wurde bei der Analyse groß angelegter Chromatin-Co-Immunopräzipitations-Studien nicht als direktes Zielgen von DMef2 und Lmd identifiziert (Sandmann et al., 2006, Cunha et al., 2010). In dieser Arbeit wurde allerdings deutlich, dass die Expression im somatischen und viszeralen Mesoderm durch den Transkriptionsfaktor DMef2 moduliert wird, daher erscheint eine indirekte Regulation wahrscheinlich. Da die DMef2-Aktivität auf mesodermale Derivate beschränkt ist, ist die ungestörte neuronale Expression dieser Embryonen nicht verwunderlich.

6.2.2 Endogenes CG10737-P wird von einem generierten Peptid-Antikörper nicht spezifisch erkannt

Es wurde ein Peptid-Antikörper gegen CG10737-P generiert, um die endogene oder ektopische Proteinverteilung analysieren zu können. Obwohl keine abschließende Aussage über die Spezifität der verschiedenen Antikörperfraktionen getroffen wurde, ist es doch sehr unwahrscheinlich, dass die diversen detektierten Muster auf spezifischen Reaktionen beruhen. Gerade dass häufig das gleiche, gegen das jeweilige Peptid gereinigte, Serum unterschiedliche Muster an Embryonen detektiert, welche mit Hitze bzw. Paraformaldehyd fixiert worden sind, ist sehr ungewöhnlich. Durch unterschiedliche Fixierungsmethoden werden verschiedene Proteine, gerade Mitglieder von Proteinkomplexen, unterschiedlich gut zugänglich gemacht, trotzdem sollte eine gewisse Konstanz erkennbar sein. Zudem detektieren maximal zwei der drei ausgewählten Fraktionen ektopisch in SL2-Zellen exprimiertes CG10737-P. Die zusätzlich aufgetretenen Banden der Western-Blot-Analyse könnten endogenes Protein der SL2-Zellen repräsentieren, allerdings wären dann drei sich gleichende Muster zu erwarten. Ein eindeutiger Nachweis an diesen Proteinextrakten wäre als Spezifitäts-Beweis anzusehen, auch wenn embryonales Protein nicht detektiert wird. Dafür sind mehrere Möglichkeiten denkbar, beispielsweise eine geringe endogene Proteinmenge oder ein hoher Umsatz, sodass das Protein schneller abgebaut als durch den Antikörper nachgewiesen wird. Verschiedene Synaptotagmine und weiter verbreitete SNARE-Proteine (siehe 6.2.6), welche vermutlich ähnliche Funktionen ausüben, sind im Embryo auf Proteinebene lichtmikroskopisch nachweisbar (Adolfsen et al., 2004, Sweeney et al., 1995), daher sollte dies auch für CG10737-P prinzipiell möglich sein. Die Inkubation präparierter Gewebe, in diesem Fall die die somatische Musku-

latur enthaltende Embryonenhülle, könnte aber auf alle Fälle die Zugänglichkeit des Antikörpers zu dem nachzuweisenden Protein erhöhen (Guerin and Kramer, 2009b).

Alle einzigartigen Bereiche des Proteins, welche für eine Antikörpergeneration in Frage kommen, erfüllen nur teilweise die an sie gestellten Anforderungen (Pineda – Antikörper-Service, mündliche Mitteilung). Um die geringe Erfolgswahrscheinlichkeit zu erhöhen, wurden zwei unterschiedliche Peptide zur Immunisierung von je zwei Kaninchen und Meerschweinchen eingesetzt. Theoretisch bestimmen fünf zufällig ausgewählte und prozessierte Aminosäuren die Spezifität eines Antikörpers (siehe 6.1.2, Frank, 2002). Daher ist es nicht auszuschließen, dass eine der acht Fraktionen spezifisch und ausschließlich CG10737-P detektiert, erscheint aber unwahrscheinlich, da keines der detektierten Muster die gezeigte Transkriptverteilung widerspiegelt. Zur abschließenden Klärung können entsprechende Analysen an defizienten Embryonen dieses Gens sowie Proteinextrakten aus SL2-Zellen und an Embryonen beitragen, welche jeweils CG10737-P mit Anhang ektopisch exprimieren, letztere beispielsweise in der charakteristischen *wg*-Domäne.

6.2.3 Methodische Schwierigkeiten verhindern die ektopische Expression von CG10737-P in *D. melanogaster*

Als Alternative zu Antikörper-Studien und für weiterführende Untersuchungen, beispielsweise Rettungsexperimente defizienter Embryonen, wurden transgene Fliegen etabliert, welche zur ektopischen Expression eines CG10737-P-HA-Fusionsproteins induzierbar sein sollten. Dieses kann aber weder auf RNA- noch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Die Inkubation der Embryonen bei 29 °C ändert das nicht, obwohl das UAS-GAL4-System auf einem Transkriptionsaktivator der Bäckerhefe basiert und daher bei dieser Temperatur höchste Aktivität zeigt (Brand and Perrimon, 1993, Kramer and Staveley, 2003). In Western-Blot-Analysen an Proteinextrakten aus SL2-Zellen, welche dieses Konstrukt ektopisch exprimieren, kann das Fusionsprotein aber eindeutig nachgewiesen werden. Folgende Erklärungsmöglichkeiten kommen für diesen Widerspruch in Frage: Zunächst unterscheiden sich GAL4-Treiberstämme in der Menge des ektopisch gebildeten Proteins, allerdings wurden hier ausschließlich Linien mit hohem Expressionsniveau verwendet. Darüberhinaus reichen einfache Anhänge zwar für die Detektion in Zellkultur oder darauf basierender Western-Blot-Analyse aus, für den Nachweis in Organismen oder Geweben ist dies häufig nicht der Fall (Beobachtungen der AG Renkawitz-Pohl). Die fehlende ektopische Transkriptverteilung weist überdies darauf hin, dass die zufällige P-Element-basierte Integration nicht in genomische Bereiche großer Aktivität erfolgt ist. Dies können Regionen sein, welche unter Einfluss von sogenannten Silencern stehen, oder sehr kompakte Chromosomenbereiche wie das Heterochro-

matin. Um die genannten Probleme zu umgehen, könnten Konstrukte erstellt werden, welche zur Bildung von Fusionsproteinen mit mehrfachen Anhängen führen. Des Weiteren bietet sich die Verwendung des ΦC31-Integrase-basierten Systems an, da hier die Integration an spezifischen, gut zugänglichen Stellen des Genom erfolgt (Bischof et al., 2007).

6.2.4 Der genomische Bereich 5´ des Transkriptionsstarts stellt keinen Promotor für *CG10737* dar

Um tiefere Einblicke in die Regulation des Gens zu bekommen, wurde die genomische Region zwischen dem 5´-UTR-Bereich von *CG10737* und dem 3´-UTR-Bereich des benachbarten *ena* analysiert. Dieses Fragment ist nicht in der Lage, die Reportergenexpression in einem Muster ähnlich der *CG10737*-Transkriptverteilung zu aktivieren. Dies erscheint ungewöhnlich, da hierin ein putativer Promotor identifiziert wird (Flybase, promoter prediction) und sich üblicherweise stromaufwärts des Gens basale Promotoren oder *cis*-regulatorische Sequenzen befinden (siehe 6.1.4, Hampsey, 1998, Kesper, Dissertation 2005, Philippakis et al., 2006, Sandelin et al., 2007). Allerdings wird der schon angesprochene 5´-UTR-Bereich nur für acht der zwölf Isoformen postuliert. Der 5´-UTR-Bereich der restlichen vier Varianten soll etwa 6 kb stromabwärts, direkt gefolgt vom Translationsstart aller Isoformen, zu finden sein (siehe 5.2.1). Für den Bereich zwischen dem weiter stromaufwärts liegenden 5´-UTR-Bereich und dem Transkriptionsstart sagen Computerprogramme sieben mögliche Promotoren voraus (Flybase, promoter prediction). Es wäre also sinnvoll, diesen Bereich ebenfalls auf die Fähigkeit hin zu untersuchen, Reportergenexpression zu aktivieren. Einer dieser putativen Promotorbereiche befindet sich im ersten Exon des 5´-UTR-Bereichs, welcher von vier Isoformen geteilt wird, und wird auch von einem weiteren Programm identifiziert (McPromoter).

6.2.5 Der putative Interaktionspartner Sec5 ist für die Bildung der somatischen Muskulatur nicht essentiell

Es wurden Untersuchungen zu Sec5 durchgeführt, um so Hinweise auf die Funktion von CG10737-P zu bekommen, wobei die ubiquitäre Expression die Interaktion der beiden Proteine nicht ausschließt. Die Deletion von *sec5* und 22 weiteren Genen beeinflusst die Bildung somatischer Muskulatur nicht schwerwiegend. Ob die nicht wildtypisch erscheinenden Muskeln mancher Tiere auf eine Störung der Myogenese oder vielmehr auf Fixierungsartefakte zurückzuführen sind, wurde nicht abschließend geklärt. Darüber hinaus könnte dafür auch die Deletion eines der anderen Gene verantwortlich sein. Dies sind viele bisher uncharakterisierte Proteine, aber auch das am Transport doppelsträngiger RNA beteiligte Cog3, das chromatinbindende Msl2, die putative NADH-Dehydrogenase Pdsw, Pgant2 (an der

Oligosaccharid-Biosynthese beteiligt), sowie Ptpa (kann Protein-Thyrosin-Phosphatasen aktivieren). Zumindest indirekt könnten diese teilweise eine Rolle für die Myogenese spielen, z. B. durch Bereitstellung von Energie oder die Aktivierung spezifischer Signalwege.
Sec5 ist ein Mitglied des Exozysten-Komplexes, welcher beispielsweise für die Exozytose verantwortlich ist, indem er Vesikel im zu fusionierenden Membranbereich verankert. Sec5 kontrolliert den Membrantransport, die Ausbildung von Zellpolaritäten und die Endozytose, aber nicht den Vesikeltransport (Langevin et al., 2005, Murthy et al., 2003, Sommer et al., 2005). Des Weiteren ist es für die Fusionen zur Bildung des dorsalen Haupt-Tracheenastes essentiell (Kakihara et al., 2008). Die Deletion von *sec5* führt deswegen und aufgrund fehlender neuromuskulärer Verbindungen zu larvaler Letalität, was mit den hier gewählten Experimenten aber nicht untersucht wurde. Die in dieser Arbeit verwendete RNAi-Linie produzierte auch in einer groß angelegten Studie wildtypische Nachkommen (Schnorrer et al., 2010), was aber nicht überrascht, da nicht klar ist, wie spezifisch diese Linien die Translation eines Proteins verhindern. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Sec5 eine Funktion während der Myoblastenfusion spielt, da ein Redundanzpartner das Auftreten von Störungen dieses Gewebes verhindern könnte. Es ist zu vermuten, dass Sec5 dann unabhängig von dem angesprochenen Exozysten-Komplex agiert, für dessen Funktion es essentiell ist.

6.2.6 CG10737-P spielt keine essentielle Rolle für die Myogenese von *D. melanogaster*

6.2.6.1 Der Verlust von *CG10737* ruft keine spezifischen Muskelstörungen hervor

Transheterozygote Embryonen, welche *CG10737* und fünf weitere Gene deletieren, zeigen Störungen bei der Kopfeinstülpung sowie fehlorientierte oder nicht angeheftete Muskeln. Der Vergleich mit *ena*-mutanten Embryonen zeigt eindeutig, dass diese Phänotypen auf dessen Verlust zurückzuführen sind. Ena, auch bekannt als VASP, ist der einzige *D. melanogaster*-Vertreter einer Proteinfamilie, welche, im Gegensatz zum Arp2/3-Komplex, die Bildung langer, unverzweigter Aktinfilamente fördert. Ena wird von der Tyrosin-Kinase Abl reguliert und ist beispielsweise für die Bildung und Stabilität von Zell-Zell-Kontakten oder die Zell-Motilität sowie die Morphogenese verschiedener Epithelien verantwortlich. Ena spielt eine essentielle Rolle während der Neurogenese, wo es die Bildung und Stabilität der Neurone und Synapsen sowie die Wegfindung der Nervenzellen moduliert (Franco et al., 2010, Michael et al., 2010, Übersichtsartikel: Trichet et al., 2008). Obwohl über die Funktion von Abl während der Myogenese bereits spekuliert wird (Bennett and Hoffmann, 1992, Sickmann, Dissertation 2010), wurde die Beteiligung von Ena noch nicht analysiert. Die hier gezeigten Daten beweisen aber dessen Relevanz für die korrekte Orientierung der Muskeln sowie deren Anhef-

tung an die Epidermis, wobei das eine evtl. eine Folge des anderen ist. Die Unregelmäßigkeiten der Kopfeinstülpung bzw. des Dorsalschluss und Keimstreifrückzugs der analysierten *ena*-mutanten Embryonen wurden bereits beschrieben (Gates et al., 2007). Dass die beiden letztgenannten nicht in den transheterozygoten Embryonen beobachtet wurden, könnte daran liegen, dass die analysierten Mutationen evtl. nur bestimmte Domänen funktionsunfähig machen. Dadurch könnte ein dominant-negativer Effekt erzielt werden.

Das Protein des ebenfalls deletierten Gens *cora* enthält eine sogenannte FERM-Domäne, welche die Interaktion mit bestimmten Lipiden, transmembranen Ionenkanälen oder Adhäsionsmolekülen sowie zytoplasmatischen Komponenten wie Calmodulin vermitteln können. Dadurch eignen sie sich, um als Adapter die Aktivität verschiedener Proteine zu koordinieren. Cora reguliert z. B. den Tracheendurchmesser, die Polarität von Epithelzellen und den Aufbau und die Funktion spezieller Zell-Zell-Verbindungen. Es verankert bestimmte, an der Neurotransmitter-Ausschüttung beteiligte, Glutamat-Rezeptoren im Aktinzytoskelett der Synapsen. Da Cora in Redundanz zu einem weiteren FERM-Protein agiert, zeigen mutante Embryonen nur leichte Störungen. Der hier als Kontrolle verwendeten nullmutanten Linie fehlen Glutamat-Rezeptoren in den Synapsen, was mit den gewählten Experimenten nicht analysiert wurde (Chen et al., 2005, Laprise et al., 2009, Laprise et al., 2010, Übersichtsartikel: Tepass, 2009). Cora wurde als potenzieller Interaktionspartner von Rols7 in einem Hefe-zwei-Hybrid-Screen identifiziert (Kastl, Bachelorarbeit 2010), ob es eine Funktion während der Myogenese ausübt, bedarf weiterer Kärung.

Hppy oder MAP4K3 ist ein Mitglied der Familie der Ste20-Kinasen und für die korrekte Phosphorylierung verschiedener Translationsfaktoren am Ende des angesprochenen TOR-Signalwegs verantwortlich (siehe 6.1.7, Findlay et al., 2007). Hppy wird im adulten Gehirn exprimiert, wo es den EGF-Signalweg inhibiert. Daher zeigen mutante Fliegen lediglich eine veränderte Sensitivität auf Alkohol (Corl et al., 2009). Wie beobachtet sollte weder der Verlust von *cora* noch von *hppy* in den analysierten transheterozygoten Embryonen Störungen der Myogenese hervorrufen, welche durch den anti-β3-Tubulin-Antikörper detektierbar sind.

6.2.6.2 CG10737-P könnte an der Signaltransduktion oder unterschiedlichen Fusionsprozessen während der Myogenese beteiligt sein

Obwohl der Verlust von *CG10737* keine Auswirkungen auf die Bildung somatischer Muskulatur hat, ist es doch möglich, dass das Protein dort eine Funktion ausübt, worauf das Expressionsmuster sehr stark hindeutet. Diese könnte von einem putativen und noch zu identifizierenden Redundanzpartner erfüllt werden, wobei das myogeneserelevante Mbc besonders interessant erscheint. Die hier verwendete RNAi-Linie führte auch in einer weiteren Studie zu

wildtypischen Nachkommen, was diese Theorie zumindest nicht widerlegt (Schnorrer et al., 2010). Während der Myogenese könnte CG10737-P die Fusion zwischen Vesikel und Zellmembran im Präfusionskomplex (Abb. 6.3 A, B) oder die der Membranen von FC und FCM fördern (Abb. 6.3 C, D). Falls für diese Schritte unterschiedliche fusogene Proteine benötigt werden, könnten die Vesikel diese zum Fusionsort bringen. Es ist ein analoger Prozess wie der der Neurotransmitter-Ausschüttung vorstellbar. Dort interagiert das C2-Domänen-Protein Synaptotagmin direkt mit SNARE-Proteinen, welche in die Membranen der Vesikel bzw. der Synapse inseriert sind. C2-Domänen-Proteine inserieren als Reaktion auf eine Änderung der Ca^{2+}-Konzentration in Membranen (siehe 2.6). Eine Konformationsänderung des Komplexes aus SNARE- und C2-Domänen-Proteinen bedingt eine Verkürzung des Membranabstands (Abb. 6.3 A, rechts, C), wobei es bei Unterschreitung einer gewissen Distanz zur Fusion kommt (Abb. 6.3 D). Ob das postulierte Intermediat Hemifusion (Abb. 6.3 C, rechts) tatsächlich entsteht, ist Gegenstand aktueller Forschung (aktuelle Übersichtsartikel: Jackson and Chapman, 2008, Jahn and Scheller, 2006, McMahon et al., 2010, Rizo and Rosenmund, 2008, Sapir et al., 2008, Wickner and Schekman, 2008).

Fast alle Proteine, welche an Fusionsprozessen beteiligt sind, besitzen allerdings zwei oder mehr C2-Domänen, wohingegen Proteine mit nur einem dieser Module häufig Ca^{2+}-insensitiv und an Signalübertragungen beteiligt sind (Corbalán-García and Gómez-Fernández, 2010, Martens and McMahon, 2008). Wie auch bei CG10737-P zu beobachten, enthalten diese Proteine häufig eine C1-Domäne, beide Module wurden ursprünglich in der Kinase PKC identifiziert. C1-Domänen sind Cysteinreiche Module, welche typischerweise den sekundären Botenstoff DAG sowie DAG imitierende Phorbolester binden, was zur Translokation des Proteins an die Membran führt. Zwei der vier Untergruppen dieser hoch konservierten Proteinfamilie, die ‚konventionellen' und ‚neuen' PKCs, besitzen C1- und C2-Domänen. Durch deren Interaktion kommt es häufig zu einer sequentiellen Aktivierung der Proteine, wobei die C1-Domänen die Aktivierung, die C2-Domänen eine Funktion für die Regulation und Lokalisation des Enzyms übernehmen. PKC-Isoformen sind an der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten oder der Zellpolarität beteiligt und koordinieren Wachstum oder Überleben von Zellen. Durch die Regulation des Zytoskeletts oder unterschiedlicher Oberflächenproteine, welche die Interaktion mit der extrazellulären Matrix vermitteln, nehmen sie Einfluss auf die Migration von Zellen. Hier konnte die Kooperation mit dem Exozysten-Komplex gezeigt werden, dessen Mitglied Sec5 ein putativer Interaktionspartner von CG10737-P ist (aktuelle Übersichtsartikel: Colón-González and Kazanietz, 2006, Lemmon, 2008, Rosse et al., 2010).

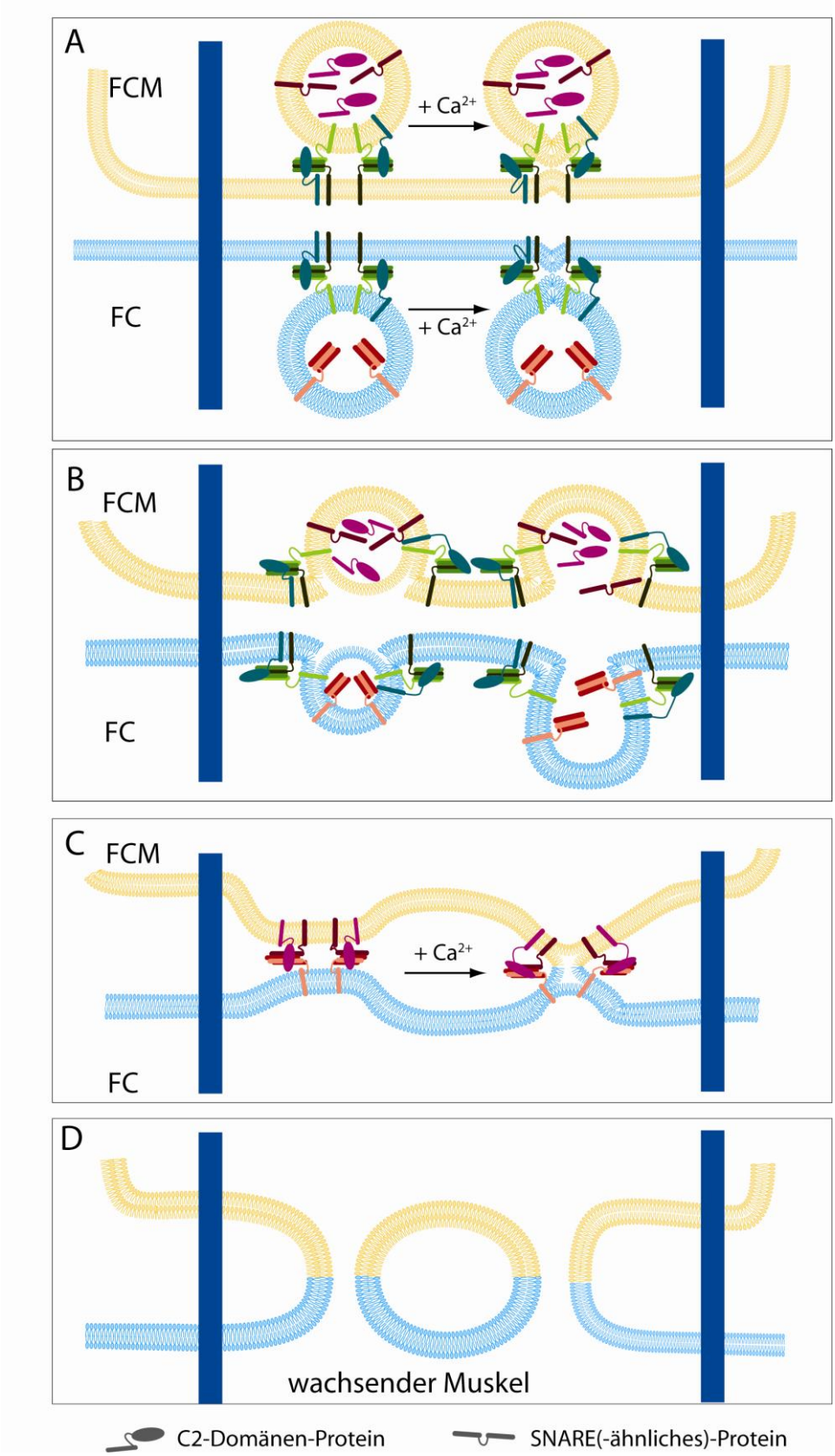

Abb.6.3: Schematische Darstellung möglicher Funktionsweisen des C2-Domänen-Proteins CG10737-P während der Myogenese
Im Präfusionskomplex liegen sich Vesikel auf Seiten der FCM (gelb) und FC/wachsender Muskel (blau) paarig gegenüber. Diese Vesikel fusionieren mit Hilfe fusogener Moleküle (grün) mit den entsprechenden Zell-Membranen (A, B) und liefern gleichzeitig neue fusogene Substanzen (rot), welche für die Fusion zwischen FC und FCM benötigt werden (C, D). C2-Domänen-Proteine könnten, analog

dem Prozess der Neurotransmitter-Ausschüttung, mit einem Komplex aus SNARE(-ähnlichen) Proteinen interagieren und als Reaktion auf die Erhöhung der Ca^{2+}-Konzentration zunächst den Abstand der beiden zu fusionierenden Membranen verkürzen (A, rechts, C), bevor es zum Intermediat der Hemifusion (C, rechts) und zur Vesikulierung der Membran kommt. CG10737-P könnte, wahrscheinlich nur auf Seiten von FC/wachsendem Muskel, sowohl am ersten als auch am zweiten Abschnitt dieser Fusion beteiligt sein.

CG10737-P könnte also an Migrationsprozessen von Zellen beteiligt sein, z. B. die der FCMs in Richtung der FCs als Voraussetzung für deren Fusion. Es könnte zudem sein, dass CG10737-P Signale an der Muskel-Membran koordiniert, damit die Fusion oder der Aufbau der neuromuskulären Verbindungen dritter Larvalstadien korrekt ablaufen kann. Auf Seiten der Neurone sind viele C2-Domänen-Proteine und auch der putative Interaktionspartner Sec5 an der Etablierung dieser Strukturen beteiligt (siehe 6.2.5), ein in den reifen Muskeln agierendes Signalmolekül ist als Gegenspieler nicht auszuschließen. Zudem könnte auch neuronal exprimiertes CG10737-P (siehe 5.2.1) für den Aufbau dieser Verbindungen benötigt werden. Protein-Versionen mit möglicherweise dominant-negativer Wirkung könnten bei der Klärung der Frage helfen, welche der vorgestellten Hypothesen zutrifft. Hier würde sich die Entfernung der C1- oder C2-Domäne oder auch beider anbieten, da diese die für die Funktion des Proteins verantwortlichen Module darstellen. Die Störung eines bestimmten Gewebes bei ektopischer Expression würde die Funktion von CG10737-P ebenda anzeigen. Um eine mutante Fliegenlinie zu generieren, die ausschließlich die Bildung von CG10737-P beeinträchtigt oder verhindert, könnte das P-Element EY06743 unpräzise entfernt werden. Dieses ist in das erste Intron der acht längeren Isoformen inseriert, wodurch möglicherweise genomische Bereiche der Transkripte deletiert werden. Da nicht klar ist, ob dies Letalität verursacht, müssten potenziell mutante Fliegenlinien per PCR kontrolliert werden.

Als mögliche Redundanzpartner für CG10737-P, welche das Auftreten von Störungen bisher verhinderten, kommen weitere C2-Domänen-Proteine in Frage, z. B. CG16976, CG32425, CG33967 und CG34349. Diese kodieren ebenfalls nur je eine C2-Domäne und wurden noch nicht analysiert. Falls diese Gene ein ähnliches Expressionsmuster wie *CG10737* aufweisen, was durch *in situ*-Hybridisierungen zu klären ist, könnte die Analyse von zu erstellenden Doppelmutanten über eine tatsächliche Redundanz Aufschluss geben. Die 20 SNARE-Proteine von *D. melanogaster* sind als putative Interaktionspartner von CG10737-P anzusehen (Littleton, 2000). Viele dieser Proteine unterbinden allerdings jegliche Vesikelfusion oder zumindest die Neurotransmitter-Ausschüttung (Bhattacharya et al., 2002, Kidokoro, 2003), was die Auswertung der entsprechenden Mutanten erschwert. Zusätzlich könnte auch mit weiteren Screens nach Interaktionspartnern von CG10737-P gesucht werden. Diese müssten mit adäquaten Experimenten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* verifiziert werden.

6.3 Ausblick

6.3.1 Mhcl

Wie in den entsprechenden Kapiteln angesprochen (siehe 6.1.1 bis 6.1.8), sollten zunächst einige abschließende Experimente gemacht werden. Die Verifizierung der zelltypspezifischen mRNA-Verteilung kann durch *in situ*-Hybridisierungen an charakterisierten *lmd*-mutanten Embryonen, *sns-lacZ*-Embryonen und Tieren, welche verstärkt FCMs bilden, beispielsweise durch die ektopische Expression von Notch im *Toll*-mutanten Hintergrund, erfolgen. Western-Blot-Analysen mit dem anti-Mhcl-Antikörper an Proteinextrakten aus *ΔMhcl*-Embryonen können die Spezifität des Antikörpers näher charakterisieren, um anschließend die Bildung funktionalen Proteins in der Linie *EY00454* zu analysieren. Sollte dies nicht der Fall sein, könnte hier erstens diese putative *Mhcl*-mutante Linie in Kombination mit zip^2 analysiert und zweitens im Umkehrschluss die Spezifität des Antikörpers an larvalen Sarkomeren überprüft werden. Alternativ kann dies auch an ersten Larven der *ΔMhcl*-Linie erfolgen. Lebendbeobachtungen dieser Linie hinsichtlich der Kontraktilität der Muskulatur können Aufschluss auf die der Letalität zugrunde liegende Mutation geben. Es stehen abschließende Auswertungen der ektopischen mesodermalen Expression von $Mhcl^{CC}$ sowie der myristylierten Variante von DCrk im *ΔMhcl*-mutanten Hintergrund hinsichtlich Auswirkungen auf die somatische Myogenese aus. Nach Erstellung der entsprechenden Konstrukte sollte die Interaktion zwischen Mhcl und Rols7 mittels Co-Immunopräzipitation und des Split-YFP-Systems getestet werden. Weitere Interaktionspartner könnten mit Hilfe doppelmutanter Fliegen für Mhcl und Flw bzw. Scamp verifiziert werden, falls in diesen Störungen sichtbar werden. Die postulierte Funktion von Mhcl für die Etablierung bzw. Aufrechterhaltung der Sarkomere kann durch die Analyse *ΔMhcl*-mutanter Larven überprüft werden. Ob Mhcl an der Bewegung der FCMs beteiligt ist, könnte mittels Lebendbeobachtung an *ΔMhcl*- bzw. zip^2*; ΔMhcl*-mutanten Embryonen getestet werden. Mit einer Kombination adäquater Reportergene und Mikroskopie-Techniken kann untersucht werden, ob der Phänotyp der zip^2*; ΔMhcl*-mutanten Embryonen tatsächlich auf einem Interkalations-Defekt während der Gastrulation oder Keimstreif-Verlängerung beruht (Supatto et al., 2009). Weitere spezielle fluoreszenzbasierte Techniken bieten sich an, um gegebenenfalls die Interaktion zwischen Mhcl und dem Aktinzytoskelett sichtbar zu machen (Iwai and Uyeda, 2008), und so einen Hinweis auf die vermutete regulatorische Funktion für das Zytoskelett zu bekommen. Spezielle Motilitäts-Experimente könnten Aufschluss über die genaue subzelluläre Lokalisation von Mhcl, sowie die Art und Weise einer etwaigen Bewegung geben (Brawley and Rock, 2009, Rock et al., 2000).

6.3.2 CG10737

Zur Klärung der zelltypspezifischen Expression von *CG10737* und deren Regulation könnten ergänzende *in situ*-Hybridisierungen an Embryonen der Linien *rP298-lacZ*, *sns-lacZ* und *lmd*^{1} sowie an Embryonen, welche vermehrt FCMs bilden, durchgeführt werden. Dafür bietet sich die ektopische Expression von Notch im *Toll*-mutanten Hintergrund an. Die Antikörper-Spezifität sollte an Deletionsmutanten sowie Proteinextrakten aus Zellen, welche CG10737-P ektopisch exprimieren, überprüft werden. Alternativ zu einer anti-CG10737-P-Antikörperfärbung könnte die subzelluläre Verteilung ektopischen Proteins analysiert werden. Dafür wären mit dem zu erstellenden UAS-*CG10737*-Konstrukt mit mehrfachen Anhängen transgene Fliegen mittels ΦC31-Integrase-basierter Integration zu etablieren. Dessen ektopische Expression eignet sich anschließend für eine weitere Spezifitätskontrolle des Antikörpers. Falls die Regulation der *CG10737*-Expression Gegenstand weiterer Untersuchungen sein soll, könnten Promotorstudien durchgeführt werden, z. B. mit dem genomischen Bereich zwischen dem 3´-UTR-Bereich von *ena* und dem Translationsstart von CG10737-P. Der putative Interaktionspartner Sec5, dessen Deletion keinen Phänotyp im somatischen Mesoderm hervorruft, könnte durch genetische Interaktionsstudien mit CG10737-P untersucht werden. Auftretende Störungen würden bedeuten, dass beide Proteine im gleichen Signalweg agieren. Das gleiche gilt für die SNARE-Proteine des *D. melanogaster*-Genoms. Für die Identifizierung weiterer Interaktionspartner bietet sich ein Hefe-zwei-Hybrid- oder ein Modifizierungs-Screen an, falls die ektopische Expression von CG10737-P in der Augenimaginalscheibe die Entwicklung des Auges behindert. Um diese zu verifizieren, könnten, neben genetischen Interaktionstests oder Co-Immunopräzipitation, die isolierten Proteine mittels spezieller Technik analysiert werden, welche auf der Übertragung von Energie eines angeregten Farbstoffs über eine kurze Distanz auf einen zweiten beruht und bereits für die Aufklärung spezifischer Bindungseigenschaften der SNARE-Proteine eingesetzt wurde (Brunger et al., 2009). Die Analyse von CG16976, CG32425, CG33967 und CG34349 könnte Aufschluss über mögliche Redundanzpartner von CG10737-P liefern, weitere C2-Domänen-Proteine scheiden aufgrund der Expressionsmuster aus. Ob CG10737-P in Abhängigkeit von Ca^{2+}-Ionen agiert, könnte *in vitro* durch spezielle ratiometrisch-fluorimetrische Messtechniken untersucht werden, in welchen die Ca^{2+}-Aufnahme von Zellen durch das Emissions-Verhältnis zweier unterschiedlicher Ca^{2+}-sensitiver Fluoreszenzfarbstoffe bestimmt wird (Voets, 2000). Die mögliche Auswirkung der Deletion von *CG10737* auf die korrekte Bildung und Funktion larvaler Synapsen sollte z. B. mit der sogenannten Patch-Clamp-Technik untersucht werden. Hier können Stromfluss sowie Aktionspotentiale in Neuronen und Muskeln gemessen werden (Chen et al., 2009).

7. Literatur

Abmayr, S. M. and Kocherlakota, K. S. (2006). Muscle morphogenesis: the process of embryonic myoblast fusion. *In: Muscle Development in Drosophila* (ed. H. Sink), pp. 92-103. Georgetown, Tex. New York, N.Y.: Landes Bioscience/Eurekah.com; Springer Science+Business Media.

Abmayr, S. M., Zhuang, S. and Geisbrecht, E. R. (2008). Myoblast fusion in *Drosophila*. *Methods Mol Biol.* **475,** 75-97.

Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W. et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science.* **287,** 2185-2195.

Adolfsen, B., Saraswati, S., Yoshihara, M. and Littleton, J. T. (2004). Synaptotagmins are trafficked to distinct subcellular domains including the postsynaptic compartment. *J Cell Biol.* **166,** 249-260.

Ajima, R., Akazawa, H., Kodama, M., Takeshita, F., Otsuka, A., Kohno, T., Komuro, I., Ochiya, T. and Yokota, J. (2008). Deficiency of Myo18B in mice results in embryonic lethality with cardiac myofibrillar aberrations. *Genes Cells.* **13,** 987-999.

Anholt, R. R. H. (2004). Genetic modules and networks for behavior: lessons from *Drosophila*. *Bioessays.* **26,** 1299-1306.

Badouel, C., Garg, A. and McNeill, H. (2009). Herding Hippos: regulating growth in flies and man. *Curr Opin Cell Biol.* **21,** 837-843.

Bahri, S. M., Choy, J. M., Manser, E., Lim, L. and Yang, X. (2009). The *Drosophila* homologue of Arf-GAP GIT1, dGIT, is required for proper muscle morphogenesis and guidance during embryogenesis. *Dev Biol.* **325,** 15-23.

Baker, R. and Schubiger, G. (1996). Autonomous and nonautonomous Notch functions for embryonic muscle and epidermis development in *Drosophila*. *Development.* **122,** 617-626.

Balagopalan, L., Chen, M., Geisbrecht, E. R. and Abmayr, S. M. (2006). The CDM superfamily protein MBC directs myoblast fusion through a mechanism that requires phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate binding but is independent of direct interaction with DCrk. *Mol Cell Biol.* **26,** 9442-9455.

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

Bate, M., Rushton, E. and Currie, D. A. (1991). Cells with persistent *twist* expression are the embryonic precursors of adult muscles in *Drosophila*. *Development.* **113,** 79-89.

Baylies, M. K., Bate, M. and Ruiz-Gómez, M. (1998). Myogenesis: a view from *Drosophila*. *Cell.* **93,** 921-927.

Beckett, K. and Baylies, M. K. (2007). 3D analysis of founder cell and fusion competent myoblast arrangements outlines a new model of myoblast fusion. *Dev Biol.* **309,** 113-125.

Bennett, R. L. and Hoffmann, F. M. (1992). Increased levels of the *Drosophila* Abelson tyrosine kinase in nerves and muscles: subcellular localization and mutant phenotypes imply a role in cell-cell interactions. *Development.* **116,** 953-966.

Berg, J. S., Powell, B. C. and Cheney, R. E. (2001). A millennial myosin census. *Mol Biol Cell.* **12,** 780-794.

Berger, S., Schäfer, G., Kesper, D. A., Holz, A., Eriksson, T., Palmer, R. H., Beck, L., Klämbt, C., Renkawitz-Pohl, R. and Önel, S. (2008). WASP and SCAR have distinct roles in activating the Arp2/3 complex during myoblast fusion. *J Cell Sci.* **121,** 1303-1313.

Bertet, C., Sulak, L. and Lecuit, T. (2004). Myosin-dependent junction remodelling controls planar cell intercalation and axis elongation. *Nature.* **429,** 667-671.

Bhattacharya, S., Stewart, B. A., Niemeyer, B. A., Burgess, R. W., McCabe, B. D., Lin, P., Boulianne, G., O'Kane, C. J. and Schwarz, T. L. (2002). Members of the synaptobrevin/vesicle-associated membrane protein (VAMP) family in *Drosophila* are functionally interchangeable in vivo for neurotransmitter release and cell viability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99,** 13867-13872.

Bhuin, T. and Roy, J. K. (2009). Rab11 is required for myoblast fusion in *Drosophila*. *Cell Tissue Res.* **336,** 489-499.

Bilder, D. (2001). PDZ proteins and polarity: functions from the fly. *Trends Genet.* **17,** 511-519.

Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7,** 1513-1523.

Bischof, J., Maeda, R. K., Hediger, M., Karch, F. and Basler, K. (2007). An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104,** 3312-3317.

Blake, K. J., Myette, G. and Jack, J. (1998). The products of ribbon and raw are necessary for proper cell shape and cellular localization of nonmuscle myosin in *Drosophila*. *Dev Biol.* **203,** 177-188.

Bloor, J. W. and Kiehart, D. P. (2001). zipper Nonmuscle myosin-II functions downstream of PS2 integrin in *Drosophila* myogenesis and is necessary for myofibril formation. *Dev Biol.* **239,** 215-228.

Bonn, B. (2006). Analyse mehrerer mit Rols7 in Verbindung stehender Proteine und Strukturen und deren mögliche Bedeutung für die larvale Myogenese in *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit Philipps-Universität Marburg

Bour, B. A., O'Brien, M. A., Lockwood, W. L., Goldstein, E. S., Bodmer, R., Taghert, P. H., Abmayr, S. M. and Nguyen, H. T. (1995). *Drosophila* MEF2, a transcription factor that is essential for myogenesis. *Genes Dev.* **9,** 730-741.

Bour, B. A., Chakravarti, M., West, J. M. and Abmayr, S. M. (2000). *Drosophila* SNS, a member of the immunoglobulin superfamily that is essential for myoblast fusion. *Genes Dev.* **14,** 1498-1511.

Bozulic, L. and Hemmings, B. A. (2009). PIKKing on PKB: regulation of PKB activity by phosphorylation. *Curr Opin Cell Biol.* **21,** 256-261.

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

Brawley, C. M. and Rock, R. S. (2009). Unconventional myosin traffic in cells reveals a selective actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106,** 9685-9690.

Brix, K., Dunkhorst, A., Mayer, K. and Jordans, S. (2008). Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions. *Biochimie.* **90,** 194-207.

Brodu, V. and Casanova, J. (2006). The RhoGAP crossveinless-c links trachealess and EGFR signaling to cell shape remodeling in *Drosophila* tracheal invagination. *Genes Dev.* **20,** 1817-1828.

Brunger, A. T., Weninger, K., Bowen, M. and Chu, S. (2009). Single-molecule studies of the neuronal SNARE fusion machinery. *Annu Rev Biochem.* **78,** 903-928.

Bulchand, S., Menon, S. D., George, S. E. and Chia, W. (2010). The intracellular domain of Dumbfounded affects myoblast fusion efficiency and interacts with Rolling pebbles and Loner. *PloS One.* **5,** e9374.

Bullard, B., Burkart, C., Labeit, S. and Leonard, K. (2005). The function of elastic proteins in the oscillatory contraction of insect flight muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* **26,** 479-485.

Bullard, B., Garcia, T., Benes, V., Leake, M. C., Linke, W. A. and Oberhauser, A. F. (2006). The molecular elasticity of the insect flight muscle proteins projectin and kettin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103,** 4451-4456.

Burnette, D. T., Ji, L., Schaefer, A. W., Medeiros, N. A., Danuser, G. and Forscher, P. (2008). Myosin II activity facilitates microtubule bundling in the neuronal growth cone neck. *Dev Cell.* **15,** 163-169.

Burster, T., Macmillan, H., Hou, T., Boehm, B. O. and Mellins, E. D. (2010). Cathepsin G: roles in antigen presentation and beyond. *Mol Immunol.* **47,** 658-665.

Carmena, A., Gisselbrecht, S., Harrison, J., Jimenez, F. and Michelson, A. M. (1998). Combinatorial signaling codes for the progressive determination of cell fates in the *Drosophila* embryonic mesoderm. *Genes Dev.* **12,** 3910-3922.

Carrasco-Rando, M. and Ruiz-Gómez, M. (2008). Mind bomb 2, a founder myoblast-specific protein, regulates myoblast fusion and muscle stability. *Development.* **135,** 849-857.

Castle, A. and Castle, D. (2005). Ubiquitously expressed secretory carrier membrane proteins (SCAMPs) 1-4 mark different pathways and exhibit limited constitutive trafficking to and from the cell surface. *J Cell Sci.* **118,** 3769-3780.

Ceulemans, H. and Bollen, M. (2004). Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev.* **84,** 1-39.

Chen, E. H. and Olson, E. N. (2001). Antisocial, an intracellular adaptor protein, is required for myoblast fusion in *Drosophila*. *Dev Cell.* **1,** 705-715.

Chen, H., Marinissen, M. J., Oh, S., Chen, X., Melnick, M., Perrimon, N., Gutkind, J. S. and Hou, S. X. (2002). CKA, a novel multidomain protein, regulates the JUN N-terminal kinase signal transduction pathway in *Drosophila*. *Mol Cell Biol.* **22,** 1792-1803.

Chen, E. H., Pryce, B. A., Tzeng, J. A., Gonzalez, G. A. and Olson, E. N. (2003). Control of myoblast fusion by a guanine nucleotide exchange factor, loner, and its effector ARF6. *Cell.* **114,** 751-762.

Chen, K., Merino, C., Sigrist, S. J. and Featherstone, D. E. (2005). The 4.1 protein coracle mediates subunit-selective anchoring of *Drosophila* glutamate receptors to the postsynaptic actin cytoskeleton. *J Neurosci.* **25,** 6667-6675.

Chen, K., Featherstone, D. E. and Broadie, K. (2009). Electrophysiological recording in the Drosophila embryo. *J Vis Exp.*

Chernomordik, L. V. and Kozlov, M. M. (2008). Mechanics of membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol.* **15,** 675-683.

Cohen, P. T. W. (2002). Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci.* **115,** 241-256.

Colón-González, F. and Kazanietz, M. G. (2006). C1 domains exposed: from diacylglycerol binding to protein-protein interactions. *Biochim Biophys Acta.* **1761,** 827-837.

Corbalán-García, S. and Gómez-Fernández, J. C. (2010). The C2 domains of classical and novel PKCs as versatile decoders of membrane signals. *Biofactors.* **36,** 1-7.

Corl, A. B., Berger, K. H., Ophir-Shohat, G., Gesch, J., Simms, J. A., Bartlett, S. E. and Heberlein, U. (2009). Happyhour, a Ste20 family kinase, implicates EGFR signaling in ethanol-induced behaviors. *Cell.* **137,** 949-960.

Cross, M., Csar, X. F., Wilson, N. J., Manes, G., Addona, T. A., Marks, D. C., Whitty, G. A., Ashman, K. and Hamilton, J. A. (2004). A novel 110 kDa form of myosin XVIIIA (MysPDZ) is tyrosine-phosphorylated after colony-stimulating factor-1 receptor signalling. *Biochem J.* **380,** 243-253.

Cullen, C. F., Deak, P., Glover, D. M. and Ohkura, H. (1999). *mini spindles*: A gene encoding a conserved microtubule-associated protein required for the integrity of the mitotic spindle in *Drosophila*. *J Cell Biol.* **146,** 1005-1018.

Cunha, P. M., Sandmann, T., Gustafson, E. H., Ciglar, L., Eichenlaub, M. P. and Furlong, E. E. (2010). Combinatorial binding leads to diverse regulatory responses: Lmd is a tissue-specific modulator of Mef2 activity. *PLoS Genet.* **6**, e1001014.

Côté, J. and Vuori, K. (2002). Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity. *J Cell Sci.* **115,** 4901-4913.

Cripps, R. M., Suggs, J. A., Bernstein, S. I. (1999). Assembly of thick filaments and myofibrils occurs in the absence of the myosin head. *EMBO J.* **18,** 1793-1804

Daum, G. (2008). Myosin Heavy Chain Like, ein potentielles Homodimer, scheint kein für die Myogenese in *Drosophila* essentieller Faktor zu sein. Bachelorarbeit Philipps-Universität Marburg

Dettman, R. W., Turner, F. R. and Raff, E. C. (1996). Genetic analysis of the *Drosophila β3-Tubulin* gene demonstrates that the microtubule cytoskeleton in the cells of the visceral Mesoderm is required for Morphogenesis of the midgut endoderm. *Dev Biol.* **177,** 117-135

Diemer, M. (2009). Analysis of five C2-domain proteins, which most likely play no role in myoblast fusion, but are expressed in other tissues. Bachelorarbeit Philipps-Universität Marburg

Doberstein, S. K., Fetter, R. D., Mehta, A. Y. and Goodman, C. S. (1997). Genetic analysis of myoblast fusion: blown fuse is required for progression beyond the prefusion complex. *J Cell Biol.* **136,** 1249-1261.

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

Duguez, S., Bartoli, M. and Richard, I. (2006). Calpain 3: a key regulator of the sarcomere? *FEBS J.* **273,** 3427-3436.

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

Dyer, N., Rebollo, E., Dominguez, P., Elkhatib, N., Chavrier, P., Daviet, L., Gonzalez, C. and Gonzalez-Gaitan, M. (2007). Spermatocyte cytokinesis requires rapid membrane addition mediated by ARF6 on central spindle recycling endosomes. *Development.* **134,** 4437-4447.

Eddinger, T. J. and Meer, D. P. (2007). Myosin II isoforms in smooth muscle: heterogeneity and function. *Am J Physiol Cell Physiol.* **293,** C493-508.

Englund, C., Loren, C. E., Grabbe, C., Varshney, G. K., Deleuil, F., Hallberg, B. and Palmer, R. H. (2003). Jeb signals through the Alk receptor tyrosine kinase to drive visceral muscle fusion. *Nature.* **425,** 512-516.

Erickson, M. R., Galletta, B. J. and Abmayr, S. M. (1997). *Drosophila myoblast city* encodes a conserved protein that is essential for myoblast fusion, dorsal closure, and cytoskeletal organization. *J Cell Biol.* **138,** 589-603.

Estrada, B., Maeland, A. D., Gisselbrecht, S. S., Bloor, J. W., Brown, N. H. and Michelson, A. M. (2007). The MARVEL domain protein, Singles Bar, is required for progression past the pre-fusion complex stage of myoblast fusion. *Dev Biol.* **307,** 328-339.

Fernández-Chacón, R. and Südhof, T. C. (2000). Novel SCAMPs lacking NPF repeats: ubiquitous and synaptic vesicle-specific forms implicate SCAMPs in multiple membrane-trafficking functions. *J Neurosci.* **20,** 7941-7950.

Findlay, G. M., Yan, L., Procter, J., Mieulet, V. and Lamb, R. F. (2007). A MAP4 kinase related to Ste20 is a nutrient-sensitive regulator of mTOR signalling. *Biochem J.* **403,** 13-20.

Foth, B. J., Goedecke, M. C. and Soldati, D. (2006). New insights into myosin evolution and classification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103,** 3681-3686.

Franco, D. L., Rezával, C., Cáceres, A., Schinder, A. F. and Ceriani, M. F. (2010). ENA/VASP downregulation triggers cell death by impairing axonal maintenance in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci.* **44,** 154-164.

Frank, S. A. (2002). Immunology and Evolution of Infectious Disease. Princeton and Oxford: Princeton University Press.

Frasch, M. (1999). Controls in patterning and diversification of somatic muscles during *Drosophila* embryogenesis. *Curr Opin Gen Dev.* **9,** 522-529.

Fujii, S. and Amrein, H. (2002). Genes expressed in the *Drosophila* head reveal a role for fat cells in sex-specific physiology. *EMBO J.* **21,** 5353-5363.

Furlong, E. E., Andersen, E. C., Null, B., White, K. P. and Scott, M. P. (2001). Patterns of gene expression during *Drosophila* mesoderm development. *Science.* **293,** 1629-1633.

Furusawa, T., Ikawa, S., Yanai, N. and Obinata, M. (2000). Isolation of a novel PDZ-containing myosin from hematopoietic supportive bone marrow stromal cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* **270,** 67-75.

Gajewski, K. M., Wang, J. and Schulz, R. A. (2006). Calcineurin function is required for myofilament formation and troponin I isoform transition in *Drosophila* indirect flight muscle. *Dev Biol.* **289,** 17-29.

Galletta, B. J., Niu, X. P., Erickson, M. R. and Abmayr, S. M. (1999). Identification of a *Drosophila* homologue to vertebrate Crk by interaction with MBC. *Gene.* **228,** 243-252.

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

García-Mata, R. and Burridge, K. (2007). Catching a GEF by its tail. *Trends Cell Biol.* **17,** 36-43.

Gard, D. L., Becker, B. E. and Josh Romney, S. (2004). MAPping the eukaryotic tree of life: structure, function, and evolution of the MAP215/Dis1 family of microtubule-associated proteins. *Int Rev Cytol.* **239,** 179-272.

Gates, J., Mahaffey, J. P., Rogers, S. L., Emerson, M., Rogers, E. M., Sottile, S. L., Van Vactor, D., Gertler, F. B. and Peifer, M. (2007). Enabled plays key roles in embryonic epithelial morphogenesis in *Drosophila*. *Development.* **134,** 2027-2039.

Geisbrecht, E. R., Haralalka, S., Swanson, S. K., Florens, L., Washburn, M. P. and Abmayr, S. M. (2008). Drosophila ELMO/CED-12 interacts with Myoblast city to direct myoblast fusion and ommatidial organization. *Dev Biol.* **314,** 137-149.

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

Goldman, T. D. and Arbeitman, M. N. (2007). Genomic and functional studies of *Drosophila* sex hierarchy regulated gene expression in adult head and nervous system tissues. *PLoS Genet.* **3,** e216.

Gonsalvez, G. B., Urbinati, C. R. and Long, R. M. (2005). RNA localization in yeast: moving towards a mechanism. *Biol Cell.* **97,** 75-86.

Gonzalez, E. and McGraw, T. E. (2009). The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle.* **8,** 2502-2508.

Grobler, J. A. and Hurley, J. H. (1997). Similarity between C2 domain jaws and immunoglobulin CDRs. *Nat Struct Biol.* **4,** 261-262.

Guerin, C. M. and Kramer, S. G. (2009a). Cytoskeletal remodeling during myotube assembly and guidance: coordinating the actin and microtubule networks. *Commun Integr Biol.* **2,** 452-457.

Guerin, C. M. and Kramer, S. G. (2009b). RacGAP50C directs perinuclear gamma-tubulin localization to organize the uniform microtubule array required for *Drosophila* myotube extension. *Development.* **136,** 1411-1421.

Gunst, S. J. and Zhang, W. (2008). Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle: a new paradigm for the regulation of smooth muscle contraction. *Am J Physiol Cell Physiol.* **295,** C576-587.

Hakeda, S., Endo, S. and Saigo, K. (2000). Requirements of Kettin, a giant muscle protein highly conserved in overall structure in evolution, for normal muscle function, viability, and flight activity of *Drosophila*. *J Cell Biol.* **148,** 101-114.

Hakeda-Suzuki, S., Ng, J., Tzu, J., Dietzl, G., Sun, Y., Harms, M., Nardine, T., Luo, L. and Dickson, B. J. (2002). Rac function and regulation during *Drosophila* development. *Nature.* **416,** 438-442.

Hampsey, M. (1998). Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62,** 465-503.

Harlow, E. and Lane, D. P. (1988). Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Hay, B. A., Wolff, T. and Rubin, G. M. (1994). Expression of baculovirus P35 prevents cell death in *Drosophila*. *Development.* **120,** 2121-2129.

Hietakangas, V. and Cohen, S. M. (2009). Regulation of tissue growth through nutrient sensing. *Annu Rev Genet.* **43,** 389-410.

Hornbruch, C. (2010). Kosh zeigt ein duales Expressionsmuster während der Myoblastenfusion und in der synzytialen Testismuskulatur. Masterarbeit Philipps-Universität Marburg

Horsley, V. and Pavlath, G. K. (2004). Forming a multinucleated cell: molecules that regulate myoblast fusion. *Cells Tissues Organs.* **176,** 67-78.

Hsu, R., Tsai, M., Hsieh, Y., Lyu, P. and Yu, J. (2010). Identification of MYO18A as a novel interacting partner of the PAK2/betaPIX/GIT1 complex and its potential function in modulating epithelial cell migration. *Mol Biol Cell.* **21,** 287-301.

Huang, J. and Manning, B. D. (2009). A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem Soc Trans.* **37,** 217-222.

Hubbard, C., Singleton, D., Rauch, M., Jayasinghe, S., Cafiso, D. and Castle, D. (2000). The secretory carrier membrane protein family: structure and membrane topology. *Mol Biol Cell.* **11,** 2933-2947.

Hudson, A. M., Petrella, L. N., Tanaka, A. J. and Cooley, L. (2008). Mononuclear muscle cells in *Drosophila* ovaries revealed by GFP protein traps. *Dev Biol.* **314,** 329-340.

Hummel, T., Schimmelpfeng, K. and Klämbt, C. (1999). Commissure formation in the embryonic CNS of Drosophila. *Dev Biol.* **209,** 381-398.

Huxley, A. F. and Niedergerke, R. (1954). Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature.* **173,** 971-973.

Huxley, H. and Hanson, J. (1954). Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature.* **173,** 973-976.

Igaki, T. (2009). Correcting developmental errors by apoptosis: lessons from *Drosophila* JNK signaling. *Apoptosis.* **14,** 1021-1028.

Isogawa, Y., Kon, T., Inoue, T., Ohkura, R., Yamakawa, H., Ohara, O. and Sutoh, K. (2005). The N-terminal domain of MYO18A has an ATP-insensitive actin-binding site. *Biochemistry.* **44,** 6190-6196.

Ivanov, A. I., Rovescalli, A. C., Pozzi, P., Yoo, S., Mozer, B., Li, H., Yu, S., Higashida, H. et al. (2004). Genes required for *Drosophila* nervous system development identified by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101,** 16216-21.

Iwai, S. and Uyeda, T. Q. P. (2008). Visualizing myosin-actin interaction with a genetically-encoded fluorescent strain sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105,** 16882-16887.

Jackson, M. B. and Chapman, E. R. (2008). The fusion pores of Ca(2+)-triggered exocytosis. *Nat Struct Mol Biol.* **15,** 684-689.

Jahn, R. and Scheller, R. H. (2006). SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7,** 631-643.

Jelén, F., Oleksy, A., Smietana, K. and Otlewski, J. (2003). PDZ domains - common players in the cell signaling. *Acta biochim Pol.* **50,** 985-1017.

Junion, G., Jagla, T., Duplant, S., Tapin, R., Da Ponte, J. and Jagla, K. (2005). Mapping Dmef2-binding regulatory modules by using a ChIP-enriched *in silico* targets approach. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102,** 18479-18484.

Kakihara, K., Shinmyozu, K., Kato, K., Wada, H. and Hayashi, S. (2008). Conversion of plasma membrane topology during epithelial tube connection requires Arf-like 3 small GTPase in *Drosophila*. *Mech Dev.* **125,** 325-336.

Kango-Singh, M. and Singh, A. (2009). Regulation of organ size: insights from the *Drosophila* Hippo signaling pathway. *Dev Dyn.* **238,** 1627-1637.

Karess, R. E. and Rubin, G. M. (1984). Analysis of P transposable element functions in *Drosophila*. *Cell.* **38,** 135-146.

Karess, R. E., Chang, X. J., Edwards, K. A., Kulkarni, S., Aguilera, I. and Kiehart, D. P. (1991). The regulatory light chain of nonmuscle myosin is encoded by *spaghetti-squash*, a gene required for cytokinesis in *Drosophila*. *Cell.* **65,** 1177-1189.

Kastl, L. (2010). Identifikation von Sur-8, sowie Mikrotubuli- und Aktin-assoziierten Proteinen als Interaktionspartner von Rolling pebbles in der Myogenese von *Drosophila melanogaster*. Bachelorarbeit Philipps-Universität-Marburg

Kee, A. J., Gunning, P. W. and Hardeman, E. C. (2009). Diverse roles of the actin cytoskeleton in striated muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* **30,** 187-197.

Kesper, D. A. (2005). Die Analyse der *cis*-Regulation des *rols*-Gens und die Beteiligung von Rols7 am Aufbau eines podosomenähnlichen adhäsiven Komplexes (PILMAC), der eine zentrale Rolle in der Myoblastenfusion bei *Drosophila melanogaste*r einnimmt. Dissertation Philipps-Universität Marburg

Kesper, D. A., Stute, C., Buttgereit, D., Kreisköther, N., Vishnu, S., Fischbach, K. and Renkawitz-Pohl, R. (2007). Myoblast fusion in *Drosophila melanogaster* is mediated through a fusion-restricted myogenic-adhesive structure (FuRMAS). *Dev Dyn.* **236,** 404-415.

Kidokoro, Y. (2003). Roles of SNARE proteins and synaptotagmin I in synaptic transmission: studies at the *Drosophila* neuromuscular synapse. *Neurosignals.* **12,** 13-30.

Kim, S., Shilagardi, K., Zhang, S., Hong, S. N., Sens, K. L., Bo, J., Gonzalez, G. A. and Chen, E. H. (2007). A critical function for the actin cytoskeleton in targeted exocytosis of prefusion vesicles during myoblast fusion. *Dev Cell.* **12,** 571-586.

Kirchner, J., Gross, S., Bennett, D. and Alphey, L. (2007). The nonmuscle myosin phosphatase PP1beta (flapwing) negatively regulates Jun N-terminal kinase in wing imaginal discs of *Drosophila*. *Genetics.* **175,** 1741-1749.

Klämbt, C., Glazer, L. and Shilo, B. Z. (1992). breathless, a *Drosophila* FGF receptor homolog, is essential for migration of tracheal and specific midline glial cells. *Genes Dev.* **6,** 1668-1678.

Klapper, R., Heuser, S., Strasser, T. and Janning, W. (2001). A new approach reveals syncytia within the visceral musculature of *Drosophila melanogaster*. *Development.* **128,** 2517-2524.

Klapper, R., Stute, C., Schomaker, O., Strasser, T., Janning, W., Renkawitz-Pohl, R. and Holz, A. (2002). The formation of syncytia within the visceral musculature of the *Drosophila* midgut is dependent on *duf*, *sns* and *mbc*. *Mech Dev.* **110,** 85-96.

Klemenz, R., Weber, U. and Gehring, W. J. (1987). The *white* gene as a marker in a new P-element vector for gene transfer in *Drosophila*. *Nuc Acids Res.* **15,** 3947-3959.

Kos, J., Jevnikar, Z. and Obermajer, N. (2009). The role of cathepsin X in cell signaling. *Cell Adh Migr.* **3,** 164-166.

Kramer, J. M. and Staveley, B. E. (2003). GAL4 causes developmental defects and apoptosis when expressed in the developing eye of *Drosophila melanogaster*. *Genet Mol Res.* **2,** 43-47.

Kreisköther, N. (2005). In der Myogenese von *Drosophila melanogaster* interagiert Rolling pebbles 7 in den Z-Scheiben der Sarkomere mit a-Aktinin und D-Titin/Kettin/Zormin, in der terminalen Z-Scheibe kolokalisiert es zudem mit Dumbfounded/Kirre. Dissertation Philipps-Universität Marburg

Kreisköther, N., Reichert, N., Buttgereit, D., Hertenstein, A., Fischbach, K. and Renkawitz-Pohl, R. (2006). Drosophila *rolling pebbles* colocalises and putatively interacts with alpha-Actinin and the Sls isoform Zormin in the Z-discs of the sarcomere and with Dumbfounded/Kirre, alpha-Actinin and Zormin in the terminal Z-discs. *J Muscle Res Cell Motil.* **27,** 93-106.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227,** 680-685.

Langevin, J., Morgan, M. J., Rossé, C., Racine, V., Sibarita, J., Aresta, S., Murthy, M., Schwarz, T., Camonis, J. and Bellaïche, Y. (2005). *Drosophila* exocyst components Sec5, Sec6, and Sec15 regulate DE-Cadherin trafficking from recycling endosomes to the plasma membrane. *Dev Cell.* **9,** 365-376.

Laprise, P., Lau, K. M., Harris, K. P., Silva-Gagliardi, N. F., Paul, S. M., Beronja, S., Beitel, G. J., McGlade, C. J. and Tepass, U. (2009). Yurt, Coracle, Neurexin IV and the Na(+),K(+)-ATPase form a novel group of epithelial polarity proteins. *Nature.* **459,** 1141-1145.

Laprise, P., Paul, S. M., Boulanger, J., Robbins, R. M., Beitel, G. J. and Tepass, U. (2010). Epithelial polarity proteins regulate *Drosophila* tracheal tube size in parallel to the luminal matrix pathway. *Curr Biol.* **20,** 55-61.

Lawrence, P. A. and Johnston, P. (1989). Pattern formation in the *Drosophila* embryo: allocation of cells to parasegments by *even-skipped* and *fushi tarazu*. *Development.* **105,** 761-767.

Le Quesne, J. P. C., Spriggs, K. A., Bushell, M. and Willis, A. E. (2010). Dysregulation of protein synthesis and disease. *J Pathol.* **220,** 140-151.

Lee, H., Norris, A., Weiss, J. B. and Frasch, M. (2003). Jelly belly protein activates the receptor tyrosine kinase Alk to specify visceral muscle pioneers. *Nature.* **425,** 507-512.

Leiss, D., Hinz, U., Gasch, A., Mertz, R. and Renkawitz-Pohl, R. (1988). Beta 3 tubulin expression characterizes the differentiating mesodermal germ layer during *Drosophila* embryogenesis. *Development.* **104,** 525-531.

Lemmon, M. A. (2008). Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **9,** 99-111.

Liao, H., Zhang, J., Shestopal, S., Szabo, G., Castle, A. and Castle, D. (2008). Nonredundant function of secretory carrier membrane protein isoforms in dense core vesicle exocytosis. *Am J Physiol Cell Physiol.* **294,** C797-809.

Littleton, J. T. (2000). A genomic analysis of membrane trafficking and neurotransmitter release in *Drosophila*. *J Cell Biol.* **150,** F77-82.

Liu, L., Liao, H., Castle, A., Zhang, J., Casanova, J., Szabo, G. and Castle, D. (2005). SCAMP2 interacts with Arf6 and phospholipase D1 and links their function to exocytotic fusion pore formation in PC12 cells. *Mol Biol Cell.* **16,** 4463-4472.

Lowery, L. A., Lee, H., Lu, C., Murphy, R., Obar, R. A., Zhai, B., Schedl, M., Van, V. D. and Zhan, Y. (2010). Parallel Genetic and Proteomic Screens Identify Msps as a CLASP-Abl Pathway Interactor in *Drosophila*. *Genetics.*

Lowey, S., Waller, G. S. and Bandman, E. (1991). Neonatal and adult myosin heavy chains form homodimers during avian skeletal muscle development. *J Cell Biol.* **113,** 303-310.

Luo, L., Liao, Y. J., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1994). Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: *Drosophila* Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Genes Dev.* **8,** 1787-1802.

Lupas, A. (1996). Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci.* **21,** 375-382.

Lécuyer, E., Parthasarathy, N. and Krause, H. M. (2008). Fluorescent *in situ* hybridization protocols in *Drosophila* embryos and tissues. *Meth Mol Biol.* **420,** 289-302.

Machado, C., Sunkel, C. E. and Andrew, D. J. (1998). Human autoantibodies reveal titin as a chromosomal protein. *J Cell Biol.* **141,** 321-333.

Machado, C. and Andrew, D. J. (2000). D-Titin: a giant protein with dual roles in chromosomes and muscles. *J Cell Biol.* **151,** 639-652.

Mansfield, S. G., al-Shirawi, D. Y., Ketchum, A. S., Newbern, E. C. and Kiehart, D. P. (1996). Molecular organization and alternative splicing in *zipper*, the gene that encodes the *Drosophila* non-muscle myosin II heavy chain. *J Mol Biol.* **255,** 98-109.

Maqbool, T. and Jagla, K. (2007). Genetic control of muscle development: learning from *Drosophila*. *J Mus Res Cell Motil.* **28,** 397-407.

Martens, S., Kozlov, M. M. and McMahon, H. T. (2007). How synaptotagmin promotes membrane fusion. *Science.* **316,** 1205-1208.

Martens, S. and McMahon, H. T. (2008). Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nature Rev.* **9,** 543-556.

Martin, A. C., Kaschube, M. and Wieschaus, E. F. (2009). Pulsed contractions of an actin-myosin network drive apical constriction. *Nature.* **457,** 495-499.

Massarwa, R., Carmon, S., Shilo, B. and Schejter, E. D. (2007). WIP/WASp-based actin-polymerization machinery is essential for myoblast fusion in *Drosophila*. *Dev Cell.* **12,** 557-569.

McMahon, H. T., Kozlov, M. M. and Martens, S. (2010). Membrane curvature in synaptic vesicle fusion and beyond. *Cell.* **140,** 601-605.

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

Menon, S. D., Osman, Z., Chenchill, K. and Chia, W. (2005). A positive feedback loop between Dumbfounded and Rolling pebbles leads to myotube enlargement in *Drosophila*. *J Cell Biol.* **169,** 909-920.

Michael, M., Vehlow, A., Navarro, C. and Krause, M. (2010). c-Abl, Lamellipodin, and Ena/VASP proteins cooperate in dorsal ruffling of fibroblasts and axonal morphogenesis. *Curr Biol.* **20,** 783-791.

Millard, T. H., Sharp, S. J. and Machesky, L. M. (2004). Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex. *Biochem J.* **380,** 1-17.

Mogami, K., O´Donnell, P. T., Bernstein, S. I., Wright, T. R. and Emerson, C. P. Jr. (1986). Mutations oft he *Drosophila myosin heavy-chain* gene: effects on transcription, myosin accumulation, and muscle function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **83,** 1393-1397.

Mori, K., Furusawa, T., Okubo, T., Inoue, T., Ikawa, S., Yanai, N., Mori, K. J. and Obinata, M. (2003). Genome structure and differential expression of two isoforms of a novel PDZ-containing myosin (MysPDZ) (Myo18A). *J Biochem.* **133,** 405-413.

Mori, K., Matsuda, K., Furusawa, T., Kawata, M., Inoue, T. and Obinata, M. (2005). Subcellular localization and dynamics of MysPDZ (Myo18A) in live mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **326,** 491-498.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **51,** 263-273.

Murthy, M., Garza, D., Scheller, R. H. and Schwarz, T. L. (2003). Mutations in the exocyst component Sec5 disrupt neuronal membrane traffic, but neurotransmitter release persists. *Neuron.* **37,** 433-447.

Myers, E. W., Sutton, G. G., Delcher, A. L., Dew, I. M., Fasulo, D. P., Flanigan, M. J., Kravitz, S. A., Mobarry, C. M. et al. (2000). A whole-genome assembly of *Drosophila*. *Science.* **287,** 2196-2204.

Nambiar, R., McConnell, R. E. and Tyska, M. J. (2010). Myosin motor function: the ins and outs of actin-based membrane protrusions. *Cell Mol Life Sci.* **67,** 1239-1254.

Nguyen, H. T., Voza, F., Ezzeddine, N. and Frasch, M. (2007). *Drosophila* mind bomb2 is required for maintaining muscle integrity and survival. *J Cell Biol.* **179,** 219-227.

Nose, A., Isshiki, T. and Takeichi, M. (1998). Regional specification of muscle progenitors in *Drosophila*: the role of the *msh* homeobox gene. *Development.* **125,** 215-223.

O'Donnell, P.T., Collier, V.L., Mogami, K. and Bernstein, S.I. (1989). Ultrastructural and molecular analyses of homozygous-viable *Drosophila melanogaster* muscle mutants indicate there is a complex pattern of myosin heavy-chain isoform distribution. *Genes Dev.* **3,** 1233--1246.

O'Neill, J. W. and Bier, E. (1994). Double-label *in situ* hybridization using biotin and digoxigenin-tagged RNA probes. *BioTechniques.* **17,** 870, 874-5.

Odronitz, F. and Kollmar, M. (2008). Comparative genomic analysis of the arthropod muscle myosin heavy chain genes allows ancestral gene reconstruction and reveals a new type of 'partially' processed pseudogene. *BMC Mol Biol.* **9,** 21.

Önel, S. (2009). Actin regulators take the reins in *Drosophila* myoblast fusion. *Cent Eur J Biol.* **4,** 11-18.

Önel, S. and Renkawitz-Pohl, R. (2009). FuRMAS: triggering myoblast fusion in *Drosophila*. *Dev Dyn.* **238,** 1513-1525.

Önel, S., Bolke, L. and Klämbt, C. (2004). The Drosophila Arf6-GEF Schizo controls commissure formation by regulating Slit. *Development*. **131,** 2587-2594

Önel, S., Dottermusch, C., Sickmann, A., Buttgereit, D. and Renkawitz-Pohl, R. (2010). Role of the actin cytoskeleton within FuRMAS during *Drosophila* myoblast fusion and first functionally conserved factors in vertebrates. *In: Cell fusions: regulation and control* (ed. L. I. Larsson), Berlin: Springer-Verlag.

Oliver, T. N., Berg, J. S. and Cheney, R. E. (1999). Tails of unconventional myosins. *Cell Mol Life Sci.* **56,** 243-257.

Paaby, A. B. and Schmidt, P. S. (2009). Dissecting the genetics of longevity in *Drosophila melanogaster*. *Fly.* **3,** 29-38.

Patel, N. H., Snow, P. M. and Goodman, C. S. (1987). Characterization and cloning of fasciclin III: a glycoprotein expressed on a subset of neurons and axon pathways in *Drosophila*. *Cell.* **48,** 975-988.

Paululat, A., Burchard, S. and Renkawitz-Pohl, R. (1995). Fusion from myoblasts to myotubes is dependent on the *rolling stone* gene (*rost*) of *Drosophila*. *Development.* **121,** 2611-2620.

Paululat, A., Holz, A. and Renkawitz-Pohl, R. (1999). Essential genes for myoblast fusion in *Drosophila* embryogenesis. *Mech Dev.* **83,** 17-26.

Perissi, V., Jepsen, K., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. (2010). Deconstructing repression: evolving models of co-repressor action. *Nat Rev Genet.* **11,** 109-123.

Philippakis, A. A., Busser, B. W., Gisselbrecht, S. S., He, F. S., Estrada, B., Michelson, A. M. and Bulyk, M. L. (2006). Expression-guided *in silico* evaluation of candidate *cis* regulatory codes for *Drosophila* muscle founder cells. *PLoS Comput Biol.* **2,** e53.

Pilot, F. and Lecuit, T. (2005). Compartmentalized morphogenesis in epithelia: from cell to tissue shape. *Dev Dyn.* **232,** 685-694.

Pokrywka, N. J., Payne-Tobin, A., Raley-Susman, K. M. and Swartzman, S. (2009). Microtubules, the ER and Exu: new associations revealed by analysis of *mini spindles* mutations. *Mech Dev.* **126,** 289-300.

Polyák, E., Standiford, D. M., Yakopson, V., Emerson, C. P. J. and Franzini-Armstrong, C. (2003). Contribution of myosin rod protein to the structural organization of adult and embryonic muscles in *Drosophila*. *J Mol Biol.* **331,** 1077-1091.

Pope, K. L. and Harris, T. J. C. (2008). Control of cell flattening and junctional remodeling during squamous epithelial morphogenesis in *Drosophila*. *Development.* **135,** 2227-2238.

Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M. and Séraphin, B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods.* **24,** 218-229.

Raghavan, S., Williams, I., Aslam, H., Thomas, D., Szoor, B., Morgan, G., Gross, S., Turner, J. et al. (2000). Protein phosphatase 1beta is required for the maintenance of muscle attachments. *Curr Biol.* **10,** 269-272.

Rau, A., Buttgereit, D., Holz, A., Fetter, R., Doberstein, S. K., Paululat, A., Staudt, N., Skeath, J., Michelson, A. M. and Renkawitz-Pohl, R. (2001). *rolling pebbles* (*rols*) is required in *Drosophila* muscle precursors for recruitment of myoblasts for fusion. *Development.* **128,** 5061-5073.

Redowicz, M. J. (2007). Unconventional myosins in muscle. *Eur J Cell Biol.* **86,** 549-558.

Richardson, B. E., Beckett, K., Nowak, S. J. and Baylies, M. K. (2007). SCAR/WAVE and Arp2/3 are crucial for cytoskeletal remodeling at the site of myoblast fusion. *Development.* **134,** 4357-4367.

Riechmann, V., Irion, U., Wilson, R., Grosskortenhaus, R. and Leptin, M. (1997). Control of cell fates and segmentation in the *Drosophila* mesoderm. *Development.* **124,** 2915-2922.

Rizo, J. and Rosenmund, C. (2008). Synaptic vesicle fusion. *Nat Struct Mol Biol.* **15,** 665-674.

Rochlin, K., Yu, S., Roy, S. and Baylies, M. K. (2010). Myoblast fusion: when it takes more to make one. *Dev Biology.* **341,** 66-83.

Rock, R. S., Rief, M., Mehta, A. D. and Spudich, J. A. (2000). *In vitro* assays of processive myosin motors. *Methods.* **22,** 373-381.

Rosse, C., Linch, M., Kermorgant, S., Cameron, A. J. M., Boeckeler, K. and Parker, P. J. (2010). PKC and the control of localized signal dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **11,** 103-112.

Rubin, G. M. and Spradling, A. C. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science.* **218,** 348-353.

Ruiz-Gómez, M., Coutts, N., Price, A., Taylor, M. V. and Bate, M. (2000). *Drosophila* dumbfounded: a myoblast attractant essential for fusion. *Cell.* **102,** 189-198.

Ruiz-Gómez, M., Coutts, N., Suster, M. L., Landgraf, M. and Bate, M. (2002). *myoblasts incompetent* encodes a zinc finger transcription factor required to specify fusion-competent myoblasts in *Drosophila*. *Development.* **129,** 133-141.

Rushton, E., Drysdale, R., Abmayr, S. M., Michelson, A. M. and Bate, M. (1995). Mutations in a novel gene, *myoblast city*, provide evidence in support of the founder cell hypothesis for *Drosophila* muscle development. *Development.* **121,** 1979-1988.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* **239,** 487-491.

Salamon, M., Millino, C., Raffaello, A., Mongillo, M., Sandri, C., Bean, C., Negrisolo, E., Pallavicini, A. et al. (2003). Human MYO18B, a novel unconventional myosin heavy chain expressed in striated muscles moves into the myonuclei upon differentiation. *J Mol Biol.* **326,** 137-149.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A Laboratory Manual. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

San Martin,. B. and Bate, M. (2001). Hindgut visceral mesoderm requires an ectodermal template for normal development in *Drosophila*. *Development.* **128,** 233-242.

Sandelin, A., Carninci, P., Lenhard, B., Ponjavic, J., Hayashizaki, Y. and Hume, D. A. (2007). Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. *Nat Rev Genet.* **8,** 424-436.

Sandmann, T., Jensen, L. J., Jakobsen, J. S., Karzynski, M. M., Eichenlaub, M. P., Bork, P. and Furlong, E. E. M. (2006). A temporal map of transcription factor activity: mef2 directly regulates target genes at all stages of muscle development. *Dev Cell.* **10,** 797-807.

Sapir, A., Avinoam, O., Podbilewicz, B. and Chernomordik, L. V. (2008). Viral and developmental cell fusion mechanisms: conservation and divergence. *Dev Cell.* **14,** 11-21.

Schäfer, G., Weber, S., Holz, A., Bogdan, S., Schumacher, S., Müller, A., Renkawitz-Pohl, R. and Önel, S. (2007). The Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) is essential for myoblast fusion in *Drosophila*. *Dev Biol.* **304,** 664-674.

Schneider, I. (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol.* **27,** 353-365.

Schnorrer, F., Schonbauer, C., Langer, C. C. H., Dietzl, G., Novatchkova, M., Schernhuber, K., Fellner, M., Azaryan, A. et al. (2010). Systematic genetic analysis of muscle morphogenesis and function in *Drosophila*. *Nature.* **464,** 287-291.

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

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

Schulz, R. A. and Yutzey, K. E. (2004). Calcineurin signaling and NFAT activation in cardiovascular and skeletal muscle development. *Dev Biol.* **266,** 1-16.

Schumacher, S., Gryzik, T., Tannebaum, S. and Muller, H. J. (2004). The RhoGEF Pebble is required for cell shape changes during cell migration triggered by the *Drosophila* FGF receptor Heartless. *Development.* **131,** 2631-2640.

Sellers, J. R. (2000). Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta.* **1496,** 3-22.

Sellin, J., Drechsler, M., Nguyen, H. T. and Paululat, A. (2009). Antagonistic function of Lmd and Zfh1 fine tunes cell fate decisions in the Twi and Tin positive mesoderm of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol.* **326,** 444-455.

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

Sheng, M. and Sala, C. (2001). PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci.* **24,** 1-29.

Sickmann, A. (2010). Expression von verschiedenen Proteinversionen von Blown fuse sowie Skap2 im Embryo und die mögliche Rolle von Blown fuse in der Myoblastenfusion in *Drosophila melanogaster*. Dissertation Philipps-Universität Marburg

Sierralta, J. and Mendoza, C. (2004). PDZ-containing proteins: alternative splicing as a source of functional diversity. *Brain Res Brain Res Rev.* **47,** 105-115.

Sommer, B., Oprins, A., Rabouille, C. and Munro, S. (2005). The exocyst component Sec5 is present on endocytic vesicles in the oocyte of *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol.* **169,** 953-963.

Spradling, A. C. and Rubin, G. M. (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science.* **218,** 341-347.

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

Stute, C. (2004). Die Determination der Founder- und fusionskompetenten Zellen des viszeralen Mesoderm von *Drosophila melanogaster* ist abhängig von Notch sowie Jeb/Alk vermitteltem RTK-Signalweg. Dissertation Philipps-Universität Marburg

Stute, C., Schimmelpfeng, K., Renkawitz-Pohl, R., Palmer, R. H. and Holz, A. (2004). Myoblast determination in the somatic and visceral mesoderm depends on Notch signalling as well as on milliways(mili(Alk)) as receptor for Jeb signalling. *Development.* **131,** 743-754.

Suggs, J. A., Cammarato, A., Kronert, W. A., Nikkhoy, M., Dambacher, C. M., Megighian, A. and Bernstein, S. I. (2007). Alternative S2 hinge regions of the myosin rod differentially affect muscle function, myofibril dimensions and myosin tail length. *J Mol Biol.* **367,** 1312-1329.

Sullivan, K. M. C. and Rubin, G. M. (2002). The Ca(2+)-calmodulin-activated protein phosphatase calcineurin negatively regulates EGF receptor signaling in *Drosophila* development. *Genetics.* **161,** 183-193.

Sun, Y., McGarrigle, D. and Huang, X. (2007). When a G protein-coupled receptor does not couple to a G protein. *Mol Biosyst.* **3,** 849-854.

Supatto, W., McMahon, A., Fraser, S. E. and Stathopoulos, A. (2009). Quantitative imaging of collective cell migration during *Drosophila* gastrulation: multiphoton microscopy and computational analysis. *Nat Protoc.* **4,** 1397-1412.

Sweeney, S. T., Broadie, K., Keane, J., Niemann, H. and O'Kane, C. J. (1995). Targeted expression of tetanus toxin light chain in *Drosophila* specifically eliminates synaptic transmission and causes behavioral defects. *Neuron.* **14,** 341-351.

Takenawa, T. and Suetsugu, S. (2007). The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nature Rev.* **8,** 37-48.

Tautz, D. and Pfeifle, C. (1989). A non-radioactive *in situ* hybridization method for the localization of specific RNAs in Drosophila embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma.* **98,** 81-85.

Taylor, M. V. (1998). Muscle development: a transcriptional pathway in myogenesis. *Curr Biol.* **8,** R356-358.

Tepass, U. (2009). FERM proteins in animal morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev.* **19,** 357-367.

Thomas, B. J. and Wassarman, D. A. (1999). A fly's eye view of biology. *Trends Genet.* **15,** 184-190.

Trichet, L., Sykes, C. and Plastino, J. (2008). Relaxing the actin cytoskeleton for adhesion and movement with Ena/VASP. *J Cell Biol.* **181,** 19-25.

Tupling, A. R. (2009). The decay phase of Ca2+ transients in skeletal muscle: regulation and physiology. *Appl Physiol Nutr Metab.* **34,** 373-376.

Tzolovsky, G., Millo, H., Pathirana, S., Wood, T. and Bownes, M. (2002). Identification and phylogenetic analysis of *Drosophila melanogaster* myosins. *Mol Biol Evol.* **19,** 1041-1052.

van der Velden, A. W. and Thomas, A. A. (1999). The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development. *Int J Biochem Cell Biol.* **31,** 87-106.

van Straaten, M., Goulding, D., Kolmerer, B., Labeit, S., Clayton, J., Leonard, K. and Bullard, B. (1999). Association of kettin with actin in the Z-disc of insect flight muscle. *J Mol Biol.* **285,** 1549-1562.

Vereshchagina, N., Bennett, D., Szoor, B., Kirchner, J., Gross, S., Vissi, E., White-Cooper, H. and Alphey, L. (2004). The essential role of PP1beta in *Drosophila* is to regulate nonmuscle myosin. *Mol Biol Cell.* **15,** 4395-4405.

Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R. S. and Horwitz, A. R. (2009). Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **10,** 778-790.

Voets, T. (2000). Dissection of three Ca2+-dependent steps leading to secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron.* **28,** 537-545.

Watt, K. I., Judson, R., Medlow, P., Reid, K., Kurth, T. B., Burniston, J. G., Ratkevicius, A., De Bari, C. and Wackerhage, H. (2010). Yap is a novel regulator of C2C12 myogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* **393,** 619-624.

Wickner, W. and Schekman, R. (2008). Membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol.* **15,** 658-664.

Wilkie, G. S., Dickson, K. S. and Gray, N. K. (2003). Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends Biochem Sci.* **28,** 182-188.

Wimmer, E. A., Cohen, S. M., Jackle, H. and Desplan, C. (1997). buttonhead does not contribute to a combinatorial code proposed for *Drosophila* head development. *Development.* **124,** 1509-1517.

Wolfstetter, G., Shirinian, M., Stute, C., Grabbe, C., Hummel, T., Baumgartner, S., Palmer, R. H. and Holz, A. (2009). Fusion of circular and longitudinal muscles in *Drosophil*a is independent of the endoderm but further visceral muscle differentiation requires a close contact between mesoderm and endoderm. *Mech Dev.* **126,** 721-736.

Woolner, S. and Bement, W. M. (2009). Unconventional myosins acting unconventionally. *Trends Cell Biol.* **19,** 245-252.

Wu, X., Jung, G. and Hammer, J. A. (2000). Functions of unconventional myosins. *Curr Opin Cell Biol.* **12,** 42-51.

Xu, T., Wang, W., Zhang, S., Stewart, R. A. and Yu, W. (1995). Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila lats* gene encodes a putative protein kinase. *Development.* **121,** 1053-1063.

Yepiskoposyan, H., Egli, D., Fergestad, T., Selvaraj, A., Treiber, C., Multhaup, G., Georgiev, O. and Schaffner, W. (2006). Transcriptome response to heavy metal stress in *Drosophila* reveals a new zinc transporter that confers resistance to zinc. *Nucleic Acids Res.* **34,** 4866-4877.

Young, P. E., Richman, A. M., Ketchum, A. S. and Kiehart, D. P. (1993). Morphogenesis in *Drosophila* requires nonmuscle myosin heavy chain function. *Genes Dev.* **7,** 29-41.

Zhang, Y., Featherstone, D., Davis, W., Rushton, E. and Broadie, K. (2000). *Drosophila* D-titin is required for myoblast fusion and skeletal muscle striation. *J Cell Sci.* **113,** 3103-3115.

Zhang, S. and Bernstein, S. I. (2001). Spatially and temporally regulated expression of *myosin heavy chain* alternative exons during *Drosophila* embryogenesis. *Mech Dev.* **101,** 35-45.

Zhang, L., Hernan, R. and Brizzard, B. (2001). Multiple tandem epitope tagging for enhanced detection of protein expressed in mammalian cells. *Mol Biotechnol.* **19,** 313-321.

Zhang, S., Ma, C. and Chalfie, M. (2004). Combinatorial marking of cells and organelles with reconstituted fluorescent proteins. *Cell.* **119,** 137-144.

Zhang, L., Yue, T. and Jiang, J. (2009). Hippo signaling pathway and organ size control. *Fly.* **3,** 68-73.

Zhao, D. B., Cote, S., Jahnig, F., Haller, J. and Jackle, H. (1988). *Zipper* encodes a putative integral membrane protein required for normal axon patterning during *Drosophila* neurogenesis. *EMBO J.* **7,** 1115-1119.

Zhao, H., Zheng, X., Yuan, X., Wang, L., Wang, X., Zhong, Y., Xie, Z. and Tully, T. (2009). ben Functions with scamp during synaptic transmission and long-term memory formation in *Drosophila*. *J Neurosci.* **29,** 414-424.

Zimmermann, P. (2006). The prevalence and significance of PDZ domain-phosphoinositide interactions. *Biochim Biophys Acta.* **1761,** 947-956.

8. Anhang

8.1 Abkürzungen

Blow	Blown fuse	bp/kb	(Kilo-) Basenpaare
CanB	Calcineurin B	cDNA	codierende DNA
CG	vorhergesagtes Gen	Cka	Connector of Kinase to AP-1
Cora	Coracle	CVM	Caudal Visceral Mesoderm
DAB	Diaminobenzidin	Df	Defizienz
d. h.	das heißt	dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
DMef2	Myocyte enhancing factor 2 in *D. melanogaster*	Duf/Kirre	Dumbfounded/ Kin of irregular chiasm C
Ena	Enabled	Eve	Evenskipped
evtl.	eventuell	FC	founder cell oder Gründerzelle
FCM	fusionskompetente Myoblaste	Flw	Flapwing
FuRMAS	Fusion-Resticted Myogenic-Adhesive Structure	GEF	Guanin-Nukleotidaustauschfaktor
		h	Stunde(n)
Hbs	Hibris	HCl	Salzsäure
Hppy	Happyhour	Ig	Immunoglobuline
lmd/minc/gfl	lameduck/myoblasts incompetent/gleeful	Mbc	Myoblast city
		Mhc	Myosin heavy chain
Mhcl	Myosin heavy chain like	min	Minute(n)
ml	Milliliter	(m)M	(milli) molar
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)	Msps	Mini spindles
OD	optische Dichte	PBS	Natriumphosphatpuffer
PC	precursor cell oder Vorläuferzelle	PCR	Polymerasekettenreaktion
		rEK	rekombinante Enterokinase
RNAi	RNA Interferenz	Rols7/Ants	Rolling pebbles7/Antisocial
Rst/IrreC	Rougest/Irregular chiasm C	RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)	SM/VM	somatisches/viszerales Mesoderm
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor	Sns	Sticks and stones
		Sxe2	Sex specific enzyme 2
		TBS	Tris buffered saline
TVM	Trunk Visceral Mesoderm	U	Einheit (unit)
u. a.	unter anderem	ü. N.	über Nacht
UAS	stromaufwärts gelegene Aktivierungssequenz	UpM	Umdrehungen pro Minute
		UTR	nicht translatierte Region
VT	Volumenteile	v/v	Volumen pro Volumen
wg	wingless	WT	Wildtyp
Wts	Warts	w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
YFP	gelb fluoreszierendes Protein		
z. B.	zum Beispiel	Zip	Zipper
Zns	Zentrales Nervensystem		

8.2 Kreuzungsschemata

Die in dieser Arbeit durchgeführten Kreuzungsschritte sind jeweils mit einer kurzen Beschreibung angeführt. Zur besseren Übersichtlichkeit sind nur die Teile des Genotyps angegeben, welche für das Verständnis essentiell sind (für die exakte Genotypen-Bezeichnung siehe 3.8).

8.2.1 Unpräzise Entfernung des P-Elements *P{EPgy2}EY00454*

Einkreuzen der Transposase in die P-Element-Linie:
Δ2-3 Ki/TM3, Sb x P{EPgy2}EY00454/P{EPgy2}EY00454

Transposition des P-Elements:
Dr/SbTDlZ x Δ2-3 Ki/P{EPgy2}EY00454

Auskreuzen der Transposase:
Dr/SbTDlZ x ~~Δ2-3Ki, P{EPgy2}EY00454~~/SbTDlZ (es werden nur Tiere verkreuzt, die weder den Marker Ki tragen noch rote Augen als Zeichen für P{EPgy2}EY00454 besitzen)

Etablierung von Fliegenlinien mit unterschiedlichen Transpositionsereignissen:
~~Δ2-3Ki P{EPgy2}EY00454~~/SbTDlZ x ~~Δ2-3Ki P{EPgy2}EY00454~~/SbTDlZ

Testkreuzungen auf Letalität der etablierten Linien und auf Letalität gegen Df(3R)Exel7328

8.2.2 Rekombination von *Df(3L)BK9/SbTDlZ* und *ΔMhcl/SbTDlZ*

Verkreuzen der Einzelmutanten:
Df(3L)BK9, e^1/SbTDlZ, e^1 x ΔMhcl/SbTDlZ, e^1

Rekombination der Allele:
ΔMhcl/Df(3L)BK9, e^1 x Dr/SbTDlZ, e^1 (dabei Verlust von e^1)

Vereinzelung der Rekombinationsereignisse (jeweils in Einzelpaarzuchten):
ΔMhcl, Df(3L)BK9/SbTDlZ, e^1 x Dr/SbTDlZ, e^1

Etablierung von Fliegenlinien mit unterschiedlichen Rekombinationsereignissen:
ΔMhcl, Df(3L)BK9, e^1/SbTDlZ, e^1 x ΔMhcl, Df(3L)BK9, e^1/SbTDlZ, e^1

Testkreuzungen auf Letalität der etablierten Linien und auf Letalität gegen die Einzelmutanten; Analoges Vorgehen bei Rekombination von *ΔMhcl/SbTDlZ* und *P{EPgy2}Myo95E*^{EY22671}

8.2.3 Erstellung einer *zip2; ΔMhcl*-doppelmutanten Fliegenlinie

Markierung/Balancierung der Einzelmutanten:
zip^2/CyO-hg-lacZ; +/+ x Sp/CyO-wg-lacZ; TM2/TM6-ftz-lacZ

zip^2/CyO-wg-lacZ; TM2/+ x zip^2/CyO-wg-lacZ; TM6-ftz-lacZ/+

zip^2/CyO-wg-lacZ; TM2/TM6-ftz-lacZ x zip^2/CyO-wg-lacZ; TM2/TM6-ftz-lacZ

bzw.: +/+; ΔMhcl/SbTDlZ x Sp/CyO-hg-lacZ; TM2/SbTDlZ
Sp/+; ΔMhcl/SbTDlZ x CyO-hg-lacZ/+; ΔMhcl/SbTDlZ

Sp/CyO-hg-lacZ; ΔMhcl/SbTDlZ x Sp/CyO-hg-lacZ; ΔMhcl/SbTDlZ

Verkreuzen dieser beiden Fliegenlinien und Etablierung eines stabilen Stamms:
zip^2/CyO-wg-lacZ; TM2/TM6-ftz-lacZ x Sp/CyO-hg-lacZ; ΔMhcl/SbTDlZ

zip^2/CyO-hg-lacZ; ΔMhcl/TM6-ftz-lacZ x zip^2/CyO-hg-lacZ; ΔMhcl/TM6-ftz-lacZ

8.2.4 Gendosisexperimente

Verkreuzen der etablierten doppelmutanten Fliegenlinie mit den einzelmutanten Linien:
zip^2/CyO-hg-lacZ; ΔMhcl/TM6-ftz-lacZ x zip^2/CyO-hg-lacZ; +/+

bzw.: zip^2/CyO-hg-lacZ; ΔMhcl/TM6-ftz-lacZ x +/+; ΔMhcl/SbTDlZ

Analyse der Nachkommen dieser Kreuzungen

8.3 Danksagung

Ganz herzlich beDANKEn möchte ich mich bei ...

... Frau Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl für das Thema meiner Doktorarbeit und die kompetente, motivierende Betreuung während der letzten Jahre und dafür, dass sie immer mit Rat und Tat zur Seite stand

... Frau Prof. Dr. Monika Hassel für das Erstellen des Zweitgutachtens und das komplett eingerichtete Zellkulturlabor, welches ich benutzen durfte

... Detlev Buttgereit für die vielen guten Ratschläge, die Anleitung zur Kritikfähigkeit und so manche aufbauenden Worte, die ich von Dir in den letzten Jahren bekommen habe

... Ruth für die Durchführung der Mikroinjektionen

... Inge für das Ausführen manch ungeliebter Tätigkeiten

... Susanne Ö. und Christina R. für Tipps, Tricks und Protokolle

... Barbara, Susanne, Angela, Stephan, Matthias und allen anderen für die lustigen Mensa-Runden

... allen jetzigen und ehemaligen Mitglieder des Labors 3020 für die schöne und entspannte Arbeitsatmosphäre

... Christina Ho. und Jessi für viele Taxifahrten

... Anja und Katja L. für viele lustige Begegnungen und manch schönen Feierabend

... Katja G. für immer offene Ohren, die Hilfe bei den Schemata und häufig gefüllte Espresso-Tassen

... allen anderen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Renkawitz-Pohl für die tolle Zeit, die ich mit Euch verbringen durfte, bei so vielen Feiern und Pausen auf der Terrasse ging die Arbeit viel leichter von der Hand

... Sandra und Sonja für das gemeinsame „Stellunghalten“ in Marburg, die Spieleabende und sonstigen Freizeitaktivitäten

... manchen Freunden, die mich in letzter Zeit eher selten zu Gesicht bekommen haben

... Grit und allen anderen Chorsängerinnen und –sängeren für viele schöne Dienstagabende und die Erkenntnis, dass es ein Leben neben der Arbeit gibt

... und last but not least meiner Familie, die mich auch aus der Ferne immer unterstützt und Anteil an meiner Arbeit genommen hat

8.4 Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

Myosin heavy chain like (Mhcl) agiert während der Embryonalentwicklung und Myogenese von *Drosophila melanogaster* in Redundanz zu Zipper, die Funktion des C2-Domänen-Proteins CG10737-P während der Muskelentwicklung bleibt unklar

unter der Leitung von Frau Prof. Dr. R. Renkawitz-Pohl (Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg) selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich angegebenen Quellen und Hilfen bedient habe.

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

Marburg, den

8.5 Lebenslauf

persönliche Daten

Name:	Bonn
Vorname:	Bettina
Geburtsdatum:	18.01.1982
Geburtsort:	Aschaffenburg

Bildungsweg:

1988-1992:	Grundschule Großostheim
1992-2001:	Kronberg-Gymnasium Aschaffenburg, Abschluss: allgemeine Hochschulreife
2001-2006:	Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg, Abschluss: Diplom
2006-2010:	Promotion im Fachbereich Entwicklungsbiologie der Philipps-Universität Marburg, Leitung: Frau Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl