

Die Funktion des *Drosophila* NHL-Domänen
Proteins Wech und seiner Interaktionspartner in
der Integrin-vermittelten Zelladhäsion

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Birgit Lör

aus

Arnsberg

Bonn 2008

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. rer. nat. M. Hoch
2. Referent: Prof. Dr. rer. nat. W. Kolanus

Eingereicht am: 28. Januar 2008

Tag der Promotion: 05. Mai 2008

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn „http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online“ elektronisch publiziert.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgender Originalpublikation veröffentlicht:

Löer, B., Bauer, R., Bornheim, R., Grell, J., Kremmer, E., Kolanus, W. and Hoch, M. (2008) **The NHL-domain protein Wech is crucial for the integrin-cytoskeleton link.** *Nat Cell Biol*, 10(4): 422-8.

weitere Publikationen:

Knieps, M., Herrmann S., Lehmann, C., Löer, B., Hoch, M. and Famulok, M. (2007) **Anti-innexin 2 aptamers specifically inhibit the heterologous interaction of the innexin 2 and innexin 3 carboxyl-termini in vitro.** *Biol Chem.*, 388(6): 561-8.

Lehmann, C., Lechner, H., Löer, B., Knieps, M., Herrmann, S., Famulok, M., Bauer, R. and Hoch, M. (2006) **Heteromerization of innexin gap junction proteins regulates epithelial tissue organization in Drosophila.** *Mol Biol Cell.*, 17(4): 1676-85.

Bauer, R., Löer, B., Ostrowski, K., Martini, J., Weimbs, A., Lechner, H. and Hoch, M. (2005) **Intercellular communication: the Drosophila innexin multiprotein family of gap junction proteins.** *Chem Biol.* 2005, 12(5): 515-26.

Verwendete Abkürzungen

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
A.bidest	zweifach destilliertes Wasser
AK	Antikörper
Amp	Ampizilin
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumin)
c	Konzentration
C	Cytidin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CS	zytoplasmatische Schleife
CT	Carboxyterminus
Da	Dalton ($1 \text{ Da} = 1,7 \times 10^{-24} \text{ g}$)
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
et al.	Et aliter
ECL	engl: enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
EtOH	Ethanol
g	Gramm
G	Guanosin
Gal	Galaktose
GST	Glutathion-S-Transferase
Glu	Glokose
h	Stunde
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl.: horseradish peroxidase)
Inx	Innexin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare

KfE	Kolonienformende Einheiten
kg	Kilogramm
l	Liter
LB	Luria Broth
μ	Mikro
m	Milli
M	Molar (mol/l)
min	Minute
mRNA	Boten-RNA
n	Nano
NBT	4-Nitro-blue-tetrazolium-chlorid
NT	Aminotermius
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl.: phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec.	Sekunde
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
Tween20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
ÜN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	Verhältnis Volumen zu Volumen (engl.: volume to volume)
WT	Wildtyp
w/v	Verhältnis Masse zu Volumen (engl.: weight to volume)
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Entwicklung der Muskulatur in <i>Drosophila melanogaster</i>	1
1.1.1	Die Differenzierung des Mesoderms	1
1.1.2	Die Entwicklung der somatischen Muskulatur	3
1.1.3	Die zellulären Aspekte der Myoblastenfusion	5
1.2	Die Ausbildung der epidermalen Muskelanhaftungsstelle	8
1.3	Die Zelladhäsion	12
1.3.1	Die verschiedenen Zelladhäsionsmoleküle	13
1.4	Der integrinassoziierter Proteinkomplex	18
1.4.1	Talin	19
1.4.2	Integrin-linked Kinase (ILK)	21
1.4.3	Tensin	22
1.5	Ziel der Arbeit	23
2	Material	25
2.1	Allgemeine Materialien	25
2.1.1	Chemikalien	25
2.1.2	Verbrauchsmaterial	25
2.1.3	Geräte	25
2.2	Standards und Kits	26
2.3	Puffer und Lösungen	27
2.4	Enzyme und Puffer	30
2.5	Antikörper	31
2.6	mRNA <i>in-situ</i> Sonden	32
2.7	Vektoren	33
2.8	Oligonukleotide	33
2.8.1	Klonierungsprimer	33
2.8.2	Sequenzierprimer	35

2.8.3	real-time Primer	35
2.9	Genbank	36
2.10	Organismen	36
2.10.1	Bakterienstämme	36
2.10.2	Hefestämme	36
2.10.3	Fliegenstämme	37
2.11	Medien für die Bakterien- und Hefekultur	42
2.11.1	Bakterienkultur	42
2.11.2	Hefekultur	43
2.11.3	Medien für die Kultivierung von <i>Drosophila melanogaster</i>	43
3	Methoden	45
3.1	Plasmid-Isolierung aus <i>E.coli</i>	45
3.1.1	Isolierung von Plasmiden im analytischen Maßstab	45
3.1.2	Isolierung von Plasmiden im präparativen Maßstab	45
3.2	Isolierung von genomischer DNA aus Fliegen	46
3.3	Isolierung von RNA aus Gewebe	46
3.4	cDNA-Synthese	46
3.5	Agarosegelelektrophorese	47
3.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	48
3.7	DNA-Aufreinigung	49
3.7.1	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	49
3.7.2	Natriumacetat-Fällung	49
3.7.3	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	50
3.7.4	Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von gereinigter DNA	50
3.8	Klonierung von DNA-Fragmenten	51
3.8.1	Enzymatische Spaltung von DNA durch Restriktions- endonukleasen	51
3.8.2	Vorbereitung eines Plasmidvektors für die Aufnahme von Passagier-DNA	51
3.8.3	Ligation von DNA-Fragmenten	51
3.8.4	TOPO-Klonierung	52
3.9	Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien	53
3.9.1	Herstellung kompetenter Bakterien	53
3.9.2	Transformation kompetenter Bakterien	53
3.10	Biochemische Methoden	54
3.10.1	Zellkultur	54
3.10.2	Herstellung von Proteinextrakten	56
3.10.3	Konzentrationsbestimmung isolierter Proteine mit dem BCA-Test	57

3.10.4	Immunoblot-Analyse (Western Blotting)	57
3.10.5	Koimmunpräzipitation (Zellkultur und Embryo)	59
3.10.6	GST-Präzipitation	61
3.11	Das Ras-Recruitment-System	62
3.11.1	Allgemeines Arbeiten mit Hefe	62
3.12	Arbeiten mit der Fruchtfliege <i>Drosophila melanogaster</i>	67
3.12.1	Fliegenhaltung	67
3.12.2	Fixierung von <i>Drosophila</i> -Embryonen	67
3.12.3	Antikörperfärbung an <i>Drosophila</i> -Embryonen	68
3.12.4	<i>In-situ</i> Hybridisierung an <i>Drosophila</i> Embryonen	70
3.12.5	<i>Drosophila</i> Kreuzungsexperimente	72
3.12.6	Das GAL4-UAS System in <i>Drosophila melanogaster</i>	73
3.12.7	P-Element vermittelte Keimbahntransformation in <i>Drosophila</i> . . .	73
3.12.8	Identifikation des P-Element Insertionslokus durch „plasmid rescue“	75
3.12.9	Mutagenese durch P-Element-Mobilisierung	75
3.12.10	Generierung von mutanten Keimbahn-Klonen	76
4	Ergebnisse	77
4.1	Molekulare Charakterisierung des <i>wech</i> -Lokus (CG1624)	77
4.2	Expressionsmuster des <i>wech</i> Transkripts	80
4.3	Spezifität des anti-Wech Antikörpers	81
4.3.1	Immunoblot-Versuche mit dem anti-Wech Antikörper	82
4.3.2	Spezifität des anti-Wech Antikörpers in der Immunfluoreszenz . . .	83
4.4	Anti-Wech Immunfluoreszenzen in Embryonen	84
4.5	Wech Lokalisation in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle	86
4.6	Generierung von <i>wech</i> -Mutanten	87
4.6.1	Charakterisierung der generierten <i>wech</i> -Mutanten mittels PCR . . .	88
4.6.2	Analyse der <i>wech</i> -Expression in den erzeugten Mutanten	89
4.6.3	Bestimmung der Letalität der <i>wech</i> -Mutanten	91
4.6.4	Phänotyp der <i>wech</i> -Mutante	92
4.6.5	Rettung des <i>wech</i> mutanten Phänotyps	95
4.7	Die Rolle von Wech in der integrin-vermittelten Zelladhäsion	96
4.7.1	Lokalisation von Wech in β PS-Integrin-Mutanten	96
4.7.2	Expression von Integrinen in <i>wech</i> -Mutanten	97
4.7.3	Wech und der zytoplasmatische Integrin-Komplex	100
4.7.4	Modell der integrin-vermittelten Zelladhäsion in der Muskelanhaftungsstelle	109
4.8	Die Funktion der BCC- und NHL-Domäne von Wech	110
4.9	Identifikation von potentiellen Wech-Interaktionspartnern	112

4.9.1	Klonierung des Köderplasmids	113
4.9.2	Test des Köderplasmids auf Autoaktivierung	113
4.9.3	Durchmusterung der <i>Drosophila</i> cDNA-Bank auf potentielle Interaktionspartner der WechNHL-Domäne	114
4.9.4	Isolierung der pMyr-Plasmid-DNA aus Hefezellen	115
4.9.5	Bestätigung der Interaktion von potentiell positiven Interaktionspartnern durch Retransformation in <i>cdc25</i> -Hefezellen	115
4.9.6	Sequenzanalyse der potentiell positiven Interaktionspartner	116
4.10	Die Funktion von Innexin3 in der Tendonzelle	118
4.10.1	Innexin3 und Wech sind in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle koexprimiert	119
4.10.2	Koexpression von Innexin3 mit den Komponenten des integrin-assoziierten Proteinkomplexes	122
4.10.3	Innexin3 Expression in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle ist von Wech abhängig	123
4.10.4	Herunterregulierung von Innexin3 führt zu einem <i>wech</i> mutanten Phänotyp	123
4.11	Spezifizierung der embryonalen Segmentgrenzen von <i>Drosophila</i>	124
4.11.1	Die Funktion von Innexin3 in Bildung und Aufrechterhaltung der Segmentgrenzen	127
5	Diskussion	135
5.1	Die Klasse der RBCC-Proteine	135
5.1.1	Die Funktion der RBCC-Domänen	136
5.1.2	Ein Vergleich von Wech mit den <i>Drosophila</i> NHL-Domänen Proteinen	138
5.2	Vergleich der Expressionsmuster von <i>wech</i> während der Entwicklung	140
5.3	<i>wech</i> Mutanten weisen Muskelanhaftungsdefekte auf	141
5.4	Wech Proteinexpression	143
5.5	Vergleich der Phänotypen von <i>wech</i> und PS-Integrinen	145
5.6	Wech fungiert als Adapter in dem zytoplasmatischen Integrin-Komplex	148
5.7	Wech-Interaktionspartner bestätigen Funktion in Muskeln	151
5.8	Wech und Innexin3 in der integrin-vermittelten Zelladhäsion	152
5.9	Innexine und die Spezifizierung der Segmentgrenzen in <i>Drosophila</i>	153
6	Zusammenfassung	155
7	Anhang	157
7.1	Die somatische Muskulatur von <i>Drosophila melanogaster</i>	157

7.2	Embryonalentwicklung von <i>Drosophila melanogaster</i>	158
7.3	Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz von <i>wech</i>	159
7.4	Sequenzvergleich der Wech Orthologen	160
7.5	Sequenzvergleich der <i>Drosophila</i> NHL-Proteine	161
7.6	Kreuzungsschema zur Generierung von <i>wech</i> -Mutanten	162
7.7	Spezifitätstest Inx3-CT Antikörper	163
7.8	Funktionalität der RNAi-inx3-Konstrukte	163
Abbildungsverzeichnis		165
Literaturverzeichnis		169

Kapitel 1

Einleitung

Die Inzidenz von erblichen Muskelerkrankungen stellt einen wichtigen Bestandteil der heutigen medizinischen Forschung dar. Die Möglichkeiten genetische Dispositionen im humanen sowie anderen Vertebratensystemen genauer zu untersuchen sind begrenzt. Aus diesem Grund ist die Taufliege *Drosophila melanogaster* ein idealer Modellorganismus, der dazu beitragen kann die Grundlagen von konservierten Prozessen, die zum Beispiel die Muskelentwicklung betreffen, aufzuschlüsseln. Dabei besteht eine wichtige Parallele zwischen *Drosophila* und höher entwickelten Organismen darin, dass in beiden Fällen die Muskulatur einen synzytialen Aufbau vorweist, und jeder Muskel durch seine Größe, Lage, Form und Anhaftung genau identifiziert werden kann. Die Entwicklung dieses spezifischen Muskelplans hängt von einer Reihe zellulärer Ereignisse ab, die unter anderem Zellfusion, Migration und Anhaftung beinhalten. Diese Prozesse, die während der Entwicklung genau aufeinander abgestimmt sein müssen, werden im Folgenden näher erläutert.

1.1 Die Entwicklung der Muskulatur in *Drosophila melanogaster*

1.1.1 Die Differenzierung des Mesoderms

Das Mesoderm von *Drosophila* entsteht aus den ventral lokalisierten Zellen des Embryos während des Blastodermstadiums. Mit Einsetzen der Gastrulation invaginieren diese ventralen Zellen und migrieren in dorsale Richtung, so dass sie sich unterhalb des Ektoderms befinden. Die Unterteilung des Mesoderms in seine verschiedenen Derivate wie Herz, Fettkörper, sowie viszerale und somatische Muskulatur beginnt während der Rückbildung des Keimstreifens und ist von dem räumlich variierenden Expressionsmuster des Transkriptionsfaktors Twist (Twi) abhängig. Aus Bereichen mit hoher Twist-

Konzentration entwickelt sich die somatische Muskulatur und der Fettkörper, während aus den Bereichen mit niedriger Twist-Konzentration die viszerale Muskulatur und das Herz hervorgehen (Baylies und Bate, 1996; Michelson, 1996; Taylor, 1996).

Verschiedene intrinsische sowie extrinsische Faktoren sind für die präzise Unterteilung des Mesoderms entlang der dorso-ventralen und anterior-posterioren Achse verantwortlich. Das Ektoderm sezerniert dabei Decapentaplegic (Dpp), ein Mitglied der transformierenden Wachstumsfaktorfamilie β (TGF- β). Dpp wirkt auf die am weitesten dorsal lokalisierten Zellen im Mesoderm und ist für die kontinuierliche Aufrechterhaltung der Expression des Homeobox-Gens *tinman* (*tin*) in diesen Zellen verantwortlich (Xu et al., 1998). Gleichzeitig reprimiert Dpp die Expression von ventral exprimierten Genen wie *pox meso* (Baylies et al., 1998). Tin seinerseits aktiviert die Differenzierung der dorsalen Strukturen der somatischen Muskulatur, sowie die Differenzierung der viszeralen Muskulatur und des Herzens (Azpiazu und Frasch, 1993; Bodmer, 1993). Gleichzeitig induziert es die Transkription eines zweiten Homeobox-Gens, *bagpipe* (*bap*), das für die Differenzierung der viszeralen Muskulatur notwendig ist (Azpiazu und Frasch, 1993).

Parallel zur dorso-ventralen Unterteilung des Mesoderms findet auch die Unterteilung in anterior-posteriore Bereiche statt, die größtenteils durch intrinsische Signale beeinflusst wird. Die Unterteilung des Mesoderms in anterior-posteriore Bereiche wird durch die Segmentierungsgene *even-skipped* (*eve*) (Azpiazu et al., 1996) und *sloppy-paired* (*slp*) (Riechmann et al., 1997) vermittelt. Die Expression dieser beiden Gene unterteilt das Mesoderm in zwei Domänen, aus denen verschiedene Vorläuferzellpopulationen hervorgehen (Abb. 1.1). So differenzieren sich die Eve exprimierenden Zellen im anterioren Teil eines Parasegments zu Zellen des viszeralen Mesoderms und des Fettkörpers, während die Slp exprimierenden Zellen im posterioren Teil sich zu somatischer Muskulatur und Herz entwickeln (Abb. 1.1) (Azpiazu und Frasch, 1993; Azpiazu et al., 1996; Riechmann et al., 1997).

Des Weiteren induziert die Expression von Eve und Slp die Aktivierung der Segmentpolaritätsgene *wingless* (*wg*), *hedgehog* (*hh*) und *engrailed* (*en*), die sowohl im Mesoderm als auch im Ektoderm vorkommen. Hedgehog und Engrailed, die im anterioren Bereich der Eve-Domäne exprimiert werden, sind für die Entwicklung der dort angelegten Mesodermderivate verantwortlich (Lawrence et al., 1994; Riechmann et al., 1997), während Wingless im posterioren Bereich der Slp-Domäne exprimiert wird (Abb. 1.1). Hedgehog induziert die Aktivität von *bagpipe* und *serpent* in der Eve-Domäne, während Wingless diese Gene in der Slp-Domäne reprimiert. Die Expression von Serpent determiniert dabei die Zellen der Eve-Domäne, aus denen später der Fettkörper hervorgeht. Die hohe Twist-Expression im ventralen Bereich der Slp-Domäne führt dazu, dass aus diesen Zellen die somatische Muskulatur entsteht, während im dorsalen Bereich das Primordium für das Herz angelegt wird (Azpiazu et al., 1996; Riechmann et al., 1997).

1.1 Die Entwicklung der Muskulatur in *Drosophila melanogaster*

In Abbildung 1.1 sind die oben beschriebenen Verteilungen der das mesodermspezifisierenden Faktoren von *Drosophila* schematisch dargestellt.

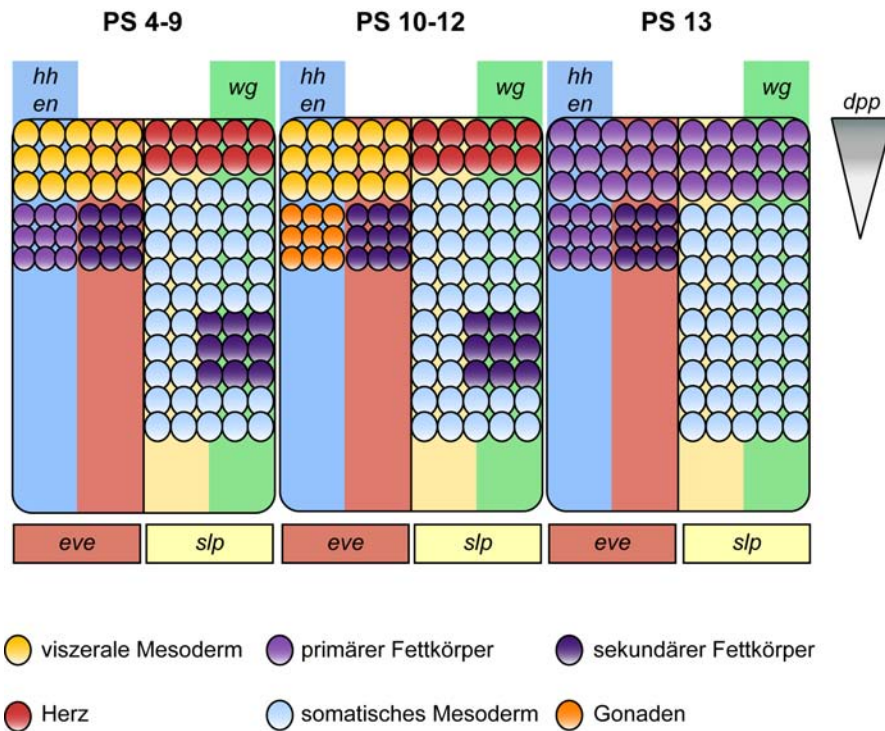


Abb. 1.1: Unterteilung des Mesoderms in die verschiedenen Anlagen. Die Zellen des Mesoderms werden durch eine Reihe von extrinsischen (Dpp, Hh, En, Wg) und intrinsischen (Eve, Slp) Signalen in unterschiedliche Bereiche unterteilt. Aus diesen gehen die diversen Mesodermderivate wie viszerales Mesoderm, Fettkörper, Herz, somatisches Mesoderm und Gonaden hervor (erstellt nach Riechmann et al., 1997). PS = Parasegment.

1.1.2 Die Entwicklung der somatischen Muskulatur

Am Ende der Embryonalentwicklung besteht die somatische Muskulatur von *Drosophila melanogaster* aus einem komplexen Muster von 30 verschiedenen Muskeln je abdominalem Hemisegment. Dabei ist jeder Muskel durch seine individuelle Größe, Form, Ausrichtung und epidermale Anhaftungsstelle genau definiert (siehe Abb. 7.2) (Bate, 1990; Beckett und Baylies, 2006).

Nach der Twist-induzierten Spezifizierung des somatischen Mesoderms sind somit weitere Signale erforderlich, die die Identität der einzelnen Muskeln definieren. In den Domänen mit hoher Twist-Expression wird durch das Zusammenspiel der Faktoren Wg und Dpp in der Anlage des somatischen Mesoderms das proneurale Gen *lethal of scute* (*l'sc*) aktiviert, das für einen „basic helix-loop helix“ (bHLH) Transkriptionsfaktor kodiert (Carmena et al., 1995, 1998). Durch die Aktivierung des Ras-Signalwegs über Heart-

less (Htl) und dem *Drosophila* epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (DER) (Buff et al., 1998; Frasch, 1999) wird die Expression von *L'sc* auf eine definierte Zellgruppe beschränkt (Abb. 1.2, Schritt 1) (Rusconi und Corbin, 1998, Brennan et al., 1999). Aus dieser Zellgruppe wird durch den Prozess der Notch- und Delta-vermittelten lateralen Inhibition eine Zelle selektiert, auf die sich die *L'sc* Expression konzentriert und sie so zu einer Muskelvorläuferzelle determiniert (Abb. 1.2, Schritt 2), während die Expression in den restlichen Zellen rückläufig ist (Carmena et al., 1995, Baylies et al., 1998). Dieser Prozess ist vergleichbar mit der Spezifikation der Neuroblasten im zentralen Nervensystem.

Nach ihrer Determinierung teilt sich die Vorläuferzelle asymmetrisch in zwei Muskelgründerzellen, die die individuelle Identität eines jeden Muskels festlegen, oder in eine Muskelgründerzelle und eine Vorläuferzelle für die adulten Muskeln (AP) (Abb. 1.2, Schritt 3) (Ruiz-Gomez und Bate, 1997). Bei der asymmetrischen Zellteilung findet eine ungleichmäßige Verteilung von bestimmten Faktoren auf die Tochterzellen statt. Für diesen Prozess ist zum einen eine Zellpolarität verantwortlich, die durch ungleiche Verteilung von zellulären Faktoren entsteht, und zum anderen eine spezifisch ausgerichtete Teilungsachse, die für die Verteilung dieser Faktoren sorgt. Eine Schlüsselrolle spielen hierbei die Proteine *Inscuteable* und *Numb* (Abb. 1.2). *Inscuteable*, ein Zytoskelett-Adapterprotein mit SH3-Bindestelle, ist für die Orientierung des Spindelapparates und damit für die Verteilung des Membran-assoziierten Proteins *Numb* verantwortlich, das sich nach der Zellteilung in nur einer der beiden Tochterzellen befindet (Baylies et al., 1998; Schnorrer und Dickson, 2004). In der entsprechenden Tochterzelle interagiert *Numb* über ein Phosphotyrosin-Bindemotiv mit Notch und blockiert so die Notch-Signalkaskade. Diese Inhibition führt dazu, dass die Transkription bestimmter Gene blockiert ist. Im Gegensatz dazu werden diese Gene in der zweiten Tochterzelle transkribiert, da dort *Numb* fehlt und so die Notch-Signalkaskade nicht unterbrochen ist (Paululat et al., 1999; Schnorrer und Dickson, 2004). Auf diese Weise wird in den Muskelgründerzellen eine charakteristische Kombination von spezifischen Transkriptionsfaktoren, den sogenannten „Muskelidentitätsgenen“ eingeschaltet. Zu diesen Identitätsgenen zählen zum Beispiel *krüppel*, *slouch (S59)*, *apterous*, *ladybird*, *vestigial*, *muscle-specific homeobox (msh)*, *nautilus*, oder *even-skipped* (Beckett und Baylies, 2006). Bestätigt wurde diese sogenannte „Muskelgründerzell-Hypothese“ durch Mutantanalysen. In den Mutanten von *numb* und *inscuteable* findet keine asymmetrische Zellteilung der Muskelvorläuferzellen statt. Dies führt dazu, dass beide Tochterzellen die gleichen Muskelidentitätsgene exprimieren, wodurch zwei identische Muskeln entstehen (Ruiz-Gomez und Bate, 1997).

Die umliegenden Mesodermzellen, die keine Spezifikation zur Muskelgründerzelle erfahren haben, bilden die Zellpopulation der sogenannten fusionskompetenten Myoblasten (FCMs). Fusionskompetente Myoblasten sind naive Zellen, die bei der Spezifizierung der

Muskeln keine Rolle spielen. Zu Beginn der Myoblastenfusion fusionieren ein bis drei fusionskompetente Myoblasten mit einer Muskelgründerzelle. Bei diesem Prozess überträgt die Muskelgründerzelle ihre Identität an die fusionierenden Zellen und es entsteht eine synzytiale Muskelvorläuferzelle. Diese Muskelvorläuferzelle ist die erste Stufe bei der Entstehung des reifen Muskels und ihre Position spiegelt seine endgültige Lage und Identität wieder (Abb. 1.2, Schritt 4). Durch weitere Fusionen mit umliegenden fusionskompetenten Myoblasten entstehen elongierte Myotuben, die an ihre Ansatzstellen in der Epidermis oder untereinander inserieren, und somit den ausdifferenzierten synzytialen Muskel repräsentieren (Bate, 1990; Beckett und Baylies, 2006).

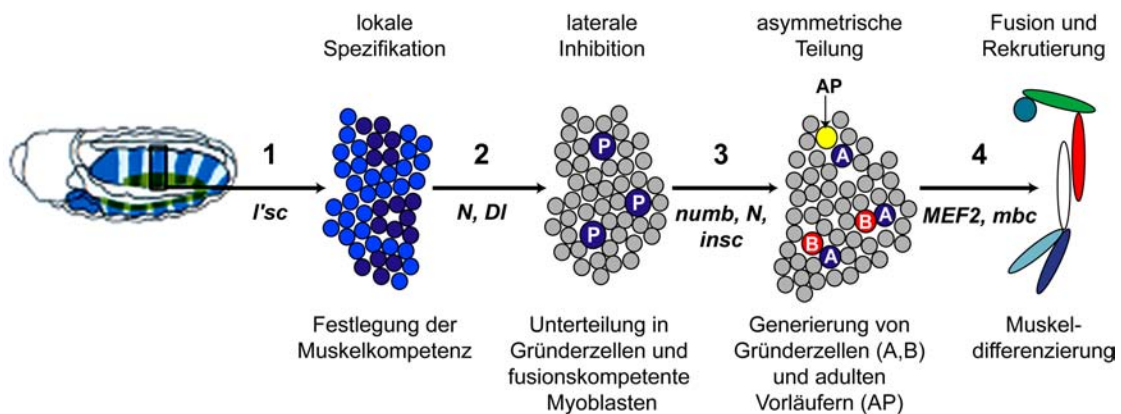


Abb. 1.2: Die verschiedenen Schritte zur Bildung der somatischen Muskulatur von *Drosophila melanogaster*. Das Schema eines Embryos im Stadium 10 zeigt die Regionen hoher Twist-Expression (blau), aus denen die somatische Muskulatur hervorgeht. (1) Durch die Expression des proneuralen Gens *lethal of scute* (*l'sc*) erhalten einzelne mesodermale Zellen (dunkelblau) die Fähigkeit sich zu Muskelgründerzellen zu entwickeln. (2) Die N/DI-vermittelte laterale Inhibition spezifiziert aus dieser Zellpopulation einzelne Zellen zu Muskelvorläuferzellen (P). (3) Aus diesen entstehen durch asymmetrische Zellteilung, vermittelt durch *numb* und *inscuteable*, entweder zwei Muskelgründerzellen (A, B), oder eine Muskelgründerzelle und eine adulte Vorläuferzelle (AP). Die restlichen Zellen differenzieren sich zu fusionskompetenten Myoblasten (grau). (4) Jede Muskelgründerzelle ist durch ein bestimmtes Set an Transkriptionsfaktoren gekennzeichnet, dass die Identität eines jeden Muskels festlegt, der durch Fusion von fusionskompetenten Myoblasten mit der Muskelgründerzelle hervorgeht. **N** = Notch; **DI** = Delta; **MEF2** = myocyte enhancing factor 2; **mbc** = myoblast city (modifiziert nach Baylies et al., 1998).

1.1.3 Die zellulären Aspekte der Myoblastenfusion

Nach Determinierung der Muskelidentitäten leiten die Muskelgründerzellen den Fusionsprozess ein, indem sie fusionskompetente Myoblasten anziehen und mit ihnen fusionieren, bis sie ihre definierte Muskelgröße (4 bis 25 Kerne) erreicht haben. Dabei verläuft der Fusionsprozess in zwei Schritten. Im ersten Schritt fusionieren die Muskelgründerzellen mit den sie umgebenden fusionskompetenten Myoblasten, wobei mehrkernige Muskelvorläuferzellen entstehen. Diese Muskelvorläuferzellen reifen dann in einem zweiten Schritt, bei dem weitere fusionskompetente Myoblasten mit der Vorläuferzelle fusionieren, zu

den fertigen Muskeln heran (Rau et al., 2001; Abmayr et al., 2003). Diesen zweistufigen Fusionsprozess findet man auch bei der Myogenese von Vertebraten, wie anhand von Zellkulturexperimenten an Mauszellen gezeigt werden konnte (Horsley und Pavlath, 2004).

Voraussetzung für die Fusion zwischen Muskelgründerzelle und fusionskompetenten Myoblasten ist die Erkennung der beiden Zelltypen untereinander. Dieser erste Schritt wird durch Proteine der Immunglobulin-Superfamilie vermittelt (Abb. 1.3). Hierzu zählen: Dumbfounded (Ruiz-Gomez et al., 2000), Roughest (Strünklenberg et al., 2001), Sticks and Stones (Bour et al., 2000) und Hibris (Artero et al., 2001). Alle diese genannten Transmembranproteine weisen eine ähnliche Domänenstruktur auf. Sie besitzen lange extrazelluläre Domänen, die aus einer Reihe von Ig-Domänen bestehen, sowie kürzere intrazelluläre Domänen, die für das Signalling benötigt werden (siehe 1.3.1).

Essentiell für die Adhäsion zwischen den Muskelgründerzellen und den fusionskompetenten Myoblasten sind die Faktoren Dumbfounded (Duf) auf Seiten der Muskelgründerzelle, und Sticks and Stones (Sns) auf Seiten der fusionskompetenten Myoblasten (Abb. 1.3). Interaktionsanalysen an *Drosophila* Schneider-Zellen haben gezeigt, dass Sns der Ligand von Duf ist, und so wahrscheinlich den ersten Kontakt zwischen Muskelgründerzelle und fusionskompetentem Myoblasten vermittelt (Abb. 1.3). Des Weiteren konnte eine Interaktion zwischen Sns und Roughest (Rst) gezeigt werden, die die vermutete Redundanz zwischen Duf und Rst bestätigt (Galletta et al., 2004). Ein weiteres Protein aus der Immunglobulin-Superfamilie ist Hibris (Hbs). Hbs wird ausschließlich in den fusionskompetenten Myoblasten exprimiert (Abb. 1.3). Genetische Studien deuten darauf hin, dass Hbs einen antagonistischen Effekt auf Sns ausübt, und so als Regulator der Myoblastenfusion agiert (Artero et al., 2001).

Nach diesen ersten Schritten der Zell-Zellerkennung und Zelladhäsion zwischen Muskelgründerzelle und fusionskompetenten Myoblasten müssen in beiden Zelltypen weitere komplexe Vorgänge ablaufen, die die Neuordnung des Zytoskeletts beinhalten, bis die Fusion endgültig abgeschlossen ist. Einige Faktoren, die an diesen komplexen Vorgängen beteiligt sind, konnten in den letzten Jahren identifiziert, und speziell zwei Signalwegen zugeordnet werden: dem Ants-Mbc-Rac-Signalweg und dem Loner-Arf6-Signalweg (Abb. 1.3).

Bei dem Ants-Mbc-Rac-Signalweg bindet Antisocial (Ants, auch bekannt als Rolling pepples), das nur von den Muskelgründerzellen exprimiert wird (Chen und Olson, 2004; Menon und Chia, 2001), an die intrazelluläre Domäne von Duf und wird so zu den Fusionsstellen in einem Duf-abhängigen Mechanismus rekrutiert (Abb. 1.3). Neben Duf ist Ants auch in der Lage an das zytoskelettassoziierte Protein Myoblast city (Mbc) zu binden (Chen und Olson, 2004). Mbc wird sowohl von Muskelgründerzellen als auch von fusionskompetenten Myoblasten gebildet und weist Homologien zu dem humanen DOCK180-Protein auf (Abb. 1.3) (Erickson et al., 1997). DOCK180 ist Teil des Guanin-

nukleotidaustauschfaktors (GEF) für Rac während der Phagozytose (Brugnera et al., 2002). In *Drosophila* gibt es zwei Rac-Homologe, Drac1 und Drac2. Sie werden von beiden Zelltypen exprimiert und spielen eine entscheidende Rolle bei der Fusion (Luo et al., 1994; Hakeda-Suzuki et al., 2002). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in *mbc*-Mutanten die Fusion komplett blockiert ist. Dies deutet darauf hin, dass Mbc für die ersten Fusions Schritte essentiell ist.

Der zweite, wichtige Signalweg bei den Zellfusionsprozessen ist der Loner-Arf6-Signalweg. Loner ist ein GEF, der den Guaninnukleotidaustausch der kleinen GTPase Arf6 reguliert, die wiederum regulatorisch auf Rac wirkt (Chen et al., 2003). Ähnlich wie Ants wird Loner zu den künftigen Fusionsstellen in einem Duf-abhängigen Muster rekrutiert (Abb. 1.3). Da die Lokalisation von Loner und Ants jedoch unabhängig voneinander ist, wird angenommen, dass die beiden Proteine in parallelen Signalwegen fungieren (Chen et al., 2003).

Weitere wichtige Faktoren für die Muskeldifferenzierung und Fusion sind *DMef2*, *Lame duck* und *Blow*. Der Transkriptionsfaktor *DMef2* wird in allen somatischen Mesodermzellen exprimiert (Muskelgründerzellen und fusionskompetenten Myoblasten) und reguliert die Expression der oben genannten Faktoren.

Spezifisch in den fusionskompetenten Myoblasten wird *Lame duck*/*Gleefull*/*Myoblast incompetent* (*Lmd*/*Glee*/*Minc*) exprimiert, ein Transkriptionsfaktor, der die Differenzierung der fusionskompetenten Myoblasten beeinflusst (Furlong et al., 2001; Ruiz-Gomez et al., 2002).

Das Gen *blown fuse* (*blow*) wurde bei einem Screen für Muskelfusionsdefekte identifiziert (Doberstein et al., 1997). *Blow* wird in den Muskelgründerzellen und den fusionskompetenten Myoblasten gebildet und ist zytoplasmatisch lokalisiert. Über die Funktion von *Blow* ist wenig bekannt. Erste Untersuchungen deuten darauf hin, dass es an der Umgestaltung des Zytoskeletts während des Fusionsprozesses beteiligt ist (Schröter et al., 2004).

Zwei weitere Faktoren, die ebenfalls bei der Reorganisation des Zytoskeletts beteiligt sind und in beiden Zelltypen vorkommen, sind D-Titin und Paramyosin (Beckett und Baylies, 2006). Abbildung 1.3 gibt schematisch die bei dem Prozess der Myoblastenfusion beteiligten Signalwege und Faktoren in der Muskelgründerzelle und den fusionskompetenten Myoblasten wieder.

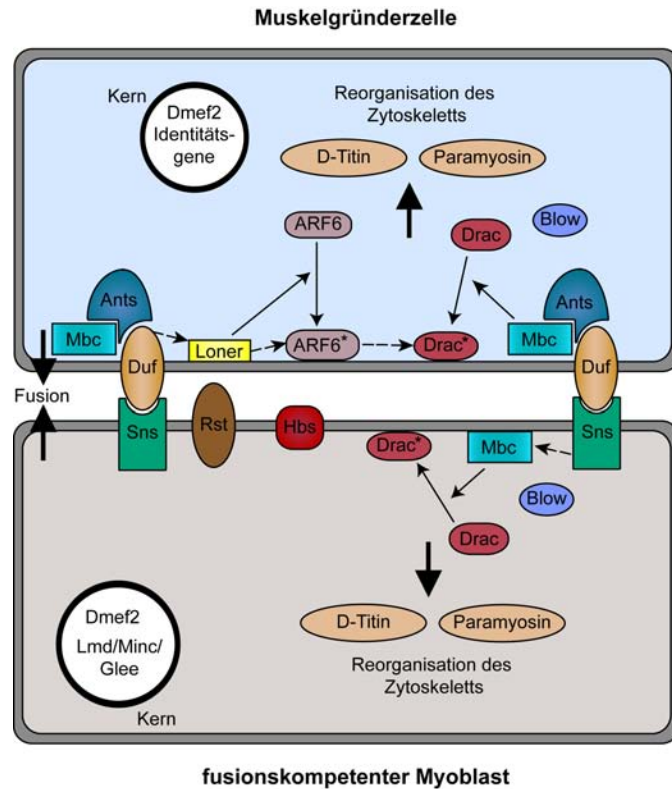


Abb. 1.3: Modell der Myoblastenfusion in *Drosophila melanogaster*. Die Spezifität der Muskelgründerzelle (**hellblau**) wird durch die Identitätsgene im Kern festgelegt. Die fusionskompetenten Myoblasten (**grau**) werden durch den Transkriptionsfaktor Lmd/Minc/Glee spezifiziert. Dmef2 wird sowohl für die Spezifizierung der Gründerzelle als auch der fusionskompetenten Myoblasten benötigt. Die Ig-Domänenproteine Duf (Rst) und Sns vermitteln die Zellerkennung. In den Muskelgründerzellen werden dadurch zwei Signalwege parallel aktiviert: der Ants-Mbc-Rac-Signalweg und der Loner-Arf6-Signalweg. Bei dem ersten Signalweg interagiert das zytoplasmatische Protein Ants mit Duf und rekrutiert Mbc, einen GEF. Mbc aktiviert die kleine GTPase Drac (aktivierte Form durch * gekennzeichnet). Bei dem zweiten Signalweg rekrutiert Duf Loner, ein GEF, an die Fusionsstelle. Loner aktiviert die kleine GTPase Arf6 (aktivierte Form durch * gekennzeichnet), die wiederum für die korrekte subzelluläre Lokalisation von Drac verantwortlich ist. Drac ist für die Reorganisation des Zytoskeletts bei dem Fusionsprozess verantwortlich, und aktiviert daher wahrscheinlich Paramyosin und D-Titin. In den fusionskompetenten Myoblasten konnte bis jetzt nur der Ants-Mbc-Signalweg nachgewiesen werden. Blow (Blown fuse) ist ein weiteres zytoplasmatisches Protein, dass in beiden Zelltypen vorkommt und wahrscheinlich an der Neuordnung des Zytoskeletts beteiligt ist (modifiziert nach Chen und Olson, 2004).

Nachdem die Muskeln durch Fusion ihre endgültige Größe und Lage erreicht haben, müssen sie eine Verbindung mit dem Ektoderm herstellen, damit sie ihre Kontraktionsbewegungen auf das chitinöse Exoskelett übertragen können.

1.2 Die Ausbildung der epidermalen Muskelanhaftungsstelle

Die Struktur an der die Muskeln mit dem chitinösen Exoskelett von *Drosophila* verbunden sind, wird epidermale Muskelanhaftungsstelle („muscle attachment site“) genannt.

1.2 Die Ausbildung der epidermalen Muskelanhaftungsstelle

Sie besteht aus einer epidermalen Zelle, der Tendonzelle, und den an ihr anhaftenden Muskeln (Abb. 1.4). Die Differenzierung der Tendonzelle ist ein biphasischer Vorgang, der sich in eine initiale muskelunabhängige Phase und eine muskelabhängige Phase unterteilt (Becker et al., 1997). Der Beginn der Determinierung der Tendonzellvorläufer wird durch Gene vermittelt, die das gesamte embryonale Ektoderm strukturieren, wie zum Beispiel *patched*, *wingless*, *naked* und *lines* (Volk und VijayRaghavan, 1994). Die Tendonzellvorläufer sind durch die Expression des frühen Wachstumsfaktor-ähnlichen (EGR) Transkriptionsfaktors *Stripe* charakterisiert (Abb. 1.4). *Stripe* besteht aus einer dreifachen C-terminalen Zinkfingerdomäne und weist Homologien zu dem EGR1 und EGR2 in Vertebraten auf (Frommer et al., 1996). *Stripe* ist ein Schlüsselgen bei der Tendonzelldifferenzierung. In *stripe* Mutanten ist die Expression der meisten tendonspezifischen Gene, wie *alien*, *delilah*, *held out wigs (how)* und *short stop (shot)*, reduziert. Des Weiteren weisen diese Embryonen deutliche Defekte in der Wanderungsrichtung der Muskeln zu ihren epidermalen Anhaftungsstellen auf (Frommer et al., 1996). Daher wird allgemein angenommen, dass die Tendonzellvorläufer, gekennzeichnet durch die *Stripe*-Expression, die Muskelausdehnung, Wanderungsrichtung und den Stopp der weiteren Filopodienausbildung vermitteln, sobald die Muskeln ihre Zielzelle erreicht haben.

Interessanterweise können eine Reihe von Erkenntnissen, die über die Wanderungsrichtung auswachsender Neurone während der Neurogenese gewonnen wurden, auf die Myogenese von *Drosophila* übertragen werden. Die entsprechenden Faktoren verhalten sich spezifisch für einzelne Muskeln oder Muskelgruppen und werden in den jeweiligen Muskeln exprimiert.

Ein solcher, für beide Prozesse gleichsam wichtiger Faktor ist *Slit*, der Ligand des Robo-Rezeptors. Mit Hilfe von *slit*-Mutanten konnte gezeigt werden, dass *Slit* sowohl in der frühen als auch späten Phase der Muskelmigration involviert ist. In der frühen Phase besitzt *Slit* eine abweisende Funktion, mit der es die ventralen Muskeln davon abhält über die ventrale Mittellinie zu migrieren (Kidd et al., 1999). Ab Stadium 13 findet man die Expression von *Slit* ausschließlich in den Tendonzellvorläufern an den Segmentgrenzen, so dass *Slit* in der späten Phase der Muskelmigration ein Signal aussendet, dass den Myotuben den Weg zu ihrer Anhaftungsstelle leitet (Volk, 1999).

Ein weiterer Faktor, der an der Wanderungsrichtung der Muskeln beteiligt ist und auch eine Funktion bei der Neurogenese erfüllt, ist die atypische Rezeptor-Tyrosin-Kinase *Derailed (Drl)*. Sie weist neben der Expression im zentralen Nervensystem auch eine Expression in der Epidermis und den lateralen Transversalmuskeln (LT1-3) auf. In *drl*-Mutanten finden die Muskeln häufig nicht ihren Insertionsort und wachsen zu weit nach ventral aus. Wie *Drl* diesen Prozess der Muskelmigration steuert ist nicht bekannt. Erkenntnisse von Rescue-Experimenten zeigen, dass *Drl*, genauso wie in den Neuronen, ein abstoßendes Signal aussendet, wobei der *Drl*-Ligand die Bereiche definiert, in die die

Muskeln nicht migrieren sollen (Callahan et al., 1996).

Weitere Komponenten der Extrazellulären Matrix, die auch bei der Neurogenese involviert sind und in den Tendonzellen exprimiert werden, wie M-Spondin, Laminin und Masquerade, könnten an dem Prozess der Muskelmigration zu ihren Anhaftungsstellen in der Epidermis beteiligt sein.

Das exakte Zusammenfinden von einem spezifischen Muskel mit seiner Anhaftungsstelle wird durch positive, muskelabhängige Signale vermittelt. Hierbei ist die Aufrechterhaltung der Expression tendon-spezifischer Gene essentiell. Sobald der differenzierte Muskel seine entsprechende Tendonzelle fast erreicht hat, leitet diese die muskelabhängige Differenzierung ein. Dieser Prozess wird durch den Neuregulin-ähnlichen EGFR-Liganden Vein initiiert (Abb. 1.4). Vein ist der einzige aktivierende Ligand des *Drosophila* EGF-Rezeptors, der in einer sekretierten Form produziert wird, und zusätzlich zur EGF-Domäne eine Immunglobulin (Ig-) ähnliche Domäne besitzt (Schnepp et al., 1996). In Abwesenheit von Vein oder des Rezeptors ist die Differenzierung der Tendonzelle unvollständig, und spezifische Gene, die für die Differenzierung der Tendonzelle charakteristisch sind, fehlen, auch wenn eine physikalische Interaktion zwischen Muskel und Tendonzelle besteht (Yarnitzky et al., 1997). Nachdem der Ligand Vein an der Muskel-Tendon-Junction akkumuliert und an den von der Tendonzelle exprimierten EGF-Rezeptor gebunden hat, findet in der Tendonzelle die endgültige Differenzierung statt. Diese wird wesentlich durch den Transkriptionsfaktor Stripe bestimmt, dessen Expression durch den EGF-Signalweg aktiviert und aufrecht erhalten wird. Stripe wiederum ist für die Aktivierung und Expression von den charakteristischen tendonzellspezifischen Genen, wie *delilah*, *alien*, *how*, *short stop* und *$\beta 1$ -tubulin*, verantwortlich (Abb. 1.4) (Schnorrer und Dickson, 2004).

Das tendonzellspezifische Gen *how* spielt bei der endgültigen Tendonzelldifferenzierung eine wichtige Rolle. *How* wird sowohl von dem Mesoderm als auch den Tendonzellvorläufern gebildet. Es kodiert für zwei mRNA-bindende Proteine, einer langen, nukleären Form How(L) und einer kurzen nukleären und zytoplasmatischen Form How(S). Die frühen Tendonzellvorläufer exprimieren How(L), das an die *stripe* mRNA bindet und ihre Degradation einleitet, wodurch nur wenig Stripe-Protein in den Tendonzellvorläufern vorhanden ist. Sobald aber mit Hilfe von Vein der EGFR-Signalweg in diesen Zellen angeschaltet wird, wird die Bildung von How(S) in den entsprechenden Zellen gefördert. How(S) unterbindet die Bindung von How(L) an die *stripe* mRNA, wodurch diese in den Tendonzellvorläufern stabilisiert wird. Durch den hohen Stripe-Proteingehalt in den Tendonzellvorläufern beginnen diese nun mit der endgültigen Differenzierung zur Tendonzelle (Abb. 1.4) (Nabel-Rosen et al., 1999). Die umliegenden Tendonzellvorläufer verlieren bei diesem Prozess die Fähigkeit zur Differenzierung in eine Tendonzelle, vermutlich durch eine Unterdrückung der Stripe Expression, da in den späten Stadien der

1.2 Die Ausbildung der epidermalen Muskelanhaftungsstelle

Embryogenese die Expression von Stripe nur noch in differenzierten Tendonzellen zu finden ist (Vorbrüggen und Jäckle, 1997).

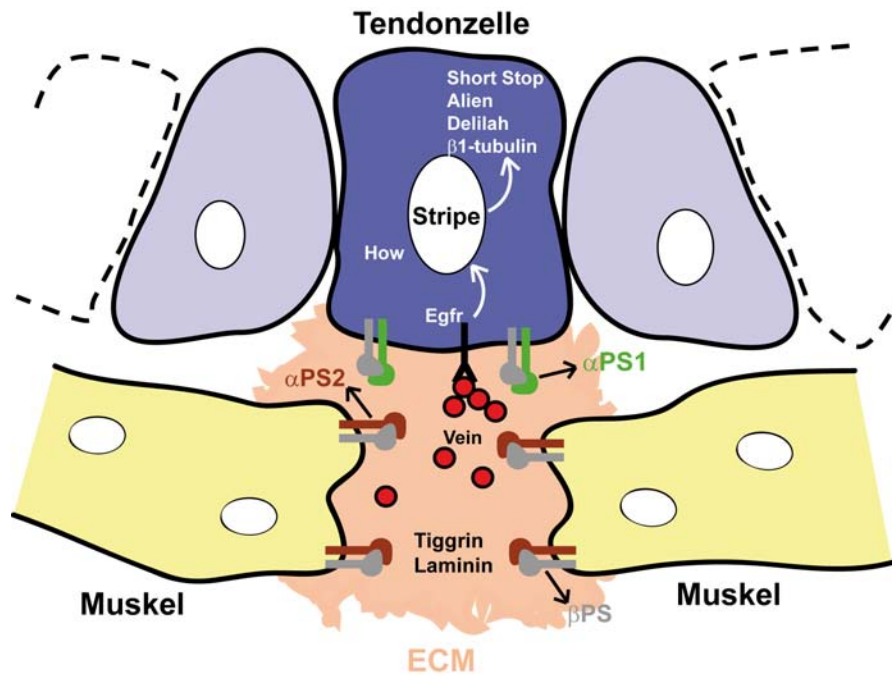


Abb. 1.4: Struktur der epidermalen Muskelanhaftungsstelle in *Drosophila melanogaster*. Durch die Sezernierung des EGFR-Liganden Vein, der an den von der epidermalen Tendonzellvorläuferzelle gebildeten EGF-Rezeptor bindet, wird in dieser Zelle der EGFR-Signalweg angeschaltet. Dieser führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Stripe, der wiederum für die Expression der tendonzellspezifischen Gene wie *short stop*, *alien*, *delilah* und *beta1-tubulin* verantwortlich ist. Die Adhäsion zwischen Muskel und ausdifferenzierter Tendonzelle wird durch Integrinheterodimere vermittelt. Dabei exprimieren die Muskeln ein alphaPS2-betaPS-Heterodimer, während auf Seiten der Tendonzelle ein Heterodimer aus alphaPS1- und betaPS-Untereinheit gebildet wird.

Für die endgültige und dauerhafte Anheftung der Muskeln an die Tendonzelle werden Zelladhäsionsmoleküle benötigt. Die Zelladhäsion wird in diesem Fall durch positionsspezifische Integrine (PS-Integrine) vermittelt (Abb. 1.4). An diesem Prozess sind zwei unterschiedliche PS-Integrine beteiligt, die sich als Heterodimere aus einer alpha- und einer beta-Untereinheit zusammensetzen. Die von den beiden Zelltypen gebildeten Heterodimere unterscheiden sich nur in ihrer alpha-Untereinheit, die beta-Untereinheit ist in beiden Zelltypen identisch. So exprimieren die Muskelzellen ein Integrinheterodimer, das aus alphaPS2- und betaPS-Integrin besteht, während sich das von der Tendonzelle aus einer alphaPS1- und einer betaPS-Untereinheit zusammensetzt (Abb. 1.4). An den Muskelenden sind die terminalen Z-Scheiben über Aktin-bindende Proteine, wie zum Beispiel alpha-Aktinin, mit den Integrinheterodimeren verbunden. Die Verankerung mit der Extrazellulären Matrix erfolgt über die Liganden Tiggrin oder Laminin, die ebenfalls eine Verbindung mit den Integrinheterodimeren der Tendonzelle eingehen (Abb. 1.4). Die Verbindung der Integrinheterodimere

in den Tendonzellen wird durch das zytoskelettassoziierte Protein Short Stop vermittelt (Brown et al., 2000). Damit die Muskelkraft optimal auf das Exoskelett von *Drosophila* übertragen werden kann, ist die Verbindung über die PS-Integrine zur Extrazellulären Matrix und dem Zytoskelett der Muskel- und Tendonzelle essentiell.

Diese Verbindung zwischen Extrazellulärer Matrix und Zytoskelett stellt einen speziellen Mechanismus der Zelladhäsion dar. Im Folgenden werden die verschiedenen Zelladhäsionsmechanismen und daran beteiligten Proteinfamilien näher erläutert.

1.3 Die Zelladhäsion

Als Zelladhäsion bezeichnet man den über Zelladhäsionsmoleküle vermittelten Kontakt von einer Zelle zu ihrer Nachbarzelle (Zell-Zell-Adhäsion) oder zu Bestandteilen der Extrazellulären Matrix (Zell-Matrix-Adhäsion).

Die verschiedenen Mechanismen der Zelladhäsion sind sowohl für die Erzeugung und Aufrechterhaltung von Gewebestrukturen wie die Anhaftung der Muskeln an die Epidermis, als auch für die Regulation von einer Vielzahl von Gewebefunktionen essentiell. Somit kommt der Zelladhäsion eine zentrale Rolle bei Prozessen wie Proliferation, Differenzierung, Migration und Aggregation zu (Abb. 1.5). Im adulten Organismus sind Veränderungen in der Zelladhäsion für zahlreiche physiologische Vorgänge wie die Lymphozytenwanderung und Wundheilung, aber auch bei pathologischen Prozessen wie Tumorentstehung und -wachstum, sowie Metastasierung verantwortlich (Ruoslati und Öbrink, 1996).

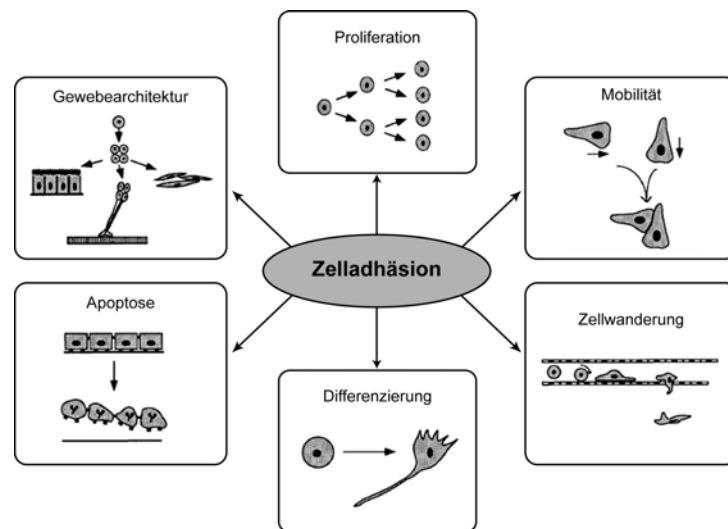


Abb. 1.5: Die Rolle der Zelladhäsion bei multizellulären Prozessen. Die Zelladhäsion ist für die grundlegenden Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Zellwanderung, Mobilität, Apoptose und die Organisation innerhalb eines Gewebes verantwortlich (modifiziert nach Ruoslati und Öbrink, 1996).

Da Zelladhäsionsmoleküle nicht nur als mechanisch-dynamische Kontaktelemente wirken, sondern auch Signale aus der Umgebung aufnehmen und ins Zellinnere weiterleiten können, bezeichnet man sie auch als Adhäsionsrezeptoren. Diese Signale beeinflussen verschiedene zentrale Vorgänge in der Zelle, wie Genexpression, Zellzyklus und Apoptose (Abb. 1.5) (Aplin et al., 1998).

Während die Zell-Matrix-Adhäsion eine wichtige Rolle bei der Migration von Zellen spielt, sind die Zell-Zell-Adhäsionen essentiell bei der Aggregation von bestimmten Zelltypen, sowie der Ablösung von Zellen aus einem Zellverband (Segregation und Dispersion). Für den korrekten Ablauf der morphogenetischen Vorgänge ist die räumliche und zeitliche Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle entscheidend.

1.3.1 Die verschiedenen Zelladhäsionsmoleküle

In den meisten vielzelligen Organismen wirken zwei Gruppen von Zelladhäsionsmolekülen; eine davon ist Ca^{2+} -abhängig, die andere nicht, wobei insbesondere die Ca^{2+} -abhängigen Moleküle für die gewebespezifischen Zell-Zell-Adhäsionen verantwortlich sind. Die Adhäsionsmoleküle beider Klassen wurden ursprünglich mit Hilfe von Antikörpern entdeckt, die gegen Zelloberflächenmoleküle gerichtet waren und so die Zell-Zell-Adhäsion *in vitro* verhinderten (Alberts et al., 1995).

Die Zelladhäsionsmoleküle sind meist transmembranäre Glykoproteine, die zytoplasmatische Domänen unterschiedlichster Länge aufweisen. Einige dieser Moleküle oder bestimmte Isoformen besitzen keine zytoplasmatische Domäne, sondern sind über einen Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI) - Rest in der Membran verankert. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten lassen sich die Zelladhäsionsmoleküle in vier Großfamilien einteilen: die Cadherine, die Selektine, die Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) und die Integrine (Aplin et al., 1998).

Die Cadherine

Cadherine sind die wichtigsten Adhäsionsmoleküle die für die Aufrechterhaltung von Gewebestrukturen verantwortlich sind. Die meisten Cadherine sind Singlepass-Transmembran-Glykoproteine, die in Abhängigkeit von Ca^{2+} homophile Adhäsion zwischen Zellen vermitteln. Die Cadherine werden in die Unterfamilien der klassischen Cadherine, der Proto-Cadherine und der atypischen Cadherine aufgeteilt. Zu den klassischen Cadherinen gehören etwa 15 Mitglieder, die nach ihrem Vorkommen in bestimmten Geweben benannt sind: E-Cadherine (epithelial), N-Cadherine (neuronal) und P-Cadherine (plazental) (Takeichi, 1995). Cadherine findet man in spezialisierten Zellkontaktbereichen, den Zonula adherens, wo sie über ihre zytoplasmatische Domäne mit intrazellulären Proteinen in Wechselwirkung stehen und so eine Verbindung zu dem Aktinzytoskelett herstellen (Abb. 1.6). Zu diesen intrazellulären Proteinen, auch Adapterproteine genannt,

zählen insbesondere die α - und β -Catenine. Neben der Adapterfunktion ist β -Catenin auch an der Signaltransduktion und Musterbildung beteiligt. Diese Signalweiterleitung erfolgt über den wingless/WNT-Signalweg und lässt darauf schließen, dass β -Catenin für die Verbindung von physischer Adhäsion und Signaltransduktion während der Morphogenese verantwortlich ist (Gumbiner, 1996). Neben den Zonula adherens findet man die Cadherine auch in Desmosomen, wo sie intrazellulär über das γ -Catenin (auch Plakoglobin genannt) mit den Intermediärfilamenten verbunden sind (Koch und Franke, 1994).

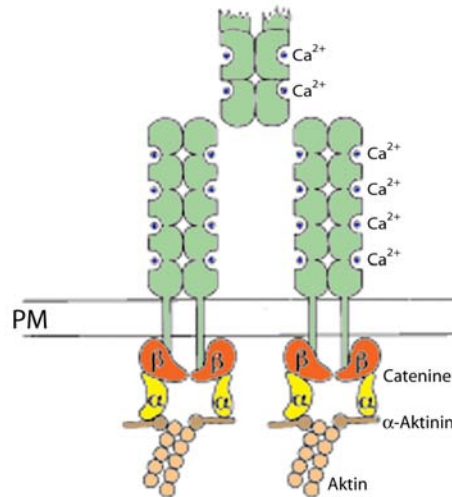


Abb. 1.6: Der klassische Cadherin-Catenin-Komplex. Die extrazelluläre Domäne besteht aus fünf extrazellulären Cadherin-Domänen (grün) die Calcium binden (blau). Intrazellulär ist der Rezeptor mit dem α - (gelb) und β - (rot) Catenin verbunden, das wiederum mit α -Aktinin (braun) interagiert und damit die Verbindung zum Aktinzytoskelett herstellt (hellbraun). (modifiziert nach Aplin et al., 1998).

Die Selektine

Die Familie der Selektine besteht aus den drei Mitgliedern L-, E- und P-Selektin. L-Selektin wurde erstmals auf Leukozyten, E-Selektin auf Endothelzellen und P-Selektin auf Thrombozyten („platelets“) nachgewiesen (Rosen und Bertozzi, 1994; Springer, 1994; Lasky, 1995). Die Selektine enthalten eine stark konservierte N-terminale Typ-C-Lektin-domäne, über die sie Ca^{2+} -abhängig eine spezielle Tetrasaccharidstruktur, die sogenannte Sialyl-Lewis^x-Struktur, binden und so heterophile Zell-Zell-Adhäsion vermitteln (Abb. 1.7). Diese durch Selektine vermittelte heterophile Adhäsion spielt insbesondere bei Entzündungsreaktionen eine entscheidende Rolle. So vermitteln die Selektine den ersten Kontakt zwischen dem Endothel und zirkulierenden Leukozyten und Thrombozyten. Diese Interaktion führt zu dem sogenannten Rollen der Leukozyten entlang des Endothels zu den Entzündungsherden, wo dann durch weitere Mechanismen die feste Adhäsion

und schließlich Extravasation der Leukozyten stimuliert wird (Aplin et al., 1998). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch die Selektine mit dem Zytoskelett in Kontakt stehen. So ist zum Beispiel das L-Selektin an der Spitze der Mikrovilli über α -Aktinin mit dem Aktinzytoskelett verknüpft (Abb. 1.7) (Pavalko et al., 1995).

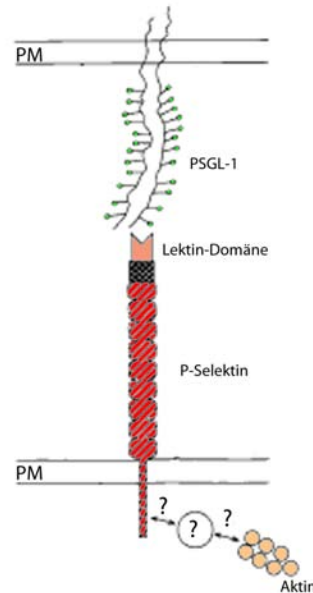


Abb. 1.7: Der Selektin-Adhäsionskomplex. Die Lektin-Domäne (hellrot) bindet an das Oligosaccharid (PSGL-1) und baut so eine heterophile Adhäsionsverbindung zwischen den beiden Molekülen auf. Intrazellulär sind die Selektine über α -Aktinin mit dem Aktinzytoskelett (hellbraun) verbunden. Wie die Interaktion vermittelt wird ist unklar (dargestellt durch Fragezeichen). (modifiziert nach Aplin et al., 1998).

Die Immunglobulin-Superfamilie

Die Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) stellen die größte Gruppe strukturverwandter Proteine dar und kommen sowohl in Vertebraten als auch Invertebraten vor. Die Proteine dieser Familie sind durch eine oder mehrere Immunglobulinartige Domänen (Ig) gekennzeichnet, die aus 55 bis 75 Aminosäuren bestehen und zwei antiparallele β -Faltblätter bilden, welche über eine Disulfidbrücke verbunden sind (Abb. 1.8) (Vaughn und Bjorkman, 1996). Die Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie haben unterschiedlichste Funktionen. So stellt eine Untergruppe die Zelladhäsionsmoleküle der IgSF dar. Dies sind meist stark glykosylierte Transmembranproteine, die eine Ca^{2+} -unabhängige Zelladhäsion vermitteln. Neben den Transmembranproteinen mit zytoplasmatischer Domäne existieren auch Proteine, die über einen GPI-Anker an die Membran gebunden sind. Durch das Vorhandensein eines intrazellulären Teils ist die Verbindung des Proteins mit dem Zytoskelett der Zelle möglich. Darüber hinaus kann das Protein auch an Signaltransduktionen beteiligt sein (Aplin et al., 1998). Wie die Immunglobuline

selbst, weisen viele Mitglieder der IgSF Erkennungs-, Adhäsions-, und Rezeptorfunktionen auf. Zu dieser Gruppe zählen unter anderem Proteine des Immunsystems wie der B-Zell-Rezeptor, der T-Zell-Rezeptor, seine Korezeptoren CD4 und CD8, sowie die MHC-Moleküle der Klasse I und II (Edelman, 1987). Ebenso sind Mitglieder der IgSF in Prozesse des Nervensystems involviert, zum Beispiel bei der Wegfindung der Axone. Hier sind insbesondere das Zelladhäsionsmolekül N-CAM, das Nr-CAM, sowie Neurofascin und LI zu nennen (Crossin und Krushel, 2000).

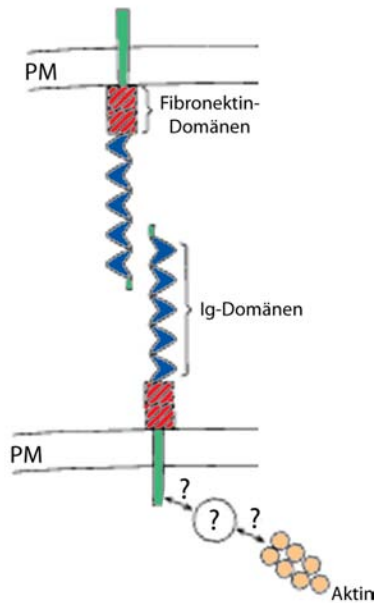


Abb. 1.8: Die Molekülstruktur der Immunglobulin-Superfamilie. Charakteristisches Strukturmerkmal sind die Immunglobulin (Ig)-Domänen (**blau**), auf die eine oder mehrere Fibronektin-Domänen (**rot**) folgen. Intrazellulär sind die Rezeptoren, genauso wie die Selektine, über α -Aktinin mit dem Aktinzytoskelett (**hellbraun**) verbunden. Unklar ist, wie die Interaktion vermittelt wird (dargestellt durch **Fragezeichen**). (modifiziert nach Aplin et al., 1998).

Die Integrine

Eine phylogenetisch sehr alte und bei den Metazoa weit verbreitete Klasse von Zelladhäsionsmolekülen sind die Integrine. Integrine sind Glykoproteine die als Zell-Matrix-Adhäsionsmoleküle oder als heterophile Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle agieren. Sie liegen als transmembranäre Heterodimere in der Zelle vor, und bestehen aus einer α - und einer β -Untereinheit (Abb. 1.9). Bis heute sind bei den Vertebraten 24 verschiedene Heterodimere beschrieben, die sich aus 18 α -Untereinheiten und 8 β -Untereinheiten zusammensetzen. Bei den Invertebraten wie *Drosophila* oder *C. elegans* sind dagegen nur 5 α -Untereinheiten und 3 β -Untereinheiten, beziehungsweise 2 α -Untereinheiten und eine β -Untereinheit bekannt (Takada et al., 2007). Beide Untereinheiten weisen eine relativ

große extrazelluläre Domäne und, mit Ausnahme der $\beta 4$ -Untereinheit bei den Vertebraten, eine kurze zytoplasmatische Domäne auf (Abb. 1.9). Die extrazelluläre Domäne von beiden Untereinheiten ist für die Spezifität der Ligandenbindung verantwortlich. Die Liganden bestehen primär aus extrazellulären Matrixproteinen, aber auch aus Transmembranproteinen wie zum Beispiel des Immunglobulins I-CAM (Hynes, 2002).

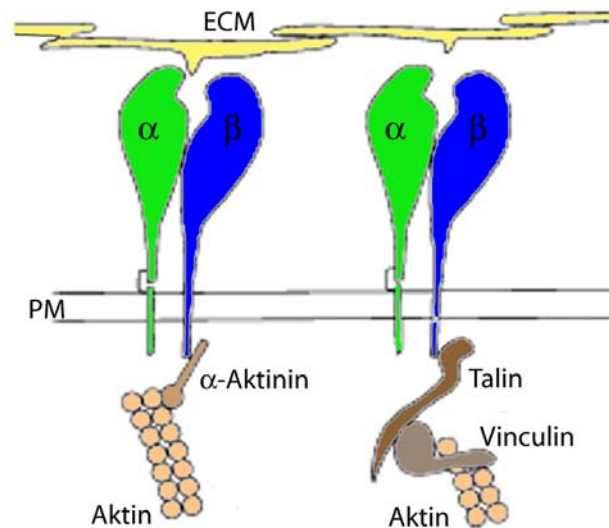


Abb. 1.9: Die Integrin-Heterodimere. Die verschiedenen Integrinheterodimere setzen sich aus einer α -(**grün**) und einer β -Untereinheit (**blau**) zusammen, die extrazellulär mit der Extrazellulären Matrix (**gelb**) und deren Liganden verbunden sind. Intrazellulär gehen die kurzen zytoplasmatischen Domänen Interaktionen mit verschiedenen Proteinen (**braun**) ein und sind so mit dem Aktinzytoskelett (**hellbraun**) verknüpft. **PM** = Plasmamembran; **ECM** = Extrazelluläre Matrix (modifiziert nach Aplin et al., 1998).

Integrine sind an vielen entwicklungs- und zellbiologischen Prozessen beteiligt, wie Adhäsion, Proliferation, Apoptose, Polarität, Migration, Genexpression und Differenzierung (Gumbiner, 1996; Brown et al., 2000). Für die Ausführung dieser Prozesse ist die durch Integrine vermittelte Verbindung zwischen Extrazellulärer Matrix und Zytoskelett essentiell. Hierbei können die Integrine die benötigten Signale auf zwei Wegen weiterleiten, von der Extrazellulären Matrix in das Zytoplasma der Zelle („outside-in“ signaling), oder umgekehrt („inside-out“ signaling). Bei dem „outside-in“ signaling bindet ein extrazellulärer Ligand an das Integrinheterodimer auf der Zelloberfläche. Dies führt zu Konformationsänderungen und somit zur Aktivierung der Integrine. Speziell die zytoplasmatische Domäne erfährt bei diesem Weg, je nach Ligandenbindung, Konformationsänderungen, die dazu führen, dass verschiedenste zytoplasmatisch lokalisierte Proteine mit dem intrazellulären Teil der β -Untereinheit interagieren und somit zur Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts oder Aktivierung eines Signalwegs beitragen (Hynes, 2002). Im Vergleich dazu werden die Integrinheterodimere bei dem „inside-out“ signaling durch zytoplasma-

tische Proteine aktiviert. Eine Schlüsselrolle spielt hierbei Talin (siehe 1.4.1). Durch die Bindung eines bestimmten Sets von zytoplasmatischen Proteinen an den intrazellulären Teil der Integrine erfahren die extrazellulären Domänen eine Konformationsänderung und gehen in den aktivierten Zustand über, in dem sie nun extrazelluläre Liganden binden können (Liddington und Ginsberg, 2002). Dies kann wiederum zu einem Clustering von Integrinheterodimeren und somit zu einer Verstärkung der Zelladhäsion innerhalb eines Fokalkontaktes führen (Bökel und Brown, 2002; Takada et al., 2007). Die oben genannten Mechanismen zeigen, dass nicht nur die extrazellulären Liganden der Integrine eine entscheidende Rolle bei der Weiterleitung von Signalen und Zelladhäsion spielen, sondern auch die zytoplasmatischen, integrinassoziierten Proteine. Viele der bekannten integrinassoziierten Proteine sind homolog in Vertebraten und Invertebraten, was darauf hindeutet, dass viele der nachgeschalteten Signalwege konserviert sind (Brown, 2000; Brown et al., 2000). In dem folgenden Kapitel werden einige dieser integrinassoziierten Proteine und ihre Funktion bei der Zelladhäsion und Signalübertragung vorgestellt.

1.4 Der integrinassoziierte Proteinkomplex

Integrine müssen eine Verbindung mit dem Zytoskelett herstellen, um ihre Funktion in der Signaltransduktion und Zelladhäsion erfüllen zu können. Hierzu gehen sie in der Regel eine Verbindung mit dem Aktinzytoskelett ein. Eine Ausnahme stellt das $\alpha 6 \beta 4$ Integrinheterodimer dar, das mit Intermediärfilamenten interagiert um Hemidesmosomen zu bilden (Litjens et al., 2006). Die Verbindung zwischen Integrinrezeptoren und Aktinzytoskelett ist sehr komplex, da weit über 50 verschiedene zytoskelettassoziierte Proteine daran beteiligt sind (Zamir und Geiger, 2001; Lo, 2006). Ein Großteil der Komplexität ist auf die unterschiedlichen zelltypspezifischen Interaktionen der Integrine zurückzuführen, wobei eine Reihe von den zytoplasmatischen Proteinen für die Funktion jedes integrinassoziierten Komplexes essentiell sind. Hierzu zählen zum Beispiel Talin, Integrin-linked kinase (ILK), PINCH, Paxillin, Tensin, Vinculin, Filamin und α -Aktinin (Abb. 1.10) (Bökel und Brown, 2002; Labouesse und Georges-Labouesse, 2003; Nayal et al., 2004; Wiesner et al., 2005). Die genannten Proteine binden an den zytoplasmatischen Teil von Integrinen und leiten so die Akkumulation von F-Aktin und die Ausbildung von Fokaladhäsionen ein. Neben der Ausbildung von Fokaladhäsionen fungiert ein Teil der Proteine, wie zum Beispiel Filamin oder ILK, als Adapterprotein für Signalproteine, die wiederum für die Veränderungen bei der Struktur des Zytoskeletts verantwortlich sind (Delon und Brown, 2007).

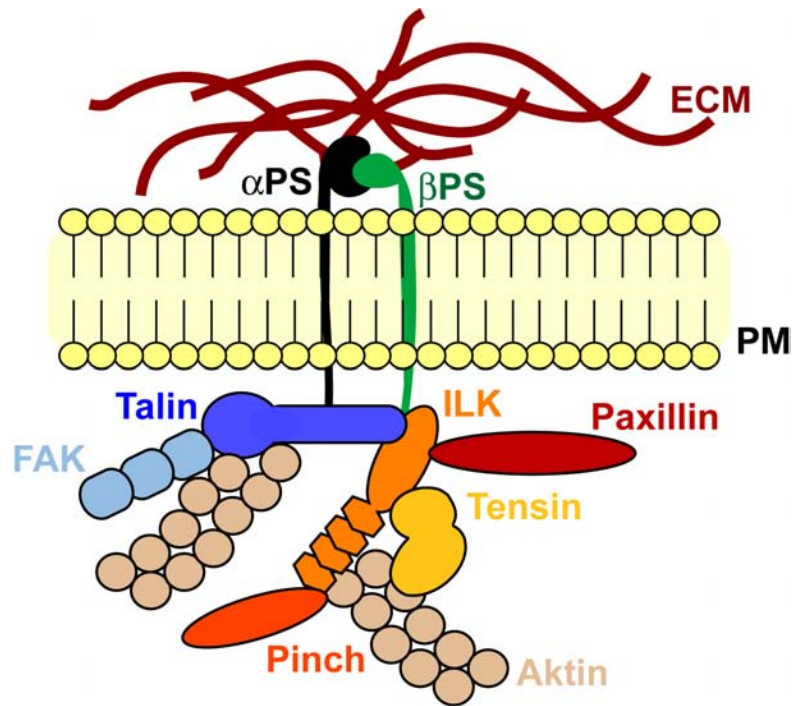


Abb. 1.10: Schematische Darstellung des integrin-assozierten Proteinkomplexes. Die Integrin-Heterodimere binden über ihre zytosolischen Domäne an die Proteine Talin und ILK, die wiederum eine Reihe von zytosolischen Adhäsionsproteinen wie FAK, Tensin, Paxillin und Pinch binden. Der so assoziierte Proteinkomplex tritt mit dem Aktinzytoskelett in Wechselwirkung.

Die Funktion der integrinassozierten Proteine Talin, ILK und Tensin ist im Hinblick auf Zelladhäsion speziell in *Drosophila* sehr gut untersucht worden. Daher werden sie im Folgenden im Detail erläutert.

1.4.1 Talin

Talin ist das erste identifizierte Protein, das an den zytosolischen Teil der Integrine bindet (Horwitz et al., 1986). Es ist ungefähr 2500 Aminosäuren groß und besitzt eine kleine N-terminale Kopfdomäne (50 kDa) und eine große C-terminale Schwanzdomäne (200 kDa) (Abb. 1.11), die durch eine Calpain-Schnittstelle proteolytisch gespalten werden können (Brown et al., 2002). Die globuläre Kopfdomäne weist sämtliche Strukturmerkmale einer FERM-Domäne (Band 4.1, Ezrin, Radixin und Moesin) auf, die an NPxY-Motive bindet. Diese Motive finden sich in den meisten zytosolischen Teilen von Integrinen. Durch NMR-Analysen konnte nachgewiesen werden, dass Talin *in vitro* mit seiner FERM-Domäne an diese Motive bindet (Garcia-Alvarez et al., 2003). Des Weiteren besitzt die Kopfdomäne Bindungsstellen für die Fokaladhäsionskinase (FAK), Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) und Phosphatidylinositol-4-Phosphat 5-Kinase Typ I γ (PIPKI γ) (Wiesner et al., 2005). Dagegen besteht die Schwanzdomäne aus mehreren Alanin-Wiederholungen und einer I/LWEQ-Domäne, die auch bei

Proteinen zu findet ist, die in Endozytosevorgänge involviert sind (Engqvist-Goldstein et al., 1999). Die Hauptaufgabe der C-terminalen Domäne ist die Interaktion mit weiteren zytoplasmatischen Proteinen sowie Aktin.

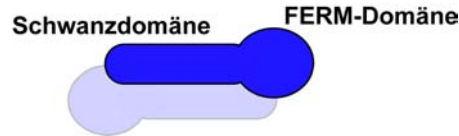


Abb. 1.11: Die Domänenstruktur von Talin. Talin bildet antiparallele Homodimere und besteht aus einer N-terminalen FERM-Domäne, die eine Bindestelle für das in Integrinen vorhandene NPxY-Motiv enthält. Die C-terminale Schwanzdomäne vermittelt hauptsächlich Interaktionen mit Aktin und weiteren zytoplasmatischen Proteinen, die am Aufbau von Fokalkontakten beteiligt sind.

Talin ist eines der ersten Proteine, die am Aufbau der Fokaladhäsionen beteiligt sind (Franco et al., 2004), indem es unter anderem die Aktivierung von Integrinen vermittelt. Durch die Bindung von Talin an Integrine bricht eine intrazelluläre Salzbrückenbindung zwischen der α - und β -Integrinuntereinheit auf, was wiederum zu einer Konformationsänderung der Integrine führt, die nun mit Liganden der Extrazellulären Matrix interagieren und so die Adhäsion oder das Signalling herstellen können (Garcia-Alvarez et al., 2003). Die durch Talin induzierte Konformationsänderung, sowie die Anwesenheit von Talin in dem sich bildenden Fokaladhäsionskontakt führen zu der Rekrutierung von weiteren Proteinen, wie zum Beispiel ILK, PINCH oder Tensin, die wiederum an der Aufrechterhaltung und stärkeren Ausbildung der Zelladhäsion mitwirken. Durch Untersuchungen an Talinmutanten von *Drosophila melanogaster* konnte die Funktion von Talin in den Fokaladhäsionen speziell in der Anhaftungsstelle zwischen Muskeln und Epidermis näher charakterisiert und bestätigt werden. Talin ist primär in epidermalen Muskelanhaftungsstellen in späten Embryonalstadien exprimiert (Brown et al., 2002). Die Analyse von Talinmutanten zeigte, dass nach Verlust von Talin die Adhäsion zwischen Muskeln und Epidermis nicht den Muskelkontraktionen standhält und sich die Muskeln von der Epidermis ablösen und abrunden. Dieser Phänotyp ist identisch mit dem von β PS-Integrinmutanten (Brown et al., 2002; Brown, 1994). In weiterführenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass Talin nicht für das Integrinsignalling benötigt wird, da in zygotischen Talinmutanten die integrinvermittelte Genexpression noch funktioniert. Des Weiteren stellte sich heraus, dass Integrine weiterhin an die Extrazelluläre Matrix binden, sich aber keine sogenannten Integrincluster bilden oder sie mit dem Zytoskelett und den weiteren integrinassoziierten Proteinen wie ILK oder Tensin in Verbindung stehen (Brown et al., 2002). Somit ist Talin für die Aktivierung der Integrine und Rekrutierung weiterer zytoplasmatischer Proteine, wie zum Beispiel ILK, essentiell.

1.4.2 Integrin-linked Kinase (ILK)

Die Integrin-linked Kinase (ILK) ist eine Serin/Threonin Kinase mit Adapterfunktion. Das 57 kDa Protein besteht aus vier N-terminalen Ankyrin-Wiederholungen, gefolgt von einer Linker-Sequenz, die Ähnlichkeiten mit PH-Domänen aufweist (Abb. 1.12) (Hehl-gans et al., 2007). Alle vier Ankyrin-Wiederholungen sind für die Bindung verschiedener Proteine essentiell. So binden zum Beispiel die Proteine PINCH1 und PINCH2 mit ihrer ersten der fünf LIM-Domänen an die erste Ankyrin-Wiederholung von ILK, aber nur, wenn die restlichen drei Ankyrin-Wiederholungen intakt sind (Tu et al., 1999; Zhang et al., 2002). Die C-terminale Kinasedomäne von ILK (Abb. 1.12) vermittelt die Interaktionen mit einer Vielzahl von zytoplasmatischen Proteinen, wie Paxillin, Parvin, Tensin und α -Aktinin (Wiesner et al., 2005), die wiederum die Verbindung mit dem Aktinzytoskelett herstellen. Interessanterweise besitzt die Kinasedomäne keine für alle Modellsysteme nachweisbare Kinaseaktivität, was mittels Rescue-Experimenten, bei der die Kinasefunktion von ILK ausgeschaltet war, gezeigt werden konnte (Zervas et al., 2001). Dies deutet darauf hin, dass ILK hauptsächlich eine Adapterfunktion erfüllt. So ist zum Beispiel der Aufbau des ILK-PINCH-Parvin Komplexes für die Lokalisation in Fokaladhäsionen essentiell. Interessanterweise stabilisiert die Interaktion zwischen ILK und PINCH sowie ILK und Parvin diese Proteine und schützt sie vor der proteasom-vermittelten Degradation (Legate et al., 2006). Durch die Identifikation von Nck2 als Interaktionspartner von PINCH ist eine Verbindung zwischen Integrin- und Wachstumsfaktorvermittelter Signaltransduktion gezeigt. Nck2 erkennt Wachstumsfaktoren wie EGFR und PDGF mittels seiner C-terminalen SH2-Domäne. Die Bindung von Nck2 an PINCH erfolgt durch die LIM4-Domäne von PINCH und die SH3-Domäne von Nck2 (Tu et al., 1998; Velyvis et al., 2003).

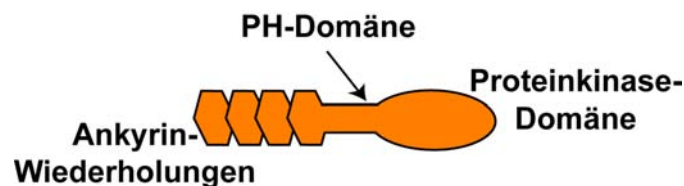


Abb. 1.12: Die Domänenstruktur von ILK. N-terminal besitzt die ILK vier Ankyrinwiederholungen die für die Bindung verschiedener Proteine essentiell sind. Gefolgt werden diese Sequenzen von einer Linkersequenz, die Ähnlichkeiten zu PH-Domänen hat. C-terminal besteht die ILK aus einer Proteinkinasedomäne, die mit verschiedenen Proteinen interagiert (vgl. Abb. 1.10).

Die Funktion von ILK bei der integrin-vermittelten Zelladhäsion wurde mit Hilfe von Mutantenganalysen in Vertebraten und Invertebraten näher analysiert. ILK-knock-out Mäuse sind am Tag E5.5 - 6.5 letal. Die Letalität ist auf Defekte in der Polarisierung des Epiblasten und Kavitation, die mit abnormaler F-Aktin Akkumulation assoziiert sind, zurückzuführen (Legate et al., 2006; Sakai et al., 2003). Ebenso sind ILK-Mutationen

in *Drosophila melanogaster* und *C. elegans* embryonal letal und weisen integrinähnliche Defekte auf, wie zum Beispiel Ablösung der Muskeln von der Epidermis (Zervas et al., 2001; Mackinnon et al., 2002). Im Gegensatz zu Vertebraten konnte für die ILK von *Drosophila* keine direkte Interaktion mit β -Integrin nachgewiesen werden. Im Gegenteil, ILK ist in β -Integrinmutanten weiterhin normal an den Muskelanhaftungsstellen lokalisiert. Dagegen ist die Verbindung zwischen Aktinzytoskelett und Integrinrezeptoren defekt. Dies deutet darauf hin, dass ILK für die Rekrutierung des Aktinzytoskeletts an die Integrinrezeptoren verantwortlich ist, aber ein weiterer Faktor für die Interaktion zwischen ILK und Integrin benötigt wird (Zervas et al., 2001).

1.4.3 Tensin

Tensin ist ein 220 kDa F-Aktin Bindungsprotein, das in Fokaladhäsionen in einem integrinabhängigen Muster lokalisiert ist. Es weist Eigenschaften eines Multidomänenproteins auf und ist in der Lage an verschiedenste Struktur- und Signalmoleküle zu binden. Diese Interaktionen erfolgen über die drei Domänen von Tensin, wie die N-terminale Phosphatase-verwandte Domäne, die Src-Homologiedomäne (SH2), sowie die C-terminale Phosphotyrosin-Bindedomäne (PTB) (Abb. 1.13). Der N-Terminus ist in der Lage an Aktin zu binden, während die SH2-Domäne die Bindung von Tensin an tyrosinphosphorylierte Proteine wie zum Beispiel die PI3-Kinase, p130Cas und die Fokaladhäsionskinase (FAK) vermittelt, und so wahrscheinlich zur Reorganisation des Aktinzytoskeletts beiträgt (Auger et al., 1996). Die C-terminale PTB-Domäne interagiert nicht mit tyrosinphosphorylierten Proteinen, hat aber das Potential mit den zytoplasmatischen Domänen der β -Integrine zu interagieren, da diese das PTB-Bindungsmotiv NPxY besitzen (Lo, 2004).



Abb. 1.13: Schema der Domänenstruktur von Tensin. N-terminal besitzt Tensin eine SH2-Domäne, die unter anderem mit Aktin interagiert. C-terminal besteht Tensin aus einer PTB-Domäne, die mit verschiedenen Proteinen und den zytoplasmatischen Domänen der Integrine mittels eines NPxY-Erkennungsmotivs interagiert.

Mit Hilfe von Mutationsanalysen konnte die Funktion von Tensin im Hinblick auf die Etablierung und Aufrechterhaltung von Fokaladhäsionskontakten charakterisiert werden. Die Untersuchungen wurden an Mausmodellen, Zelllinien und *Drosophila melanogaster* durchgeführt. Die Tensinmutanten der Maus sind vital und weisen Regenerationsdefekte bei Verletzungen der Skelettmuskelfibrillen auf, was darauf hindeutet, dass Tensin an der

Regeneration dieser Muskeln beteiligt ist. Darüber hinaus konnte durch Fibroblastenanalysen nachgewiesen werden, dass tensindefiziente Zellen langsamer migrieren (Chen et al., 2002). Studien an Tensinmutanten von *Drosophila melanogaster*, die im Gegensatz zu den Säugern, die 3 Tensingene besitzen, nur ein Tensin aufweisen, zeigen, dass diese Mutanten ebenfalls vital sind und keine Defekte in der Rekrutierung von weiteren integrinassozierten Proteinen wie Talin oder ILK in die Fokaladhäsionen aufweisen (Torgler et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass Tensin für die Stabilisierung der Adhäsion im Flügel benötigt wird, so dass dieser der normalen mechanischen Abrasion nach der Verpuppung standhält und keine Blasenbildung aufweist. Dies unterscheidet sich von den Adhäsionsdefekten im Flügel von *integrin-*, *talin-* oder *ilk-*Mutanten, die schon während des Puppenstadiums ausgebildet werden (Brown et al., 1994; Brown et al., 2002; Zervas et al., 2001). Anhand der Mutantenanalysen konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Rekrutierung von Tensin in die Fokaladhäsionen von Talin und ILK abhängt. Dies deutet darauf hin, dass Tensin die Funktion des Adhäsionskomplexes modifiziert, und nicht an der initialen Rekrutierung der einzelnen Komponenten beteiligt ist. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass Tensin erst spät in dem integrinassozierten Komplex zu finden ist (Torgler et al., 2004; Lee et al., 2003).

1.5 Ziel der Arbeit

Ein Hefe-zwei-Hybrid Screen mit dem Gap Junction bildenden Protein Innexin3 von *Drosophila melanogaster* führte zur Identifikation des bis dahin unbekanntes Genlokus CG1624 (Löer, 2003). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der molekularen und funktionalen Charakterisierung dieses Genlokus, der im Rahmen dieser Studien aufgrund seines Phänotyps *wech* genannt wurde. Um Erkenntnisse über die *in vivo* Funktion von *wech* zu erhalten, wurden mittels P-Element vermittelter Mutagenese Mutanten erzeugt. Nach einer ersten Charakterisierung der mRNA Expression dieser Fliegenlinien, die bestätigte, dass die Transkriptionseinheit des *wech*-Gens betroffen ist, wurde eine Mutante zur molekularen und funktionalen Charakterisierung ausgewählt. Diese Mutante zeichnet sich durch die Insertion von 11 bp in der 5'UTR aus, die in Homozygotie embryonale Letalität verursacht. Die erzeugte *wech* Mutante bot eine gute Möglichkeit die Funktion von Wech im Hinblick auf die Morphologie von epithelialen Geweben und damit verbundenen Signalwegen näher zu charakterisieren.

Neben der funktionalen Analyse des neu identifizierten *wech* Genlokus sollte die Funktion von Innexin3 auf epidermaler Ebene untersucht, und eine mögliche Abhängigkeit der beiden Interaktionspartner im Hinblick auf morphologische Defekte gezeigt werden.

Kapitel 2

Material

2.1 Allgemeine Materialien

2.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, sind alle Verbrauchsmaterialien von der Qualität *pro analysi* und wurden von folgenden Firmen bezogen: Faust, La Roche, Merck, Promega, Roth, Sigma, Invitrogen, Biorad, Macherey und Nagel, Stratagene.

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Allgemeiner Laborbedarf	Faust (Meckenheim); Schütt (Göttingen)
1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
PCR-Reaktionsgefäße, dickwandig	Eppendorf (Hamburg)
Plastikwaren	Greiner (Solingen)
Röntgenfilme	Fuji MedicalX-Ray Film Super RX

2.1.3 Geräte

Autoklav	H+P Varioklav Dampfsterilisator EP-2 mit Mikroprozessorsteuerung
Bakterienbrutschrank	Memmert, Model 400
Bionokular	Olympus S2X 12 / Olympus S2 40
Blotapparatur	Biometra Whatman Fastlot B43
Drehrad	Snjiders test-tube-rotator
Elektropipette	accu-jet; Brand
Elektroporationsgerät	Bio-Rad <i>E.coli</i> Pulser
Entwickleranlage	Curix 60, AGFA
Gelelektrophoreseapparaturen	BioRad

Gel-Dokumentation	Biozym, Alpha Digi Doc
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Axiovert M200 mit ApoTome
Hefebrutschrank	Binder
Konfokales Laserscanning- Mikroskop	Leica TCS SP2
Lichtmikroskop	Olympus Ax 70 Kameraaufsatz: Olympus U-TVO.5xC-2/ Color View Soft Imaging System
Mikrowelle	Panasonic
PCR-Maschine	MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler
Photometer	BioRad SmartSpec Plus
Spannungsquelle	Bio-Rad Power Pac 3000
Sterilschrank	Memmert, Model 800
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer comfort
Ultraschallgerät	Bandelin SONOPLUS HD2070
Vortexer	Vortex Genie2
Waagen	Sartorius BL 150 S; Sartorius B211 D
Wasserbad	GFL 1002-1013
Zentrifugen	Biofuge Pico, Heraeus Eppendorf Zentrifuge 5415R; Hettich Zentrifuge Rotina 46R

2.2 Standards und Kits

Amersham Bioscience	Immunoprecipitation Starter Pack Glutathione Sepharose 4B Immunoprecipitation Starter Pack Protein Sepharose A/G	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen Immünpräzipitation
BioRad	Precision Plus Protein Standard	Größenstandard für SDS-Gele
Boehringer/Roche	DNA Molecular Weight Marker X PCR Nucleotide Mix	Größenstandard für Agarosegele

Macherey & Nagel	Nucleospin Plasmid Mini Kit	Aufreinigung von Plasmid-DNS
	Nucleospin Plasmid Midi Kit	Aufreinigung von Plasmid-DNS
	NucleoSpin Extract2	Extraktion und Aufreinigung von DNS
	NucleoSpin RNA2	Extraktion und Aufreinigung von RNA
Qiagen	QuantiTect Reverse Transcription Kit	cDNA-Synthese

2.3 Puffer und Lösungen

Wenn nicht anders erwähnt, werden alle Puffer und Lösungen mit doppelt deionisiertem und autoklaviertem Wasser (*Aqua bidest*) angesetzt. Bei Lösungen, die nicht bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden, ist die Lagertemperatur in Klammern angegeben. Alle Prozentangaben beziehen sich auf Masse pro Volumen.

Agarose	1% Agarose in 1x TAE
Aqua bidest.	2x destilliertes Wasser, autoklaviert
Ampicillin-Lösung (-20 °C)	50 mg/ml Ampicillin in A. bidest.
AP-Puffer	100 mM NaCl; 50 mM MgCl ₂ ; 10 mM Tris, pH 9,5; 0,1% Tween 20; A.bidest.
APS (-20 °C)	10 mg/ml APS in A. bidest.
Carbonat Puffer (-20 °C)	120 mM Na ₂ CO ₃ ; 80 mM NaHCO ₃ , pH 10
Coomassie Blau	0,1% Coomassie R-250; 50% TCA
Coomassie Gel-Entfärbelösung	10% Essigsäure; 30% Methanol; 60% VE-H ₂ O
DNA Ladepuffer	15% Bromphenolblau; 25% Ficoll; 5% SDS; 50 mM Tris-HCL (pH 7,5); 50 mM EDTA (pH 8,0); 40% (w/v) Saccharose in H ₂ O
dNTP-Mix (25 mM)	je 0.25 Vol 100 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
EDTA	0,5 M EDTA, pH 8,0
Entfärbungslösung	10% Essigsäure; 30% Methanol in A. bidest.
Ethidiumbromid (4 °C, lichtgeschützt)	10 mg/ml Ethidiumbromid in A. bidest.

Kapitel 2 Material

Glycerol (10%)	100 ml Glycerol; 900 ml A. bidest.; autoklavieren
GST-Bindepuffer	20 mM Hepes; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 4 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT; 0,06% NP ₄₀ ; 10% Glycerin; Proteaseinhibitor
GST-Lysispuffer	1x PBS; 0,5% Tween; 0,2 mg/ml Lysozym; Proteaseinhibitor
Heringssperma-DNA (-20 °C)	10 mg/ml Heringssperma-DNA; 100 mM NaCl; phenolisiert, sonifiziert, denaturiert
Hoyer's Einbettmedium	30 g Gummi arabicum auf 50 ml A. bidest.; 160 g Chlorhydrat; 16 ml Glycerin
Hype-Puffer	50% deionisiertes Formamid; 5x SSC; 50 µg/ml Heparin; 100 µg/ml Heringssperma-DNA; 10 µg/ml tRNA; 0,1% Tween 20
Hype mit Dextransulfat	150 ml Ultrapure Formamid; 60 ml 20xSSC; 7,5 ml 10 mg/ml tRNA; 7,5 ml 10 mg/ml ssDNA; 3 ml 20% Tween20; 30 ml Dextransulfat; ad 270 ml A. bidest.
Hype ohne Dextransulfat	150 ml Ultrapure Formamid; 60 ml 20xSSC; 7,5 ml 10 mg/ml tRNA; 7,5 ml 10 mg/ml ssDNA; 3 ml 20% Tween20; ad 270 ml A. bidest.
IPTG (-20 °C)	1 M Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid Stammlösung in A. bidest.
LiSORB	100 mM LiOAc; 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA; 1 M Sorbitol; ad 1 l A. bidest.; pH 8,0 einstellen, autoklavieren
Lithiumacetat (10x)	51 g Lithiumacetat (1M) ad 500 ml mit A. bidest auffüllen; 20 min autoklavieren
Lithiumchlorid (-20 °C)	4 M Lithiumchlorid in A. bidest.
Lysozymlösung	10 mg/ml Lysozym in A. bidest.
Methanol-EGTA	95% Methanol; 25 mM EGTA
Natrium-Acetat	3 M Na-Acetat in A. bidest; pH 6,0
Nipagin-Lösung	147 ml Ethanol, 63 ml A. bidest, 21 g Nipagin
Paraformaldehyd (4%)	4%ige Stammlösung in PBS

2.3 Puffer und Lösungen

PBS (20-fach konzentriert)	2,6 M NaCl; 140 mM Na ₂ HPO ₄ ; 60 mM NaH ₂ PO ₄ ; pH 7,0; autoklavieren
PBS (1-fach konzentriert)	130 mM NaCl; 7 mM Na ₂ HPO ₄ ; 3 mM NaH ₂ PO ₄ ; pH 7,0 einstellen; autoklavieren
PBT	1x PBS; 0,1% Tween 20
PBTN	2 ml PBT; 100 µl Ziegen Serum
PEG-3350 (50%)	250 g PEG-3350 in 500 ml A.bidest; autoklavieren
PEG/LiOAc-Lösung	10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA (pH 8,0); 100 mM LiOAc (pH 7,5); 40% (w/v) PEG-3350;
Plasmid-Rettungslösung	2% Triton X-100; 1% SDS; 100 mM NaCl; 100 mM Tris (pH 8,0); 1 mM EDTA; A.bidest.
Proteinase K Stammlösung	20 mg/ml Proteinase K
Proteinase-Inhibitor (7x)	1 Tablette Complete Mini (Roche) wird in 1,5 ml A.bidest. gelöst ; Lagerung bei -20 °C
RF 1 (4 °C)	100 mM RbCl ₂ ; 50 mM MnCl ₂ ; 30 mM KOAc; 10 mM CaCl ₂ ; 15% v/v Glycerin; eingestellt auf pH 5,8
RF 2 (4 °C)	10 mM Mops, pH 7,0; 10 mM RbCl ₂ ; CaCl ₂ ; 15% v/v Glycerin
RIPA (-20 °C)	150 mM NaCl; 1% IPEGAL CA-630; 0,5% Sodium Deoxycholate (DOC); 0,1% SDS; 50 mM Tris (pH 8,0); 1 mM PMSF
Sammelgelpuffer	1 M Tris-HCl (pH 6,8)
Sammelgelpuffer Stammlösung (4%)	6 ml 40% Acrylamid/Bisacrylamid; 7,2 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8); 45,56 ml A.bidest.
SDS	10% SDS in VE-H ₂ O
SDS Elektrophorese Laufpuffer (1x)	25 mM Tris; 192 mM Glyzerin; 0,1% SDS
SDS-Gelladepuffer (5x)	500 mM Tris-HCl (pH 6,8); 15% SDS; 50% Glyzerin; 0,5% Bromphenolblau; 10% β-Mercaptoethanol
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat (pH 8,0); 1 mM EDTA
TBS (10x)	0,5 M Tris-HCl (pH 7,6); 9% NaCl; ad 1 l A.bidest.

TBST-Lösung	0,01 M Tris-HCl (pH 7,5); 0,15 M NaCl; 0,05% Tween 20
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA
Telt-Puffer (-20 °C)	50 mM Tris (pH 7,5); 62,5 mM EDTA; 2,5 M LiCl; 0,4% Triton X-100; A. bidest.
Transferpuffer Stammlösung (10x)	25 mM Tris-HCl; 150 mM Glycin
Transferpuffer (1x)	100 ml 10x Transferpuffer Stammlösung; 200 ml Methanol, 700 ml A.bidest.
Trenngelpuffer	1 M Tris-HCl (pH 8,0)
Trenngelpuffer Stammlösung (10%)	40 ml 40% Acrylamid/Bisacrylamid; 60 ml 1M Tris-HCl (pH 8,8); 60 ml A.bidest.
Triton-NaCl	0,05% Triton X-100; 0,15 M NaCl
tRNA (-20 °C)	10 mg/ml Stammlösung gelöster tRNA Phenol/Chloroform aufreinigen und in A.bidest lösen.
Waschpuffer (Berkeley)	250 ml Ultrapure Formamid; 50 ml 20xSSC; 2,5 ml 20% Tween 20; ad 500 ml A.bidest.

2.4 Enzyme und Puffer

Die verwendeten Enzyme und Puffer wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Biosciences	Complete, Protease-Inhibitor-Tabletten
Boehringer, Roche	Alkalische Shrimp-Phosphatase (SAP)
	DNase
	10x Dephosphorylierungspuffer
	T4-DNA Ligase
	10x Ligationspuffer
	Restriktionsendonukleasen
	RNase
Fermentas	Restriktionsendonukleasen
	<i>Taq</i> -Polymerase
Promega	<i>Pfu</i> -Polymerase
Qiagen	Long Range PCR Polymerase

2.5 Antikörper

Die Antikörper, die für die Fluoreszenzfärbungen und den Western-Blot verwendet wurden, wurden von folgenden Firmen bezogen und in den angegebenen Konzentrationen eingesetzt.

Primäre Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Herkunft	Konzentration
α PS2 Integrin	Ratte	N. Brown	1:5
Armadillo	Maus	DSHB	1:10
β -Galaktosidase	Maus	Promega	1:500
β PS Integrin	Maus	DSHB	1:10
β 3-Tubulin	Kaninchen	R. Renkawitz-Pohl	1:5000
BP12	Maus	DSHB	1:10
DE-Cadherin	Ziege	Santa Cruz	1:50
Coracle	Meerschwein	R.G. Fehon	1:1000
Engrailed	Maus	DSHB	1:10
Fasciclin III	Maus	DSHB	1:10
Flag	Maus	Sigma	1:200 und 1:2000 (WB)
GFP	Maus	Santa Cruz	1:50 und 1:2000(WB)
His	Maus	Invitrogen	1:50 (WB)
Innexin3-CS	Kaninchen	Dauids	1:100 und 1:400 (WB)
Innexin3-CT	Meerschweinchen	Dauids	1:20 und 1:300 (WB)
Kakapo	Meerschweinchen	N. Brown	1:1000
Myosin Heavy Chain	Kaninchen	D. Kiehart	1:500
Myc	Maus	Santa Cruz	1:100 und 1:500 (WB)
Phosphotyrosin	Maus	Santa Cruz	1:10
α Spectrin	Maus	DSHB	1:10
Talin	Maus	N. Brown	1:50
Wech	Kaninchen	Dauids	1:20 und 1:300 (WB)
22C10	Maus	DSHB	1:10

Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Herkunft	Konzentration
HRP α -Kaninchen	Esel	Santa Cruz	1:15000 (WB)
HRP α -Maus	Esel	Santa Cruz	1:15000 (WB)
HRP α - Meerschweinchen	Esel	Santa Cruz	1:15000 (WB)
Cy3 α -Kaninchen	Esel	Dianova	1:200
Cy3 α -Maus	Esel	Dianova	1:200
Cy3 α -Ratte	Esel	Dianova	1:200
Cy3 α - Meerschweinchen	Esel	Dianova	1:200
Alexa488 α - Kaninchen	Esel	Dianova	1:200
Alexa488 α -Maus	Esel	Dianova	1:200
Alexa488 α -Ziege	Esel	Dianova	1:200
Alexa488 α -Ratte	Esel	Dianova	1:200
Alexa488 α - Meerschweinchen	Esel	Dianova	1:200
Alexa633 α - Kaninchen	Esel	Dianova	1:200
Alexa633 α -Maus	Esel	Dianova	1:200
Alexa633 α -Ziege	Esel	Dianova	1:200
Alexa633 α -Ratte	Esel	Dianova	1:200
Alexa633 α - Meerschweinchen	Esel	Dianova	1:200

2.6 mRNA *in-situ* Sonden

Sondenbezeichnung	Eingesetzte Menge
Innexin3	5 μ l
Innexin2	5 μ l
Wech	10 μ l
Black cells	5 μ l

2.7 Vektoren

Plasmidbezeichnung	Herkunft
pAc/V5-His B	Invitrogen, Karlsruhe
pADNS-RRS <i>mut</i>	AG Möröy
pBluescriptII	Stratagene, Heidelberg
pCRII-Topo	Invitrogen, Karlsruhe
pCS ⁺	Dave Turner, Ralph Rupp
pGEX-5X	Pharmacia/Amersham, Freiburg
pMJ-Green	AG Willecke, Bonn
pMT/V5-His B	Invitrogen, Karlsruhe
pMry	Stratagene, Heidelberg
pSOS	Stratagene, Heidelberg
pUAST	AG Hoch (R. Bauer)
pWiz	AG Carthew

2.8 Oligonukleotide

2.8.1 Klonierungsprimer

Die folgenden Oligonukleotide wurden für die ortsspezifische Mutagenese und die Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR verwendet.

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Anlagerungstemperatur
Wech <i>EcoRI</i> Start	CCG GAA TTC CGG CTT ATG ATG GAA CTT TTG TCA AAC AAT	69,4 °C
Wech <i>XbaI</i> Stop	TGC TCT AGA GCA TCA GAA TAC GTG CAC AAA CCG CTT GTA AGG	73,3 °C
Wech <i>ApaI</i> w/o Stop	CGG GCC CGG AAT ACG GTC ACA AAC CGC TT	76,1 °C
Wech <i>NotI</i> Stop	GCG GCC GCT TAG AAT ACG TGC ACA AAC CGC TT	76,3 °C
pWiz Wech for- ward	TCT AGA AGC ATC GCA ACA GTC CGC	66,9 °C
pWiz Wech re- vers	TCT AGA TAA CAC TGG AGA CGC TCG GC	69,4 °C
Wech RA F1	AGC GCA TGA ACG TGA GTT TTG	59,4 °C

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Anlagerungs- temperatur
Wech RA R1	GCG GTC CTA GGG TAT CCC AT	62,5 °C
Wech RC F1	GAG GAA CAG GCA ACG GCA C	61,6 °C
Wech RC R1	TTC ACT CTA CGC GTC GTA GG	63,1 °C
Wech-Ras-NHL <i>HindIII</i>	CCC AAG CTT GGG ATG CGG ACA	76,1 °C
Wech-Ras-NHL <i>SmaI</i>	TCC CCC GGG GGA GAA TAC GTG CAC AAA CCG CT	74,6 °C
Wech ZF-Myc for (<i>EcoRI</i>)	GGA ATT CAT GGA GCA GAA ACT CAT CTC TGA AGA GGA TCT GGA ACT TTT GTC AAA	75,9 °C
Wech ZF rev (<i>NotI</i>)	AAG CGG CCG CTT ACG AGC CCA CCA TAA AGC TTT	71,9 °C
Wech ZFM rev (<i>NotI</i>)	AAG CGG CCG CTT AGT CCG TCC TCG TGG CCC	76,3 °C
Wech MNHL- Myc for (<i>EcoRI</i>)	GGA ATT CAT GGA GCA GAA ACT CAT CTC TGA AGA GGA TCT GGT GGG CTC GAA GGA	79,1 °C
Wech NHL rev (<i>NotI</i>)	AAG CGG CCG CTT AGA ATA CGT GCA CAA ACC GCT	71,9 °C
Wech NHL-Myc for (<i>EcoRI</i>)	GGA ATT CAT GGA GCA GAA ACT CAT CTC TGA AGA GGA TCT GCG GAC AGG TGA GCC	79,7 °C
ILK-Ankyrin for (<i>EcoRI</i>)	CCG GAA TTC CGG CTT ATG GAG GAC ATA TTC CA	69,5 °C
ILK-Ankyrin Flag rev (<i>XhoI</i>)	CCG CTC GAG TCA GAT CTT ATC GTC GTC ATC CTT GTA ATC GAT TCC CAC CTG GGC TCC CG	81,2 °C
ILK-Pkinase for (<i>EcoRI</i>)	CCG GAA TTC CGG CTT CCT AGA CTT GCA TAC CA	72,1 °C
ILK-Pkinase Flag rev (<i>XhoI</i>)	CCG CTC GAG TCA GAT CTT ATC GTC GTC ATC CTT GTA ATC GCG GCG CAT CTT CTC CAG	80,2 °C

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Anlagerungs- temperatur
Talin-Head for (<i>EcoRI</i>)	CCG GAA TTC CGG ATG TCC ACA CTA TCG CTG CGC	64,9 °C
Talin-Head Flag rev (<i>XhoI</i>)	CCG CTC GAG CGG TTA GAT CTT ATC GTC GTC ATC CTT GTA ATC CTC ATC GCC TTC GAT TCC GAA	78,6 °C

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion synthetisiert. Die Stammlösung (100pmol/ μ l) wurde für den Einsatz in der PCR 1:10 verdünnt.

2.8.2 Sequenzierprimer

Sämtliche Sequenzierungen wurden von der Firma 4base lab GmbH, Reutlingen durchgeführt. Für die Sequenzierungen wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
pADH (Agowa)	GCT ATC AAG TAT AAA TAG ACC TG
pCDNA3.1/BGH-rev	TAG AAG GCA CAG TCG AGG
CMV	CAA ATG GGC GGT AGG CGT GTA
pGex-5X	GCT GGC AAG CCA CGT TTG GTG
pMyr 5'	ACT ACT AGC AGC TGT AAT AC
pMyr 3'	CGT GAA TGT AAG CGT TGA CAT
SP6 (Standard)	ATT TAG GTG ACA CTA TA
T3 (Standard)	ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA
T7 (Standard)	AAT ACG ACT CAC TAT AGG
pUAST F1	GTG AAC ACG TCG CTA AG
pUAST R1	GCG GTT GCC TGC TGA GA

2.8.3 real-time Primer

Für die Analyse mittels real time PCR wurden die folgenden Oligonukleotide verwendet:

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
Wech real time for	TGG TTA AAT GCG TGC GTG AA
Wech real time rev	CAA TCG AAC GGC TCC AAT TCT
Wech RT F1	ATG GGC CAC GTT CTC GTA TC
Wech RT R1	GAG GCG ATT CCT TTG GTT TG

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
Actin5C F1	GTG CAC CGC AAG TGC TTC TAA
Actin5C R1	TGC TGC ACT CCA AAC TTC CAC
Rp49 (RpL32) F1	GCT AAG CTG TCG CAC AAA TG
Rp49 (RpL32) R1	GTT CGA TCC GTA ACC GAT GT

2.9 Genbank

Für die Amplifizierung einiger Gene, sowie für das Auffinden von neuen Interaktionspartnern von Wech mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybridsystems wurde folgende Genbank verwendet:

Drosophila melanogaster embryonale cDNA Bank (Stratagene, Kat.-Nr.: 200444) Anzahl unabhängiger Klone: 9.5×10^6 . Durchschnittliche Insertgröße: 0,3 - 3,2 kb Nicht amplifiziert Angaben zur Bank-Konstruktion: mRNA wurde aus *Drosophila* Embryonal-Extrakt isoliert und in cDNA mit Hilfe eines *XhoI*-oligo d(T)-Primers revers transkribiert. An das 5'-Ende der cDNA wurde ein *EcoRI* Adapter ligiert. Adapter: 5'- AA TTC GGC ACG AG - 3'. Die cDNA wurde mit *XhoI* geschnitten und in die *EcoRI* - *XhoI* Klonierungsstelle des pMyr- Vektors kloniert.

2.10 Organismen

2.10.1 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp
XL1 Blue MRF	$\Delta(\text{mcrA})183$, $\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})$, <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>lac(F⁻, proAB, lacIF^qZΔM15, TN10(tet^r), recA1, relA1, thi-1</i> (Stratagene, Heidelberg)
BL21-Codon Plus (DE3)-RIL	<i>E. coli</i> BF ⁻ <i>ompT hsdS(r_B⁻m_B⁻)dcm⁺ Tet^r galλ(De3) <i>endA Hte</i> [argU iLeY leuW Cam^r]</i>

2.10.2 Hefestämme

Hefestamm	Genotyp
cdc25H Hefestamm (α)	Mat α <i>ura3-52 his3-200 ade2-101 lys2-801 trp1-90 leu2-3 112 cdc25-2 Gal⁺</i> (Stratagene, Heidelberg)

2.10.3 Fliegenstämme

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Fliegenstämme mit ihrer Bezeichnung und Herkunft aufgelistet. Die Beschreibung der Genotypen folgt der Nomenklatur nach Lindsley und Zimm (1992).

Balancerstämme

Bezeichnung	Genotyp	Chromosom	Herkunft
Tft - wg lacZ	Tft / CyO wg lacZ	2.	Stammsammlung
Tft - hbB	y w; Tft / CyO hbB	2.	Stammsammlung
Pm	w; Pm / CyO	2.	Stammsammlung
Doppelbalancer	y w; Sp / CyO ftz lacZ; Dr / TM3; dominant marker Sp und Dr	2. + 3.	Stammsammlung
Kr-GFP-balancer	w; L ² Pin ¹ / CyO, Gal4-Kr, UAS-GFP	2.	Stammsammlung
twi-GFP-balancer	w; twiUASGFP / CyO	2.	Stammsammlung
wg-lacZ-balancer	w; wglacZ / CyO (Mz282)	2.	Stammsammlung

P-Element Insertionen

Bezeichnung	Genotyp	Chromosom	Herkunft
wech ^{k08815}	y ¹ w ^{67c23} ; P{lacW}wech ^{k08815a} P[lacW]k08815b / CyO	2.	Bloomington
wech ^{EP2291}	P{EP}wech ^{EP2291} (EP(2)2291)	2.	Szeged
wech ^{KG07955}	y ¹ w ^{67c23} ; P{SUPorP}wech ^{KG07955} / CyO	2.	Bloomington

Mutanten

Bezeichnung	Genotyp	Chromosom	Herkunft
wech ⁶⁶	w; wech ⁶⁶ / CyO	2.	wurde während dieser Arbeit hergestellt
Df(2R)ST1	Df(2R)ST1, Adh ⁿ⁵ pr ¹ cn* / CyO	2.	Bloomington
en; Df	w; Df(2R)en ^E FRT / CyO	2.	Stammsammlung
wg ^{CX4}	wg ^{CX4} / CyO	2.	Stammsammlung
hh ¹³³⁵	hh ¹³³⁵ / Ubx-lacZ	3.	Stammsammlung

Bezeichnung	Genotyp	Chromosom	Herkunft
if ^{K27} , αPS2, integrin	if ^{K27} / FM7	1.	Stammsammlung
if ^{B4} , αPS2, integrin	if ^{B4} / FM6 f	1.	N. Brown
mys ^{XG43} , βPS, integrin	mys ^{XG43} / FM7	1.	N. Brown
mew, αPS1, integrin	C(1;Y)6,y w mew ⁰²³ / C(1)RM, y pn v; Dp(1;f)y ⁺	1.	Stammsammlung
tensin-GFP 33c	w; gen tensin GFP33c (mutant)	3.	N. Brown
tensin-GFP[*8]	w; gen tensin GFP[*8] (WT+GFP)	3.	N. Brown
ILK-GFP	w f; ILK-GFP	3.	N. Brown
Df-stripe	Df(3R)DG4 / TM3 Sb[1] P{ftzlacZ}	3.	G. Vorbrüggen
stripe ^{I155}	sr[l155] / TM3, Sb, P{ftzlacZ}	3.	G. Vorbrüggen
Dmef2 ^{I13}	stark hypomorph, wenig Myotuben	2.	R.A. Schulz
Dmef2 ⁶⁵	schwach hypomorph, Muskeldelationen	2.	R.A. Schulz
rhea ²	Frameshift nach 1279 AS; endet mit Stop-Codon nach weiteren 31AS	3.	N. Brown
ilk ¹	mwh ¹ Ilk ¹ red ¹ e ⁴ / TM3, Sb ¹	3.	Bloomington

GAL4-Stämme

Bezeichnung	Genotyp	Chromosom	Herkunft
engrailed-GAL4	w; en Gal4 / CyO	2.	Stammsammlung
hs-GAL4	2x sev HSGal4	2.	I. Zinke
da-GAL4	da ^{G32} Gal4 (Ho 3)	3.	Stammsammlung
69B-GAL4	69B Gal4	3.	Stammsammlung
prd-GAL4	y w; p[w ⁺ ;prd::Gal4] ₃	3.	Stammsammlung
stripe-GFP-GAL4	stripe Gal4; UAS-GFPenc / TM3, Sb,Ser	3.	P. Carrera
stripe-GAL4	w[*];P{w[+mW.hs]=GawB} srMD710,P{w ⁺ mC=UAS-GFP} / TM1b, Hu[*] Tb[*]	3.	G. Vorbrüggen
wingless-GAL4	w; P[Gal4-wg.M]MA1	2.	Stammsammlung
Dmef2-GAL4	w; Dmef2-Gal4	2.	R.A. Schulz

UAS-Stämme

Bezeichnung	Genotyp	Chromosom	Herkunft
UAS-Wg	UAS wg / TM3	3.	Stammsammlung
UAS-Hh	UAS hh / SM6 2	2.	Stammsammlung
UAS-Hh	UAS hh M4 (III)	3.	Stammsammlung
UAS-Inx3	y w; UAS-inx3	3.	L. Stebbings
UAS-Inx2-Inx3	y w; UAS-inx2; UAS-Inx3	2. + 3.	L. Stebbings
UAS-Vein	y w; UAS-vein	3.	T. Volk
UAS-Stripe	w[*] ;Pw ⁺ mC=UAS-srb#2.3 / CyO	2.	G. Vorgrüggen
UAS-Wech-6	y w; UAS-Wech	1.	wurde während dieser Arbeit hergestellt
UAS-Wech-10	y w; UAS-Wech	2.	wurde während dieser Arbeit hergestellt
UAS-Wech-13	y w; UAS-Wech	3.	wurde während dieser Arbeit hergestellt
UAS-WechGFP-1 und 4	y w; UAS-WechGFP	2.	wurde während dieser Arbeit hergestellt
UAS-Wech-GFP-11 und 14	y w; UAS-WechGFP	3.	wurde während dieser Arbeit hergestellt
UAS-WechGFP-10 und 12	y w; UAS-WechGFP	1.	wurde während dieser Arbeit hergestellt
UAS-TalinHead-GFP	y w; UAS-TalinHead-GFP	3.	N. Brown
UAS-TalinRod-GFP	y w; UAS-TalinRod-GFP	3.	N. Brown
UAS-ILK-Pkinase-Flag	y w; UAS-ILK-Pkinase-Flag		wurde während dieser Arbeit hergestellt
UAS-ILK-Ankyrin-Flag	y w; UAS-ILK-Ankyrin-Flag		wurde während dieser Arbeit hergestellt

Bezeichnung	Genotyp	Chromosom	Herkunft
UAS-Wech-BCC-Myc-12	y w; UAS-Wech-BCC-Myc	3.	wurde während dieser Arbeit hergestellt
UAS-Wech- Δ BCC-Myc-17	y w; UAS-Wech- Δ BCC-Myc	1.	wurde während dieser Arbeit hergestellt
UAS-Wech-NHL-Myc-7	y w; UAS-Wech-NHL-Myc	2.	wurde während dieser Arbeit hergestellt
UAS-Wech- Δ NHL-Myc-42	y w; UAS-Wech- Δ NHL-Myc	3.	wurde während dieser Arbeit hergestellt

RNAi-Stämme

Bezeichnung	Genotyp	Chromosom	Herkunft
pWiz-Wech-BA-17	y w; UAS-pWizWech-BA	1.	wurde während dieser Arbeit hergestellt
pWiz-Wech-BA-59	y w; UAS-pWizWech-BA	2.	wurde während dieser Arbeit hergestellt
pWiz-Wech-BA-77	y w; UAS-pWizWech-BA	3.	wurde während dieser Arbeit hergestellt
pWiz-Wech-AB-6 und 52	y w; UAS-pWizWech-AB	1.	wurde während dieser Arbeit hergestellt
pWiz-Wech-AB-13 und 16	y w; UAS-pWizWech-AB	2.	wurde während dieser Arbeit hergestellt
pWiz-Wech-AB-38 und 49	y w; UAS-pWizWech-AB	3.	wurde während dieser Arbeit hergestellt
pWiz-Inx3-Ex4-BA-14	y w; UAS-pWizInx3-Ex4-BA	1.	wurde während dieser Arbeit hergestellt

Bezeichnung	Genotyp	Chromosom	Herkunft
pWiz-Inx3-Ex4-AB-35	y w; UAS-pWizInx3-Ex4-AB	1.	wurde während dieser Arbeit hergestellt
pWiz-Inx3-full-AB-75	y w; UAS-pWizInx3-full-AB	2.	wurde während dieser Arbeit hergestellt

Transposasen

Bezeichnung	Genotyp	Chromosom	Herkunft
Transposase, Δ2-3	wg ⁵⁹¹ / CyO; Sb Δ2-3 / TM6 Ubx	2. + 3.	Stammsammlung
Transposase	FM6; Δ2-3 MKRS / Δ2-3 TM2	1. + 3.	Stammsammlung

Flp-ovo^D-System

Bezeichnung	Genotyp	Chromosom	Herkunft
wech ⁶⁶ -FRG13 / CyO	y w; wech ⁶⁶ , P{FRT}G13 / CyO	2.	wurde während dieser Arbeit hergestellt
wech ⁶⁶ -FRG13, UASm-CD8GFP / CyO	y w; wech ⁶⁶ , P{FRT}G13 P{UASmCD8::GFP}G13 / CyO	2.	wurde während dieser Arbeit hergestellt
P ovo ^{D1} FRT-G13 ^{2R} / CyO	P(mini w ⁺ ;FRT) ^{G13} P(mini w ⁺ ; ovo ^{D1}) ^{32X9} / S Sp Ms(2)M bw ^D / CyO	2.	Bloomington
FRT-G13, ovo ^{D1}	FRT-G13, ovo ^{D1} / CyO	2.	Bloomington
FRT ^{2R} , ovo ^{D1}	P(ovo ^{D1}) ^{2R} FRT ^{2R} / CyO	2.	Bloomington
FLP	y w; FLP-1; Adv / CyO	1. + 2.	Bloomington
FLP	P[ry ⁺ Flp] y w; hoc ^{sco} / CyO	2.	Bloomington
FRT M7	w; P[w ⁺ , FRT] G13	2.	Bloomington
FRT M8	w; P[w ⁺ , FRT] G13, L	2.	Bloomington
FRT G13, UASmCD8GFP	y w; P{FRT(w ^{hs})}G13 P{UAS-mCD8::GFP}LL5	2.	Bloomington

Bezeichnung	Genotyp	Chromosom	Herkunft
elav ^{C115} , FRT G13, tubP- GAL80	P{GawB}elav ^{C155} , P{hsFLP}1; P{FRT(w ^{hs})}G13 P{tubP- GAL80}LL2 / CyO	2.	Bloomington
tubP-GAL4, FRT G13, tubP- GAL80	w; P{FRT(w ^{hs})}G13, P{πM}45F, P{tubP-GAL80}LL2 / SM6a; P{tubP-GAL4}LL7 / TM6B, Tb ¹	2. + 3.	Bloomington

LD-KLone

(aus Berkeley *Drosophila* Genome Project)

Bezeichnung	Gen	Eigenschaften
LD02463	wech	LD Library; Gewebequelle: <i>D.m.</i> -Embryo (0-22 Std. alt); Vektor: pBluescript SK (+/-)
SD07967	talin	SD Library; Gewebequelle: <i>Drosophila</i> Schneider L2-Zellen; Vektor: pOT2
LD24671	integrin linked kinase	LD Library; Gewebequelle: <i>D.m.</i> -Embryo (0-22 Std. alt); Vektor: pBluescript SK (+/-)
SD01953	tensin	SD Library; Gewebequelle: <i>Drosophila</i> Schneider L2-Zellen; Vektor: pOT2
RE55238	myospheroid	RE Library; Gewebequelle: <i>D.m.</i> -Embryo (0-22 Std. alt); Vektor: pFLC-I
SD01953	myospheroid Cterminus	SD Library; Gewebequelle: <i>Drosophila</i> Schneider L2-Zellen; Vektor: pOT2
GH04080	black cells	GH Library; Gewebequelle: <i>D.m.</i> -Adulte (Gehirn); Vektor: pBluescript SK (+/-)

2.11 Medien für die Bakterien- und Hefekultur

2.11.1 Bakterienkultur

Zur Anzucht von Bakterienkulturen werden die folgenden Medien benötigt. Sämtliche Medien werden für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

2.11 Medien für die Bakterien- und Hefekultur

LB-Agar	10 g NaCl; 10 g Tryptophan; 5 g Hefeextrakt; 20 g Agar; auf 1 l mit A.bidest. auffüllen; mit 5 M NaOH den pH auf 7,0 einstellen, autoklavieren.
LB-Ampicillin-Agar	1 l LB-Agar autoklavieren, auf 60 °C abkühlen lassen; 1 ml Ampicillin (50 mg/ml sterilfiltriert) zugeben.
LB-Chloramphenikol-Agar	1 l LB-Agar autoklavieren, auf 60 °C abkühlen lassen; 3 ml Chloramphenikol (10 mg/ml sterilfiltriert) zugeben.

2.11.2 Hefekultur

Zur Anzucht von Hefekulturen werden die folgenden Medien benötigt, die wie oben beschrieben, autoklaviert werden. Bei diesen Medien empfiehlt es sich Ampicillin (50 µg/ml) zuzugeben, um mögliche Kontaminationen durch Bakterien zu vermeiden.

Galaktose-Minimalmedium	1,7 g Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren; 5 g Ammoniumsulfat; 20 g Galaktose; 10 g Raffinose; 17 g Bacto-Agar; 0,67 g Aminosäuremix ohne Ura, Leu; auf 1 l mit A. bidest auffüllen.
Glukose-Minimalmedium	1,7 g Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren; 5 g Ammoniumsulfat; 20 g Glukose; 17 g Bacto-Agar, 0,67 g Amminosäuremix ohne Ura, Leu; auf 1 l mit A.bidest auffüllen.
YPAD-Agar	10 g Hefeextrakt; 20 g Pepton; 20 g Glukose; 20 g Bacto-Agar; 40 mg Adeninsulfat; auf 1 l mit A.bidest auffüllen.
YPAD-Vollmedium	10 g Hefeextrakt; 20 g Pepton; 20 g Glukose; 40 mg Adeninsulfat; auf 1 l mit A.bidest auffüllen.

2.11.3 Medien für die Kultivierung von *Drosophila melanogaster*

Fliegefutter (für 11 Liter)

90 g Fadenagar; 165 g Bierhefe; 615 g Maismehl; 1 l Rübensirup; 200 ml 10% Nipagin-Lösung. Während der Fadenagar in 8 l VE-Wasser gelöst wird, werden aus der Bierhefe und dem Maismehl mit 3,3 l VE-Wasser ein Gemisch hergestellt, dass anschließend zu dem gelösten Fadenagar gegeben und aufgekocht wird. Nach Zugabe des Rübensirups wird das Futter für 15 min unter Rühren gekocht. Sobald das Futter auf 60 °C abgekühlt

ist, werden 200 ml Nipagin-Lösung zugegeben und das Futter auf die Futterröhrchen verteilt.

Apfelsaftagarplatten

4l A.bidest werden mit 85 g Agar aufgekocht und auf 65 °C abgekühlt. 1l Apfelsaft wird mit 100 g Zucker gemischt und ebenfalls auf 65 °C erhitzt. Zu dem Apfelsaft-Zuckergemisch werden 40 ml Nipagin-Lösung gegeben und mit dem Agar-Wassergemisch vermischt. Der Apfelsaftagar wird auf Petrischalen verteilt.

Kapitel 3

Methoden

3.1 Plasmid-Isolierung aus *E. coli*

3.1.1 Isolierung von Plasmiden im analytischen Maßstab (Minipräparation)

3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum werden mit einer einzelnen Bakterienkultur angeimpft und ÜN bei 37 °C in einem Schüttler (220 UpM) inkubiert. Diese ÜN-Kultur wird bei 5000 UpM 2 min pelletiert und der Überstand vollständig verworfen. Das Pellet wird in 200 µl TELT-Lysozymlösung durch vortexen resuspendiert. Die Suspension wird im Anschluss für 3 min gekocht. Nach diesem Hitzeschock, bei dem die Bakterienzellwände aufgebrochen werden, wird der Ansatz 2 min auf Eis abgekühlt, und die Bakterien-DNA 15 min bei 13000 UpM pelletiert. Das Sediment wird verworfen und zu dem Überstand werden 200 µl Isopropanol gegeben. Durch Zentrifugation (30 min, 13000 UpM, 4 °C) wird die Plasmid-DNA sedimentiert, mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen und erneut 10 min zentrifugiert (13000 UpM, RT). Anschließend wird die Plasmid-DNA entweder an der Luft oder in der Speed-Vac getrocknet und in 50 µl Aqua bidest (autoklaviert) gelöst. Die DNA kann so bei -20 °C gelagert werden.

3.1.2 Isolierung von Plasmiden im präparativen Maßstab (Midipräparation) (Nucleospin Plasmid Midi Kit, Macherey & Nagel)

Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu gewinnen, werden 50 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit einer einzelnen Bakterienkultur angeimpft und ÜN bei 37 °C in einem Schüttler (220 UpM) inkubiert. Die Plasmid-DNA der Bakterien dieser ÜN-Kultur wird mit Hilfe des „Nucleospin Plasmid Midi Kits“ (Macherey & Nagel, Düren) gewonnen. Nach alkalischer Lyse der Bakterien wird die Plasmid-DNA unter Verwendung von „AX 100“ Anionenaustausch-Säulen (Macherey & Nagel, Düren) gemäß

den Herstellerangaben aufgereinigt. Die so gewonnene Plasmid-DNA wird in 200 μl 1x TE-Puffer aufgenommen, und kann bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

3.2 Isolierung von genomischer DNA aus Fliegen

Zur Isolierung von genomischer DNA aus adulten Fliegen werden etwa 30 Fliegen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend werden die Fliegen in 400 μl Puffer A mit Hilfe eines Homogenisators zerkleinert und für 30 min bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach Zugabe von 800 μl LiCl/KAc Lösung (1 Teil 5 M KAc : 2,5 Teile 6 M LiCl) wird der Ansatz für 10 min auf Eis inkubiert und im Anschluss 15 min bei 6000 UpM und RT zentrifugiert, wodurch die Zelltrümmer sedimentiert werden. Der Überstand wird in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 600 μl Isopropanol versetzt. Es folgt eine 15minütige Zentrifugation bei 6000 UpM und RT, bei der die gefällte genomische DNA sedimentiert wird. Das Pellet wird mit 500 μl 70%igem Ethanol (6000 UpM, RT, 10 min) gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Die getrocknete DNA wird in 100 μl TE-Puffer aufgenommen und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.3 Isolierung von RNA aus Gewebe

(Nucleospin RNA2 Kit, Macherey & Nagel)

Zur Isolation der Gesamt-RNA aus Embryonen werden diese (100-200 μl) mit PBS gewaschen, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und der Überstand entfernt. Anschließend werden die Embryonen in 600 μl Puffer RA1 und 6 μl β -Mercaptoethanol mit Hilfe eines Homogenisators zerkleinert. Die Suspension wird auf einen NucleoSpin Filter (violett) geladen und für 1 min bei 11000 UpM zentrifugiert. Der Durchfluss wird in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 600 μl 70 %igem Ethanol durch pipettieren gemischt. Das Gemisch wird auf einen neuen NucleoSpin Filter (blau) geladen und gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt. Die so gewonnene Gesamt-RNA wird in 60 μl RNase-freiem Aqua bidest aufgenommen und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.4 cDNA-Synthese

(Qiagen QuantiTect Reverse Transcription Kit)

Die Reverse Transkription von mRNA zu cDNA erfolgt mit dem „QuantiTect Kit“ von Qiagen. Bevor mit der eigentlichen cDNA-Synthese begonnen werden kann, muss die restliche DNA aus der Gesamt-RNA entfernt werden. Hierzu werden 1 μg RNA mit 2 μl gDNA wipe-out Puffer (7x) versetzt und der Ansatz mit RNase-freiem Aqua bidest auf 14 μl aufgefüllt. Anschließend wird die Probe für 2 min bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert und im Anschluss bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Für jede neu isolierte RNA wurde neben der RT-Reaktion (siehe unten) eine Reaktion

ohne Reverse Transkriptase (-RT-Kontrolle) angesetzt, um zu testen, ob die Gesamt-RNA trotz Entfernung der DNA durch die DNase-Behandlung mit genomischer DNA kontaminiert war. Die Reverse Transkriptase (RT) Reaktion wird wie in der angegebenen Tabelle pipettiert und für 30 min bei 42 °C, gefolgt von 3 min bei 95 °C inkubiert und im Anschluss auf Eis gestellt. Bei einer RNA-Ausgangskonzentration von 1 µg wird die Reaktion auf 50 µl mit Aqua bidest aufgefüllt und kann nun bei -20 °C gelagert werden.

	Ansatzvolumen	
	- RT	+ RT
RT 5x Puffer	2 µl	2 µl
Primer-Mix	0,5 µl	0,5 µl
RNA (-gDNA)	7 µl	7 µl
RNase freies Aqua bidest	0,5 µl	
Reverse Transcriptase		0,5 µl

Tab. 3.1: Schema der cDNA-Ansätze dieser Arbeit.

3.5 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wird die Agarosegelelektrophorese verwendet. Zur Herstellung der Agarosegele (1% bzw. 2%) wird die Agarose in 1x TAE-Laufpuffer aufgenommen und durch Aufkochen gelöst. Anschließend wird diese Lösung in eine entsprechende Gelkammer gegeben und Syber-Safe in einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben. Das Syber-Safe interkaliert während der Elektrophorese mit der DNA, so dass diese im Anschluss unter UV-Licht sichtbar wird. Das erhärtete Gel wird in einer Gelbettkammer mit 1x TAE-Laufpuffer überschichtet. Bevor die DNA-Proben in die Geltaschen gefüllt werden, werden sie mit einem zehntel Gelladepuffer (10x) versetzt. Dieser Ladepuffer erhöht die Dichte der DNA-Lösung, so dass sie in die Geltaschen absinkt. Die Farbstoffe im Laufpuffer bewegen sich proportional zur Proben-DNA und erlauben eine Abschätzung wie weit der Elektrophoreselauf fortgeschritten ist.

Legt man nach dem Beladen der Taschen mit DNA-Lösung eine elektrische Spannung an, wandert die DNA, die beim pH-Wert des Laufpuffers negativ geladen ist, proportional ihres Molekulargewichtes zur Anode. Die kleineren Fragmente können aufgrund der geringeren Reibung am Gelmaterial leichter und somit schneller durch das Gel wandern als die größeren Fragmente. Um die Fragmente größenmäßig einordnen zu können, wird zum Vergleich ein entsprechender Größenstandard aufgetragen. Die Agarosegele werden nach Beendigung der Elektrophorese unter dem UV-Licht ausgewertet.

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese kann man z.B. PCR-Produkte identifizieren, Restriktionsspaltungen kontrollieren und DNA-Fragmentgrößen abschätzen.

3.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein Verfahren mit der beliebige Nukleinsäureabschnitte amplifiziert werden können. Um die DNA-Amplifikation durchführen zu können, müssen zuerst zwei Oligonukleotide (Primer) hergestellt werden, die komplementär zum 5'-Ende bzw. 3'-Ende des zu synthetisierenden Fragments sind. Ausgangspunkt der DNA-Synthese ist eine DNA-Matrize, welche die zu amplifizierende Region beinhaltet. Die DNA-Synthese besteht aus drei zeitlich genau definierten Reaktionen, die durch unterschiedliche Temperaturen gekennzeichnet sind. Zuerst werden die gebildeten Doppelstränge denaturiert (94 °C), so dass am Ende dieser Phase nur noch einzelsträngige DNA-Fragmente vorliegen. Anschließend wird die Temperatur kurzzeitig auf einen Bereich gesenkt, in dem die im Überschuss vorliegenden Oligonukleotide mit den komplementären Bereichen auf der Ziel-DNA hybridisieren können (Anlagerungsphase). Im letzten Schritt wird die Temperatur auf 72 °C, dem Temperaturoptimum der hitzestabilen DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase), erhöht, so dass die neuen Stränge durch diese DNA-Polymerase in Kombination mit den vorhandenen Desoxynukleotid-Triphosphaten synthetisiert werden können (Synthesephase). Da bei jedem folgenden Zyklus die vorhandene DNA als Vorlage dient, wird so bei jedem weiteren Zyklus die DNA verdoppelt. Die Vermehrung der Amplifikate erfolgt somit exponentiell. Nach Beendigung des letzten Zyklus folgt eine mehrminütige Synthesephase, um die noch nicht vollständig abgeschlossenen Synthesen zu beenden und sämtliche Matrizen-DNA in doppelsträngige Produkte zu überführen. Oftmals ist es wichtig, ein DNA-Fragment absolut korrekt zu amplifizieren, da die Sequenz in weiteren Experimenten korrekt exprimiert werden soll. Daher wird für diese Reaktionen eine spezielle *Pfu*-Polymerase (Stratagene) verwendet, die sich durch ihre Korrektur-Lesefunktion auszeichnet und somit eine geringere Fehlerquote aufweist, als die handelsübliche *Taq*-Polymerase.

Jeder PCR-Ansatz setzt sich nach folgendem Schema zusammen:

	Ansatzvolumen	
	25 μ l	50 μ l
Matrizen-DNA	1-20 ng	1-20 ng
Oligostartermolekül 1	10 pmol	10 pmol
Oligostartermolekül 2	10 pmol	10 pmol
10x PCR-Puffer (polymeraseabhängig)	2,5 μ l	5 μ l
dNTP-Lösung (dATP, dGTP, dCTP, dTTP je 25mM)	4 μ l	8 μ l
<i>Taq</i> oder <i>Pfu</i> -Polymerase	1 u	1 u
Aqua bidest	ad 25 μ l	ad 50 μ l

Tab. 3.2: Schema der PCR-Ansätze in dieser Arbeit.

3.7 DNA-Aufreinigung

3.7.1 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

(Nucleospin Extract2)

Mit Hilfe dieser Methode lassen sich in Lösung gebrachte DNA-Fragmente von Bestandteilen wie Oligonukleotiden, Polymerasen, Enzymen und Salzen trennen. Zu der DNA-Probe werden 4 Volumen Puffer NT2 gegeben und durch pipettieren gemischt. Diese Suspension wird auf eine Nucleospin-Extract-Säule gegeben. Es folgt eine einminütige Zentrifugation bei 13000 UpM, bei der die Probe die Säule durchläuft und das aufzureinigende DNA-Fragment an dem Säulenmaterial haften bleibt. Anschließend wird die Säule mit 600 μ l und 200 μ l Puffer NT3 gewaschen. So werden die noch verbliebenen Verunreinigungen entfernt. Um Rückstände des ethanolhaltigen Puffers NT3 zu entfernen wird die Säule im Anschluss noch einmal trocken zentrifugiert (2 min, 13000 UpM), bevor mit der eigentlichen Elution der DNA-Fragmente begonnen wird. Die DNA wird mit 50 μ l Aqua bidest in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß eluiert.

3.7.2 Natriumacetat-Fällung

Zu einer aufgereinigten DNA-Lösung werden 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen 100%iges Ethanol gegeben. Der Ansatz wird durch pipettieren gemischt und eine Stunde (wahlweise ÜN) bei -20 °C gefällt. Es folgt eine Zentrifugation für 30 min bei 13000 UpM und 4 °C. Im Anschluss wird der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen (10 min, 13000 UpM, 4 °C). Der Überstand wird abermals vorsichtig abgenommen und das Pellet in der Speed-Vac getrocknet (5 min, 37 °C). Die getrocknete DNA kann nun in dem gewünschten Volumen Aqua bidest resuspendiert werden.

3.7.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (Nucleospin Extract2, Macherey & Nagel)

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen dient dazu, DNA-Fragmente gleicher Größe aus einer Lösung unterschiedlich großer DNA-Fragmente zu erhalten. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente wird die gesuchte Bande unter UV-Licht ausgeschnitten und das Gelstück in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Zu 100 mg DNA werden 200 μl Puffer NT1 pipettiert. Die Probe wird für 10 min bei 56 °C auf dem Schüttler inkubiert und zwischendurch gevortext, bis sich das Gelstück vollständig gelöst hat. Anschließend wird die DNA über Ionenaustauschchromatographie entsprechend den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Elution der an die Säulenmatrix gebundenen DNA erfolgt mit 50 μl Aqua bidest.

3.7.4 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von gereinigter DNA

Die Konzentrationsbestimmung vollständig gelöster DNA erfolgt über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Hierzu werden 2,5 μl der zu messenden DNA-Probe zu 497,5 μl Aqua bidest gegeben, und die Absorption in einer Quarzküvette bei 260 nm gegen Aqua bidest als Nullwert in einem Spektralphotometer bestimmt. Die Nukleinsäurekonzentration errechnet sich aus der Absorption bei 260 nm, der Verdünnung (hier 200) und einem für DNA bzw. Oligonukleotide spezifischen Multiplikationsfaktor. Dieser Faktor beträgt für einzelsträngige DNA und Oligonukleotide 33, für doppelsträngige DNA 50. Die DNA-Konzentration errechnet sich so nach folgender Formel:

$$c \left[\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} \right] = \frac{OD_{260} * \text{Multiplikationsfaktor} * \text{Verdünnungsfaktor}}{1000}$$

Da die Lösung neben DNA auch Verunreinigungen in Form von RNA, Salzen, Phenol, Ethanol und Proteinfragmenten enthalten kann, wird die Konzentration zusätzlich bei einer OD_{280} gemessen, da die aromatischen Molekülstrukturen bei dieser Wellenlänge besonders lichtabsorbierend wirken. Der Quotient aus den Absorptionen bei 260 nm und 280 nm gibt Aufschluss über die Reinheit der DNA-Lösung. Werte zwischen 1,8 und 2,0 weisen auf hochreine DNA hin. Darunter liegende Werte weisen auf Verunreinigungen der oben genannten Substanzen hin.

3.8 Klonierung von DNA-Fragmenten

3.8.1 Enzymatische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen, welche eine für sie spezifische Zielsequenz erkennen, lässt sich DNA schneiden. Für einen solchen Restriktionsverdau wird etwa 1 μg der zu schneidenden DNA, ein Zehntel des zu dem Enzym gehörenden Puffers, und das entsprechende Enzym (3-5 Units pro μg DNA) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Der Ansatz wird mit Aqua bidest auf ein Gesamtvolumen von 20 μl aufgefüllt und für 2-3 Std. bei 37 °C inkubiert. Bei einem Doppelverdau wird die DNA gleichzeitig mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen geschnitten. Dabei ist zu beachten, dass beide eingesetzten Enzyme unter den gleichen Bedingungen (entsprechender Puffer) eine 75 - 100%ige Aktivität aufweisen.

3.8.2 Vorbereitung eines Plasmidvektors für die Aufnahme von Passagier-DNA

Um isolierte DNA-Fragmente (Passagier-DNA) aufnehmen zu können, muss ein Plasmidvektor zuerst mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen geschnitten werden (siehe 3.8.1). Um eine Religation des Plasmidvektors zu vermeiden, werden die überstehenden 5'-Phosphatgruppen, die für eine Ligationsreaktion erforderlich sind, abgespalten. Bei dem späteren Einbau von DNA-Fragmenten stellen diese die für die Ligation erforderliche 5'-Phosphatgruppe zur Verfügung. Für die Dephosphorylierungsreaktion werden zu etwa 100 ng geschnittenem Plasmidvektor 1 μl (1U/ μl) alkalische Krabben-Phosphatase und ein Zehntel des 10x Dephosphorylierungspuffers gegeben. Der Ansatz wird mit Aqua bidest auf ein Gesamtvolumen von 20 μl aufgefüllt und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Um die alkalische Phosphatase nach der Dephosphorylierungsreaktion zu inaktivieren, wird der Ansatz einem Hitzeschock bei 65 °C für 15 min ausgesetzt.

3.8.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation eines linearisierten und dephosphorylierten Plasmidvektors mit einem zu klonierenden DNA-Fragment ist eine intermolekulare Veresterungsreaktion zwischen den 5'-Phosphatenden der zukünftigen Passagier-DNA und den 3'-OH-Enden des Vektors. Dabei entstehen ringförmige, fremd-DNA-haltige Plasmide, die an den Insertionsstellen nur über einen durchgehenden Einzelstrang miteinander verbunden sind, da die durch die Dephosphorylierung des Vektors entstandenen 5'-Enden nicht mit den 3'-OH-Enden der Passagier-DNA verestert werden können. Der endgültige Ringschluss findet erst nach der anschließenden Transformation (siehe 3.9.2) durch Reparaturenzyme der Wirtszelle

statt. Die für die Ligationsreaktion einzusetzende Menge an DNA-Fragmenten ist abhängig von dem Größenverhältnis zwischen Vektor- und Passagier-DNA, da in der Regel auf Äquimolarität Wert gelegt wird, um Konkaterisierungen mehrerer Passagier-DNA-Moleküle zu vermeiden. Die einzusetzende Aktivität an T4-Ligase beträgt 1 U. Das Endvolumen des Ligationsansatzes sollte nicht mehr als 20 μl (optimal 15 μl) betragen, um eine optimale Dichte an kohäsiven Enden zu gewährleisten. Die Ligationsreaktion wird ÜN bei einer für die T4-Ligase suboptimalen Temperatur von 14 °C durchgeführt, um durch die temperaturbedingte niedrige molekulare Bewegungsgeschwindigkeit stabilere, für die Ligationsreaktion erforderlichen Ende-an-Ende-Anlagerungen zu ermöglichen.

3.8.4 TOPO-Klonierung (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen)

Die TOPO-Klonierung ist eine sehr effiziente Methode, bei der das mittels *Taq*-Polymerase amplifizierte PCR-Produkt direkt in den Plasmidvektor inseriert wird. Die *Taq*-Polymerase besitzt eine terminale Transferase-Aktivität, die ein einzelnes dATP an das 3'-OH-Ende des PCR-Produktes hängt. Gleichzeitig hat der linearisierte pCRII-TOPO-Vektor an seinen 3'-OH-Enden ein einzelnes überhängendes dTTP. Durch die an den linearisierten Vektor kovalent gebundene Topoisomerase I aus dem *Vaccinia* Virus ist es möglich, das PCR-Produkt effizient mit dem Plasmidvektor zu ligieren. Für die TOPO-Ligationsreaktion werden 0,5 μl DNA, 1 μl Salzlösung, 1 μl pCRII-TOPO-Vektor und 2,5 μl Aqua bidest zusammengegeben und durch pipettieren gemischt. Der Ansatz wird anschließend 5 min bei RT inkubiert. Im Anschluss werden 2 μl dieses Ansatzes zu 100 μl der zuvor aufgetauten „One Shot“ kompetenten Bakterien (sind im Kit enthalten) gegeben und dieser Transformationsansatz für 20 min auf Eis inkubiert. Es folgt ein Hitzeschock bei 42 °C für 30 sek. während dem die Bakterien die DNA aufnehmen. Anschließend werden 250 μl auf RT vorgewärmtes LB-Medium zu den Bakterien pipettiert und für eine Stunde bei 37 °C und 1000 UpM auf einem Schüttler inkubiert. Währenddessen werden auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum 50 μl XGal (nach Herstellerangaben in DMSO gelöst) ausgestrichen und die Platten bei 37 °C getrocknet. Nach der einstündigen Inkubation werden auf eine LB-Agarplatte mit XGal 50 μl des Transformationsansatzes ausgestrichen, und der Rest auf einer weiteren LB-Agarplatte mit XGal. Die Platten werden ÜN bei 37 °C inkubiert und am nächsten Tag finden sich blaue und weiße Kolonien auf den Platten. Die blauen Kolonien enthalten den religierten Vektor ohne PCR-Produkt, da hier noch das *lacZ*-Gen durch seinen Promotor abgelesen werden kann. Die weißen Kolonien enthalten dagegen vollständige Plasmid-DNA, da hier durch die Insertion des PCR-Produktes das *lacZ*-Gen zerstört ist und nicht mehr abgelesen werden kann.

3.9 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

3.9.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Herstellung chemokompetenter Bakterien (DH5 α und BL21) (nach Hannahan)

10 ml LB-Medium werden mit Zellen einer einzelnen Bakterienkolonie (DH5 α oder BL21) angeimpft und ÜN bei 37 °C in einem Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur werden am nächsten Morgen 2 ml in 50 ml frisches LB-Medium überimpft und weiter im Schüttler bei 37 °C inkubiert. Bei einer optischen Dichte (OD) bei 550 nm von 0,5 wird die Kultur in ein 50 ml Falcon überführt und zentrifugiert (15 min, 1000 UpM, 4 °C). Das erhaltene Pellet wird in 1/3 des Ausgangsvolumens eiskalter RF-1 Lösung resuspendiert. Diese Suspension wird 15 min auf Eis inkubiert, bevor sie erneut zentrifugiert wird (15 min, 1000 UpM, 4 °C). Das Pellet wird in 1/12 des Ausgangsvolumens RF-2 Lösung aufgenommen. Nach einer weiteren Inkubation für 15 min auf Eis werden die Zellen zu je 200 μ l aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und die Aliquots bei -80 °C gelagert.

Herstellung elektrokompenter Bakterien (DH5 α)

100 ml LB-Medium werden mit einer Einzelkolonie DH5 α -Zellen angeimpft und ÜN bei 37 °C in einem Schüttler inkubiert. Anschließend wird so viel Kultur in 200 ml frisches LB-Medium überimpft, dass die optische Dichte (OD) bei 600 nm etwa 0,1 beträgt. Nach einer weiteren Inkubation bei 37 °C im Schüttler sollte die OD₆₀₀ zwischen 0,5 und 0,8 liegen. Bei dieser OD können die Zellen pelletiert werden (15 min, 3760 UpM). Ab jetzt müssen alle weiteren Arbeiten auf Eis bzw. bei 4 °C durchgeführt werden. Das erhaltene Pellet wird in 200 ml eiskaltem Aqua bidest aufgenommen und erneut zentrifugiert (15 min, 3760 UpM, 4 °C). Im Anschluss wird das Pellet in 5 ml sterilfiltriertem Aqua bidest mit 10% Glycerol aufgenommen und wiederum wie oben pelletiert. Diese Zellen werden abschließend in 2 ml sterilfiltriertem Aqua bidest mit 10% Glycerol aufgenommen und zu je 200 μ l aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.9.2 Transformation kompetenter Bakterien

Transformation chemokompetenter Bakterien

Nachdem die chemokompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut wurden, gibt man 100 ng Plasmid-DNA zu 100 μ l kompetenten Bakterien. Die Bakterien werden durch pipettieren mit der DNA gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. In dieser Zeit lagern sich die

Plasmide an die Zellwände der Bakterien. Es folgt ein einminütiger Hitzeschock bei 42 °C während dem die Zellmembran destabilisiert wird und somit die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Bakterien erfolgt. Nach dem Hitzeschock wird der Transformationsansatz für 2 min auf Eis abgekühlt und anschließend mit 900 µl auf RT vorgewärmten LB-Medium versetzt. Es folgt eine einstündige Inkubation des Ansatzes bei 37 °C auf dem Schüttler (1000 UpM). Nach der folgenden Zentrifugation bei 13000 UpM für 10 sek. wird der Überstand verworfen, die pelletierten Bakterien im Rückfluss resuspendiert, und der gesamte Ansatz auf einer LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und die LB-Platte ÜN bei 37 °C inkubiert.

Transformation elektrokompenter Bakterien

Die kompetenten Bakterien werden auf Eis für 10-20 min aufgetaut und anschließend vorsichtig resuspendiert. 75 µl der kompetenten Bakterien werden zusammen mit 65 µl Aqua bidest und 2,5 µl Plasmid-DNA in eine 2 mm Elektroporationsküvette (eiskalt) gegeben. Die Elektroporation erfolgt durch einen kurzen Stromstoß (6,5 ms, 2500 V, 4 µF) bei dem die Plasmid-DNA von den Bakterien aufgenommen wird. Unmittelbar nach dem Stromstoß werden 840 µl auf 37 °C vorgewärmtes LB-Medium zu dem Ansatz gegeben und durch pipettieren gemischt. Der gesamte Transformationsansatz wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 1 Std. bei 37 °C auf dem Schüttler (1000 UpM) inkubiert. Danach wird die Bakteriensuspension, wie bei den chemokompetenten Bakterien beschrieben, pelletiert, das Pellet im Rückfluss resuspendiert und auf einer LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und diese ÜN bei 37 °C inkubiert.

3.10 Biochemische Methoden

3.10.1 Zellkultur

Kultivierung von HeLa-Zellen

HeLa-Zellen sind die ersten menschlichen Zellen, aus denen eine permanente Zelllinie etabliert wurde. Sie bestehen aus menschlichen Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (Gebärmutterhalskrebs). HeLa-Zellen werden in einer 75 ml Zellkulturflasche in DMEM-Medium mit 10 % Serum (FCS) und 1 % Antibiotikum (in der vorliegenden Arbeit ist dies immer Penicillin/Streptomycin) bei 37 °C und 5%iger CO₂-Begasung kultiviert.

Transiente Transfektion von HeLa-Zellen zur Proteinextrakt-Herstellung

HeLa-Zellen werden am Vortag der Transfektion mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in 100 mm Schalen ausgesät. Die Transfektion der Zellen erfolgt mit Hilfe von Metafec-

tene (Biontex). Dazu werden 2,5 μg DNA mit 350 μl serumfreien Medium (DMEM) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. In ein weiteres 1,5 ml Reaktionsgefäß werden zu den 350 μl serumfreien Medium 10 μl Metafectene pipettiert. Beide Ansätze werden im Anschluss zusammen gegeben, gut gemischt und 20 min bei RT inkubiert um die Bildung der DNA-Lipidkomplexe zu ermöglichen. Während der 20minütigen Inkubation werden die Zellen mit PBS gewaschen. Nach der Inkubationszeit werden die Lipid-DNA-Komplexe in 8 ml DMEM mit 5 % Serum aufgenommen und zu den Zellen gegeben. Nach 24 Std. erfolgt die Zellernte durch Ablösen der Zellen vom Boden mit einem Zellschaber und anschließende Zentrifugation bei 800 UpM für 10 min. Danach wird das Zellpellet mit PBS gewaschen, erneut zentrifugiert (800 UpM, 10 min) und bei -80°C gelagert.

Transiente Transfektion von HeLa-Zellen für die Immunhistochemie

Am Vortag der Transfektion werden die HeLa-Zellen mit einer Dichte von 1×10^4 Zellen/ml auf Deckgläschen, die sich in einer 12well-Platte befinden, ausgesät. Die Transfektion erfolgt mit Hilfe von Metafectene (Biontex). Hierzu werden 1 μg DNA, 2 μl Metafectene und 100 μl serumfreies Zellkulturmedium (DMEM) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, gut gemischt und 20 min bei RT inkubiert. Während der Inkubationszeit werden die Zellen mit PBS gewaschen. Nach den 20 min Inkubation wird das DNA-Metafectene-Gemisch zusammen mit 500 μl DMEM mit 10 % Serum (FCS) zu den Zellen gegeben und diese 24 Std. bei 37°C inkubiert.

Immunhistochemie an HeLa-Zellen

Das Deckgläschen mit den transfizierten Zellen wird 2x mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit 100 % eiskaltem Methanol für 10 min bei -20°C fixiert. Nach der Fixierung werden die Zellen mehrmals mit eiskaltem PBS gewaschen und für 10 min mit 0,1 % TritonX-100 in PBS permeabilisiert und 1 Std. in 1 % BSA in PBS blockiert. Der primäre Antikörper wird in 1 % BSA in PBS verdünnt und für 1 Std. zu den Zellen gegeben. Danach wird das Deckgläschen 4x 5 min mit 0,1 % BSA in PBS gewaschen, der sekundäre Antikörper in 0,1 % BSA in PBS verdünnt, auf die Zellen gegeben und 1 Std. bei RT inkubiert. Im Anschluss wird das Deckgläschen einmal mit PBS und einmal mit Aqua bidest gewaschen, und die Zellen auf dem Deckgläschen mit Gelmount-Medium (Vectashield) mit DAPI, dass die DNA im Kern anfärbt, auf einem Objektträger eingebettet.

3.10.2 Herstellung von Proteinextrakten

Herstellung von Proteinextrakten aus Zellen

Die zuvor geernteten und bei -80°C gelagerten Zellpellets (siehe 3.10.1) werden auf Eis aufgetaut und mit $500\ \mu\text{l}$ Ripa-Puffer versetzt und gut gemischt. Anschließend werden die Proben für 20 min auf Eis inkubiert, damit die chemische Lyse durch den Ripa-Puffer erfolgen kann. Danach werden die Zellen mit einer Nadel chemisch geschert und abschließend die Zelltrümmer bei $8000\ \text{UpM}$ für 30 min (4°C) abzentrifugiert. Der Proteinextrakt im Überstand wird in ein neues $1,5\ \text{ml}$ Reaktionsgefäß überführt, mit Protease-Inhibitor versetzt und bei -80°C gelagert.

Herstellung von Proteinextrakten aus *Drosophila melanogaster*

Aus allen Entwicklungsstadien der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ist es gleichermaßen möglich Proteinextrakte herzustellen. Zunächst wird ein Volumen von etwa $200\ \mu\text{l}$ Embryonen, Larven, Puppen bzw. Fliegen in einem $1,5\ \text{ml}$ Reaktionsgefäß gesammelt. Die Individuen werden mit $200\text{--}500\ \mu\text{l}$ Ripa-Puffer versetzt und mit Hilfe eines Pistills mechanisch zermörsert. Im Anschluss werden die Proben 20 min auf Eis inkubiert, um die chemische Lyse durch den Ripa-Puffer einzuleiten. Abschließend erfolgt der Aufschluss der Gewebe durch eine 3×10 sekündige Ultraschallbehandlung und die Sedimentation der Zelltrümmer ($8000\ \text{UpM}$, 10 min, 4°C). Der Proteinextrakt im Überstand wird in ein neues $1,5\ \text{ml}$ Reaktionsgefäß überführt, mit Protease-Inhibitor versetzt und bei -80°C gelagert.

Herstellung von Proteinextrakten aus Bakterien

Die ÜN bei 37°C in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angezogene Bakterienkultur wird in ein $50\ \text{ml}$ Falcon überführt und für 10 min bei $5000\ \text{UpM}$ sedimentiert. Das Sediment wird nun in $5\ \text{ml}$ des entsprechenden Lysis-Puffers (Ripa oder PBS + $0,5\ \%$ Tween + $0,2\ \text{mg/ml}$ Lysozym) mit Protease-Inhibitor resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Bei dieser Inkubation wird die chemische Lyse durch den Puffer eingeleitet. Anschließend folgt der endgültige Aufschluss der Zellwände durch eine Ultraschallbehandlung bei 4°C (1 min, $50\ \%$; 1 min $70\ \%$, cycle 30; 1 min $70\ \%$; dazwischen immer 2-4 min Pause). Die Zelltrümmer werden durch eine 10minütige Zentrifugation bei $5000\ \text{UpM}$, 4°C sedimentiert. Der Überstand enthält den Proteinextrakt, der in ein neues $15\ \text{ml}$ Falcon überführt wird. Bis zur weiteren Verwendung kann der Extrakt so bei -80°C gelagert werden.

3.10.3 Konzentrationsbestimmung isolierter Proteine mit dem BCA-Test (BCA Protein Assay Kit, Pierce)

Mit Hilfe des BCA Proteintests kann der Proteingehalt eines Proteinextraktes ermittelt werden. Hierbei erfolgt der quantitative Nachweis über eine Farbreaktion zwischen den funktionellen Gruppen der Proteine und einem farbstoffbildenden Reagenz. Anhand der Intensität der Farbreaktion lässt sich nun die Proteinkonzentration der Lösung ermitteln. Um eine genaue Konzentrationsbestimmung durchführen zu können, muss zuerst eine Eichgerade mit dem im Proteinextrakt vorhandenen Puffer hergestellt werden. Die Erstellung einer Eichgeraden erfolgt mit Hilfe einer BSA-Stammlösung (1 mg/ml). Ausgehend von der BSA-Stammlösung wird eine Konzentrationsreihe mit einer BSA-Endkonzentration von 0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 und 2500 $\mu\text{g/ml}$ hergestellt. Anschließend wird jede Probe (50 μl) mit 950 μl Detektionsreagenz (setzt sich aus 50 Teilen BCA-Reagenz A und 1 Teil BCA-Reagenz B zusammen) versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss an diese Inkubationszeit wird die Extinktion der einzelnen Proben bei 562 nm gemessen. Zur Ermittlung der Konzentration eines Proteinextraktes werden jeweils 4 μl Extrakt mit 46 μl des entsprechenden Puffers und 950 μl des Detektionsreagenzes vermischt und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Anschließend kann die Proteinkonzentration bei 562 nm photometrisch bestimmt werden.

3.10.4 Immunoblot-Analyse (Western Blotting)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das für die Analyse von Proteinen verwendete Gel-System besteht aus polymerisiertem und quervernetztem Acrylamid. Da Proteine - im Gegensatz zu Nukleinsäuren - nicht einheitlich geladen sind, erfolgt ihre Auftrennung sowohl nach Ladung als auch nach Größe. Man unterscheidet daher die Elektrophorese unter nativen Bedingungen, bei der die Proteine außer nach ihrer Größe auch entsprechend ihrer Nettoladung bei den vorgegebenen Pufferbedingungen getrennt werden, von der Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen. Bei der Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen werden die Proteine zunächst in Gegenwart von β -Mercaptoethanol und Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert und anschließend aufgekocht. In dieser Arbeit wird die Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen und die diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (nach Laemmli) durchgeführt. Bei dieser Variante der Gelelektrophorese besteht das obere Viertel der Trennmatrix aus einem niedermaschigen Gel (Sammegel, 4%ig), das aus 360 μl Tris-HCl (1 M), (pH 6,8); 300 μl Acrylamid 40%; 30 μl 10% SDS; 15 μl 10% APS; 3 μl TEMED und 2,3 ml Aqua bidest besteht. Das darunterliegende Trenngel setzt sich folgendermaßen zusammen: 1,75 ml Tris-HCl (1 M), (pH 8,8);

1,25 ml Acrylamid 40 %; 50 μ l 10 % SDS; 25 μ l 10 % APS; 12,5 μ l TEMED und 2,0 ml Aqua bidest. Da das Sammelgel einen anderen pH als das darunter liegende Trenngel aufweist, kommt es zu einer Ankonzentrierung der Proteinproben im Sammelgel und so zu schärferen Banden im Trenngel. Bevor die Proteinproben auf das Polyacrylamidgel aufgetragen werden, werden sie mit 5x SDS-Gelladepuffer versetzt, für 5 min aufgekocht (99 °C) und anschließend kurz auf Eis abgekühlt. Um die Proteingröße später abschätzen zu können, wird ein Größenstandard („Precision Plus Protein All Blue Standard“, Biorad) eingesetzt. Die Elektrophorese wird bei 100 V in einer mit 1x Elektrodenpuffer gefüllten Gelelektrophoresekammer durchgeführt. Sobald die Lauffront die Unterkante des Trenngels erreicht hat, wird die Elektrophorese beendet, und das Sammelgel von dem Trenngel getrennt. Das Gel kann nun für eine Immunoblot-Analyse (Western Blotting) verwendet werden.

Blotten der Proteine auf eine Nylonmembran

Bei diesem Vorgang werden die Proteine, die sich aufgetrennt im Gel befinden, auf eine Nylonmembran transferiert, auf der die anschließende Antikörperreaktion stattfindet. Das sogenannte „Blotsandwich“ wird wie folgt zusammengesetzt: Als erstes werden drei dem Gel gleich große Whatmanfilterpapiere, getränkt in Transferpuffer, auf den unteren Teil des Sandwiches, der mit einem in Transferpuffer getränktem Schwamm bedeckt ist, gelegt. Auf die Filterpapiere wird die Nylonmembran (Amersham) gelegt, die zuvor kurz in Aqua bidest aktiviert und dann in Transferpuffer äquilibriert wurde. Auf die Membran wird das Gel platziert, und auf das Gel werden wiederum drei in Transferpuffer getränkte Whatmanfilterpapiere platziert, gefolgt von dem abschließenden, ebenfalls in Transferpuffer getränktem, Schwamm. Das so zusammengesetzte Blotsandwich wird verschlossen und in die Blottingapparatur eingespannt. Dabei ist zu beachten, dass die Membran zur Anode und das Gel zur Kathode zeigt. Die Blottingapparatur wird mit 1x Transferpuffer gefüllt und unter einen Stromfluss von 100 V für 1 Std. gesetzt, wodurch die Proteine von der Kathode zur Anode und somit aus dem Gel in die Membran transferiert werden. Im Anschluss an den Proteintransfer wird die Apparatur geöffnet, das Blotsandwich abgebaut und die Membran kurz in TBST gewaschen.

Antikörperreaktion und ECL-Detektion

Die in der Membran fixierten Proteine können nun mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen werden. Bevor man die Membran mit dem ersten Antikörper gegen das nachzuweisende Protein inkubiert, müssen zunächst die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran abgesättigt werden, was durch die Inkubation der Membran mit 5 % Milchpulver in TBST für 3 Std. bei RT erreicht wird. Danach erfolgt die Inkubation mit dem ersten Antikörper, der in TBST verdünnt wurde, ÜN bei 4 °C. Am nächsten Tag wird die

Membran mehrmals in TBST gewaschen (2x 30 sec; 1x 15 min, 2x 5 min), und anschließend mit dem sekundären Antikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist, inkubiert. Der sekundäre Antikörper wird ebenfalls in TBST verdünnt. Nach dieser Inkubation wird die Membran erneut in TBST gewaschen (2x 30 sec, 1x 15 min, 4x 5 min). Danach lässt man die Membran abtropfen und benetzt sie mit frisch hergestelltem ECL-Detektionsreagenz. Anschließend lässt man die Membran wiederum gut abtropfen und platziert sie in einer Entwicklerkassette. Über die feuchte Membran wird Frischhaltefolie gelegt und darauf in der Dunkelkammer der Film gelegt. Man startet mit einer Entwicklungszeit von 30 sec und kalkuliert dann verschiedene Zeiten, um die Antikörperreaktion vollständig zu ermitteln und sichtbar zu machen. Die Filme werden in der Dunkelkammer bei Rotlicht in eine Entwicklermaschine gegeben und dort entwickelt und fixiert. Die Membran eines solchen Westernblotes kann im Anschluss an das Experiment mit einer Ponceau S Rot Lösung 1 min angefärbt werden. Durch eine Differenzierung mit Wasser erscheinen alle Proteine in roten Banden. Durch diese Anfärbung der Proteine kann man die Menge und Verteilung aufgetragener Proteine quantitativ und qualitativ beurteilen.

3.10.5 Koimmunpräzipitation (Zellkultur und Embryo)

Um auf biochemische Weise zu zeigen, dass zwei Proteine miteinander interagieren, bedient man sich der Methode der Koimmunpräzipitation. Hierbei wird eines der zwei interagierenden Proteine mittels des an die Protein A/G Sepharose gebundenen spezifischen Antikörpers aus einem Proteinextrakt herausgezogen. Alle mit diesem Protein interagierenden Proteine werden dabei mit präzipitiert und können im Anschluss an eine Aufreinigung des Präzipitats auf einem Western Blot nachgewiesen werden. Die Koimmunpräzipitation gliedert sich in mehrere Schritte, die im folgenden beschrieben werden.

Äquibrierung der Protein A/G Sepharose

Als Matrix für die Immunpräzipitation werden Protein A und G Sepharose Beads (Amersham Pharmacia Bioscience) verwendet. Für jede Koimmunpräzipitation wird ein Gemisch aus gleichen Teilen Protein A und G Sepharose verwendet. Diese werden, um das in der Lösung befindliche Ethanol zu entfernen, 3x für 20 sek. bei 8000 Upm und 4 °C mit eiskaltem Lysispuffer (in der vorliegenden Arbeit ist dies RIPA-Puffer) gewaschen und anschließend in dem gleichen Volumen an Lysispuffer aufgenommen, so dass ein sogenannter „50%iger slurry“ entsteht. Pro Koimmunpräzipitation und Absättigung der unspezifischen Bindungen müssen jeweils 50 µl des Protein A/G Sepharosegemisches hergestellt werden.

Absättigung von unspezifischen Bindungen im Proteinextrakt

Für jede Koimmunpräzipitation und die dazugehörige Negativkontrolle werden 500 μg Proteinextrakt eingesetzt. Die Proben werden mit Lysispuffer auf ein Gesamtvolumen von 500 μl aufgefüllt. Um unspezifische Bindungen des Proteinextraktes an die Protein A/G Sepharose-Matrix zu verhindern, werden die Proben 1 - 2 Std. drehend bei 4 °C mit 50 μl Protein A/G Sepharose inkubiert. Nach der Inkubation wird der Ansatz 2 min bei 3000 Upm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Hierin sollten keine Proteine mehr enthalten sein, die an die Protein A/G Sepharose-Matrix binden.

Inkubation des aufgereinigten Proteinextrakts mit dem Antikörper

Derjenige Antikörper, der den Proteinkomplex, bestehend aus mindestens zwei Proteinen aus dem Proteinextrakt „herausziehen“ soll, wird in einer Menge von 5 μg zu dem gereinigten Proteinextrakt gegeben. Während einer zweistündigen Inkubation bei 4 °C auf dem Drehrad bindet der Antikörper an das im Extrakt enthaltene Protein. Als Negativkontrolle verwendet man an Stelle des spezifischen Antikörpers normale Immunglobuline desjenigen Tieres, aus dem der spezifische Antikörper hergestellt wurde.

Kopplung des Antikörpers an die Protein A/G Sepharose-Matrix

Um den präzipitierenden Antikörper mit dem Proteinkomplex zu immobilisieren, werden 50 μl der Protein A/G Sepharose-Matrix zu dem Antikörper-Extrakt Gemisch, sowie der Negativkontrolle, gegeben. Im Verlauf einer weiteren zweistündigen Inkubation bei 4 °C auf dem Drehrad bindet die Protein A/G Sepharose-Matrix an den konstanten Teil des Antikörpers und immobilisiert so den Proteinkomplex.

Isolierung des Proteinkomplexes und Detektion des gebundenen Proteins

Immobilisiert an der Protein A/G Sepharose-Matrix kann der Antikörper mit dem gebundenen Proteinkomplex aufgereinigt werden. Hierzu werden die Ansätze 30 sek. bei 8000 Upm zentrifugiert, um die Protein A/G Sepharose-Matrix zu sedimentieren. Der Überstand wird abgenommen und die Matrix gewaschen. Die Waschschriffe sind in ihrer Anzahl flexibel. In der vorliegenden Arbeit werden die Ansätze 3x mit eiskaltem Lysispuffer und 3x mit eiskaltem PBS gewaschen. Um das im Komplex gebundene Protein nachzuweisen, trägt man die Proben auf ein Polyacrylamidgel auf und detektiert die Membran nach dem Western Blot mit demjenigen Antikörper, der das gebundene Protein nachweist.

3.10.6 GST-Präzipitation

Induktion der GST-Fusionsproteine durch IPTG

Um ein bestimmtes Protein in Bakterienkulturen zu induzieren, muss zunächst das offene Leseraster des Proteins in einen Vektor kloniert werden, der für eine solche Induktion geeignet ist. In der vorliegenden Arbeit wurde zu diesem Zweck der pGEX-5x3 Vektor verwendet. Dieser erlaubt eine Induktion der Proteinexpression von GST-Fusionsproteinen durch die Zugabe von IPTG in die Bakterienkultur. Nachdem das offene Leseraster des Proteins in den pGEX-5x3 Vektor einkloniert worden ist, wird das Plasmid in *E.coli* BL21-Zellen transformiert. Die Induktion kann in verschiedenen großen Maßstäben angesetzt werden. In der vorliegenden Arbeit werden 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit einer Kolonie des zu induzierenden GST-Fusionsproteins angeimpft und ÜN bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wird aus dieser Kultur gerade so viel entnommen, dass eine 50 ml Kultur eine OD₆₀₀ von 0,1 - 0,2 besitzt. Die Kultur wird bis zu einer OD₆₀₀ von 0,85 weiter bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Danach erfolgt die Induktion des GST-Fusionsproteins durch die Zugabe von 0,25 mM IPTG. Die Kultur wird anschließend für weitere 4 Std. bei RT schüttelnd inkubiert. Im Anschluss wird die Kultur in ein 50 ml Falcon überführt und sedimentiert (10 min, 5000 UpM, 4 °C).

Aufschluss der GST-Fusionsproteine und Bindung an Glutathionagarose

Die sedimentierten Zellen werden in 5 ml GST-Lysispuffer resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Der eigentliche Aufschluss erfolgt durch eine Ultraschallbehandlung: 1 min, 40 %; 1 min, 70 %, cycle 30; 1 min 70 %, cycle 30. Nach jedem Schritt werden die Proben kurz auf Eis abgekühlt. Durch eine Zentrifugation für 2 min bei 5000 UpM und 4 °C werden die Zelltrümmer sedimentiert und der Überstand in ein neues 15 ml Falcon überführt. Zu dem Überstand werden 500 µl eines 50%igen Glutathion-PBS Gemischs gegeben und die Probe ÜN bei 4 °C drehend inkubiert. Danach wird die Probe zentrifugiert (1 min, 5000 UpM, 4 °C) und das Pellet 4x mit eiskaltem GST-Lysispuffer und weitere 10x mit eiskaltem 1x PBS gewaschen. Am Ende wird die Glutathionagarose mit dem gebundenen GST-Fusionsprotein in dem gleichen Volumen 1x PBS aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

Kontrolle der Proteinexpression mittels Coomassieblau-Färbung

Die qualitative Abschätzung des Verlaufs einer Induktion und der Proteinexpression ist mittels eines SDS-Gels sinnvoll. Hierzu wird, wie unter 3.10.4 beschrieben, ein SDS-Gel hergestellt und jeweils 10 µl, 15 µl und 30 µl des aufgereinigten GST-Fusionsproteins mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt, aufgeköcht und auf das Gel geladen. Nach dem Elek-

trophoreselauf wird das Gel 1 Std. in Coomassieblau-Lösung geschwenkt. Anschließend werden die Proteine durch Differenzierung mit Entfärberlösung sichtbar gemacht, und schließlich wird das Gel auf einem Gelrockner 2 Std. bei 80 °C getrocknet.

3.11 Das Ras-Recruitment-System

(nach dem Cytotrap XR library Construction Kit von Stratagene)

3.11.1 Allgemeines Arbeiten mit Hefe

Allgemein ist die sprossende Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zugänglich für genetische und molekularbiologische Methoden. Sie kann gut durch fremde DNA transformiert werden, besitzt ein hoch effizientes System der homologen Rekombination und hat eine relativ hohe Wachstumsrate. Während sich *E.coli* durch eine Generationszeit von 30 bis 40 min auszeichnet, verdoppeln sich die meisten Hefestämme innerhalb von 90 bis 120 min. Genau wie *E.coli* können Hefen sowohl in Flüssigmedien, also auch auf festen Nährböden kultiviert werden. In der Bakterienzucht eingesetzte Antibiotika zeigen auf Hefe keine Auswirkung. Sterile Arbeitsbedingungen sind daher im Umgang mit Hefen besonders wichtig. Als Selektionshilfen werden in der Regel Mangelmedien verwendet, denen entsprechende Aminosäuren nicht zugegeben werden. Hefen können nur dann wachsen, wenn sie mit Hilfe aufgenommener Plasmide die entsprechenden Aminosäuren selber synthetisieren. Die optimale Wachstumstemperatur beträgt 28 - 32 °C.

Amplifizierung der Beuteplasmid-Bank

Als Beuteplasmid-Bank wird eine *Drosophila*-cDNA-Bank (Stratagene, Heidelberg) verwendet, die vor dem Interaktionsscreen amplifiziert wurde. Um alle Klone der cDNA-Bank zu berücksichtigen, werden $2,5 \times 10^6$ unabhängige Bakterienklone ausplattiert. Das Wachstum der Bakterien erfolgt bei 30 °C, so dass langsam wachsende Klone mit den normal schnell wachsenden Klonen gleichberechtigt sind und amplifiziert werden. Die Zellen werden geerntet und die Beuteplasmide isoliert.

Herstellung transformationskompetenter *cdc25H*-Hefezellen

Aus dem gefrorenen Glycerolstock werden mit Hilfe einer Impföse *cdc25H*-Hefezellen entnommen und auf einer YPAD-Agarplatte ausgestrichen. Die YPAD-Platte wird für 4 - 5 Tage bei 24 °C inkubiert, bis Kolonien zu sehen sind. Eine Einzelkolonie wird von der Platte entnommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml YPAD-Medium überführt. Die Lösung wird kurz gevortext, bis sich alle Zellklumpen gelöst haben. Anschließend werden 50 ml YPAD-Medium in einem 250 ml Erlenmeyerkolben mit der Zellsuspension angeimpft und für 1 - 17 Std. bei 24 °C in einem Schüttler inkubiert. Dabei gilt es zu beachten, dass sich die Hefekultur zu keinem Zeitpunkt über 25 °C befindet, da ansonsten

die Punktmutation im Hefegenom revertieren kann, und somit keine zuverlässigen Ergebnisse im Interaktionstest möglich sind. Nach ungefähr 15-17 Std. sollte die $OD_{600} = 1,0$ sein. In einem 1 l Erlenmeyerkolben werden 300 ml frisches YPAD-Medium mit so viel Ausgangskultur angeimpft, dass die neue Kultur eine OD_{600} von 0,2 aufweist. Diese Kultur wird für weitere 4 Std. bei 24 °C im Schüttler inkubiert, bis die OD_{600} bei 0,8 liegt. Von der Kultur werden zunächst 75 μ l abgenommen (entspricht 1×10^6 Zellen), auf einer YPAD-Platte ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert. Diese Platte dient zum Test auf Temperaturrevertanten. Auf ihr sollten nach 5 Tagen nicht mehr als 30 Kolonien gewachsen sein, da sonst die Revertantenrate der Hefekultur zu hoch ist, und die kompetenten Hefezellen verworfen werden müssen. Die restliche Hefekultur wird auf 6 50 ml Falcons verteilt und bei 3000 UpM, 18 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in insgesamt 50 ml Aqua bidest gelöst. Diese Suspension wird erneut zentrifugiert (3000 UpM, 18 °C, 10 min) und das Pellet in 50 ml LiSORB resuspendiert. Es folgt eine Inkubation der Lösung für 30 min bei RT. Währenddessen werden 400 μ l Heringssperma-DNA aufgekocht (95 °C, 10 min) und anschließend mit 600 μ l LiSORB versetzt und gut gemischt. Nach der Inkubation für 30 min bei RT werden die Hefezellen sedimentiert (3000 UpM, 18 °C, 5 min) und das Pellet in 300 μ l LiSORB aufgenommen. Zu der Hefezellsuspension werden 600 μ l des auf RT abgekühlten Heringssperma-DNA-Gemisches gegeben und beides durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt. Nachdem 5,4 ml PEG/LiOAc und 530 μ l DMSO zu den Zellen gegeben wurde, wird die Suspension gut gemischt, und die Hefezellen können in 1,5 ml Reaktionsgefäßen zu je 200 μ l aliquotiert und bei -80 °C eingefroren werden.

Transformation von Hefezellen

Generell ist es möglich die Hefezellen mit ein oder zwei Plasmiden (Kotransformation) zu transformieren. Eine Kotransformation wird bei zwei Plasmiden empfohlen, da dadurch die Anzahl der Generationen bis zu dem eigentlichen Interaktionstest vermindert, und das Vorkommen von *cdc25H*-Revertanten verringert wird. Die kompetenten Hefezellen werden auf Eis aufgetaut. Jeweils 100 μ l Hefezellen und 300 ng der zu transformierenden Plasmid-DNA werden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Zu jedem Ansatz werden 2 μ l 1:10 verdünntes 1,4 M β -Mercapthoethanol gegeben und gut gemischt. Die Transformationsansätze werden für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgt ein 20minütiger Hitzeschock bei 42 °C und das Abkühlen der Ansätze für 3 min auf Eis. Danach werden die Zellen sedimentiert (13000 UpM, 10 sek) und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 180 μ l 1 M Sorbitol resuspendiert, und der gesamte Ansatz auf je einer SD/Glukose (-UL) Agarplatte ausplattiert. Nachdem die Platten getrocknet sind, werden sie für 4-5 Tage bei 24 °C inkubiert, bis die ersten Hefekolonien, die das entsprechende Plasmid, bzw. die entsprechenden Plasmide, aufgenommen haben, gut sichtbar sind.

Test der Köderproteine auf Autoaktivierung

Bevor das Köderprotein in dem Interaktionsscreen eingesetzt werden kann, muss die Autoaktivierung der Ras-Kaskade durch das Ras-Köderprotein ausgeschlossen werden. Hierzu wird das Ras-Köderplasmid mit dem leeren pMyr-Vektor in Hefen transformiert, wodurch ein Wachstum auf SD/Glukose (-UL) Agarplatten bei 37 °C ausgeschlossen werden soll (keine Autoaktivierung der Ras-Kaskade). Zusätzlich werden jeweils 2 Positivkontrollen und 2 Negativkontrollen in Hefen transformiert. Als Positivkontrollen werden pSOS-Armadillo mit pMyr-Cadherin (Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen ist nachgewiesen), und das Ras-Köderplasmid mit pMyrSB (kodiert für ein Sos-bindendes Protein) transformiert, und Wachstum auf SD/Glukose (-UL) Agarplatten bei 37 °C nachgewiesen. Als Negativkontrollen werden pMyr und pADNS-RRS-mut ohne Protein, sowie pMyr-LaminC (interagiert nicht mit dem Köderprotein) und pADNS-RRS-mut in Hefen transformiert und ein Wachstum auf SD/Glukose (-UL) Agarplatten bei 37 °C ausgeschlossen.

Transformation von Hefezellen mit der embryonalen *Drosophila* cDNA-Bank und dem Ködervektor

10 ml transformationskompetenter Hefezellen werden wie oben beschrieben hergestellt. Da es bei der Transformation der cDNA-Bank und dem Ködervektor auf eine möglichst hohe Transformationseffizienz ankommt, werden die kompetenten Hefezellen nicht bei -80 °C eingefroren, sondern direkt im Anschluss transformiert. Zu den 10 ml kompetenten Hefezellen werden 200 μ l 1:10 verdünntes 1,4 M β -Mercapthoethanol, 100 μ g Köderplasmid und 100 μ g cDNA-Bank gegeben. Als Negativkontrolle werden zu 500 μ l kompetenten Hefezellen 1:10 verdünntes 1,4 M β -Mercapthoethanol, 2 μ g des pADNS-RRS-mut-Vektors und 2 μ g der cDNA-Bank gegeben. Mit Hilfe dieses Ansatzes kann zusätzlich die Transformationseffizienz ermittelt werden. Der 10 ml Ansatz wird auf 20 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt und 30 min bei RT inkubiert. Es folgt ein 20minütiger Hitzeschock bei 42 °C und kurzes Abkühlen auf Eis. Die Zellen werden sedimentiert (13000 UpM, RT, 10 sek), der Überstand verworfen, und das Pellet in 500 μ l 1 M Sorbitol resuspendiert. Der gesamte Ansatz wird jeweils mittels Glasperlen auf einer SD/Glukose (-UL) Agarplatte verteilt. Aus dem 500 μ l Kontrollansatz, der gleichzeitig zur Bestimmung der Transformationseffizienz dient, werden jeweils 10 μ l, 100 μ l und der restliche Ansatz auf einzelne SD/Glukose (-UL) Agarplatten ausgestrichen. Nach dem Trocknen der Platten werden sie bei 24 °C für 2-4 Tage inkubiert. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz zählt man die Kolonien auf den beiden Kontrollplatten und setzt die Zahl in folgende Formel ein:

$$\frac{\text{Anzahl Kolonien} * \text{Suspensionsvolumen [500 } \mu\text{l]}}{\text{ausplattiertes Volumen [10 bzw. 100 } \mu\text{l]}} * \text{transformierte DNA [2 } \mu\text{g]}$$

= kolonieformende Einheiten pro μg DNA (Transformationseffizienz)

Die Transformationseffizienz sollte mindestens 8000 kolonieformende Einheiten pro μg betragen.

Durchmusterung der cDNA-Bank auf potentiell positive Interaktionspartner

Nach 2-4 Tagen Inkubation der transformierten Hefezellen bei 24 °C erkennt man auf den SD/Glukose (-UL) Agarplatten kleine weiße Kolonien. Diese können nun auf eine SD/Galaktose (-UL) Agarplatte überimpft werden. Für das Überimpfen werden runde, autoklavierte 150 mm Whatmanfilter auf die SD/Glukose (-UL) Agarplatten gelegt und leicht angedrückt. Sobald der Whatmanfilter feucht ist, wird er abgezogen und auf die SD/Galaktose (-UL) Agarplatten gelegt und wiederum leicht angedrückt. Der Filter wird anschließend wieder abgezogen und verworfen. Die SD/Galaktose (-UL) Platten werden bei 37 °C inkubiert, so dass Selektionsdruck herrscht. Es können nur die Kolonien wachsen, bei denen eine Interaktion zwischen Köder- und Beuteprotein stattfindet. Nach etwa 5-7 Tagen Inkubation bei 37 °C kann man deutlich zwischen gewachsenen großen (potentiell positiv) und klein gebliebenen Kolonien unterscheiden. Die potentiell positiven Klone werden nun auf eine SD/Glukose (-UL)- und eine SD/Galaktose (-UL)-Masterplatte überimpft. Hierzu werden die potentiell positiven Klone mittels eines Zahnstochers gepickt und in 25 μl Aqua bidest resuspendiert. Von dieser Suspension werden jeweils 2,5 μl auf jeder Masterplatte gespottet. Die Masterplatten werden für weitere 5-7 Tage bei 37 °C inkubiert. Nur bei den Klonen, bei denen Wachstum auf SD/Galaktose (-UL) und kein Wachstum auf SD/Glukose (-UL) beobachtet werden kann, wird eine Plasmidpräparation vorgenommen.

Plasmidpräparation aus Hefe

Zur Isolierung der cDNA-Plasmide werden 7 ml SD/Glukose (-UL) Medium mit einem potentiell positiven Klon von der Masterplatte angeimpft. Die Kulturen werden für 2 Tage bei 24 °C und 240 UpM in einem Schüttler inkubiert. Anschließend werden sie in ein 2,5 ml Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert (10 sek, RT, 13000 UpM). Der Überstand wird verworfen und das Pellet in dem restlichen Volumen resuspendiert. Im Anschluss werden 200 μl Plasmid-Rettungslösung zugegeben und der Ansatz gut gemischt. Zu dieser Suspension fügt man 100 μl Phenol, 100 μl 24:1 Chloroform: Isoamylalkohol und 0,3 g sauer gewaschene Glaskügelchen (0,5 mm) hinzu. Die Lösung wird

Plasmide		SD Glukose (-UL) (25 °C)	SD Glukose (-UL) (37 °C)	SD Galaktose (-UL) (37 °C)
pSOS-Cad + pMyr-Arm	A	+	-	+
pMyr + pADNS-RRS-mut	B	+	-	-
pADNS-Wech-NHL+ pMry-cDNA	C	+	-	+
pADNS-RRS-mut + pMyr-cDNA	D	+	-	-

Tab. 3.3: (nach CytoTrap XR Library Construction Kit, Stratagene). Ansatz A dient als Positivkontrolle und Ansatz B als Negativkontrolle. Ansatz C ist der eigentliche Interaktionstest, und Ansatz D dient als Kontrolle, um Interaktion des Beuteproteins mit pADNS-RRS-mut auszuschließen. Wachstum (+) auf Galaktose und kein Wachstum (-) auf Glukose bei 37°C bestätigen den putativ positiven Klon, wenn die Negativkontrolle negativ und die Positivkontrolle positiv ausfällt.

für 2 min gut gevortext, so dass die Hefezellen durch die mechanische Beanspruchung aufbrechen. Dadurch wird die Plasmid-DNA von der an den Glasperlen haftenden chromosomalen DNA getrennt. Nach dem vortexen wird die Probe zentrifugiert (5 min, RT, 13000 UpM), so dass sich anschließend die Plasmid-DNA in der oberen, wässrigen Phase befindet. Von dieser Phase werden 200 µl in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die darin enthaltene Plasmid-DNA wird mit 20 µl Natriumacetat und 440 µl 100%igem Ethanol gefällt (30 min, 4 °C, 13000 UpM), anschließend mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen (10 min, RT, 13000 UpM) und in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet. Die DNA wird in 5 µl Aqua bidest gelöst, und steht nun zur Transformation durch Elektroporation in elektrokompente *E.coli*-Zellen bereit. Im Anschluss an die Transformation werden die Zellen zur Selektion der pMyr-cDNA-Plasmide auf LB-Chloramphenikol-Agarplatten ausgestrichen. Diese werden ÜN bei 37 °C inkubiert. Aus den gewachsenen Kolonien wird die Plasmid-DNA durch eine Minipräparation gewonnen und anschließend ein analytischer Restriktionsverdau durchgeführt.

Bestätigung der Interaktion zwischen Köder- und Beuteplasmid

Um die Interaktion zwischen dem potentiell positiven Interaktionspartner und dem Köderplasmid (Wech-NHL) zu bestätigen, werden die Plasmide erneut in Hefen kotransformiert. Zusätzlich werden Positivkontrollen, Negativkontrollen und ein Autoaktivierungstest transformiert. Es werden somit folgende Transformationen durchgeführt:

Für den Retest werden jeweils 100 ng Köderplasmid (pADNS-Wech-NHL) und 100 ng der pMyr-Plasmid-DNA von den potentiell positiven Klonen nach dem oben beschriebenen Protokoll kotransformiert. Die Transformationsansätze werden auf SD/Glukose (-UL) Platten ausgestrichen und für 4 Tage bei 25 °C inkubiert. Anschließend werden von

jedem Ansatz, sowie der Positiv- und Negativkontrolle drei Kolonien gepickt, und jeweils in 25 μl Aqua bidest resuspendiert. Von den Suspensionen werden dann immer 2,5 μl auf einer SD/Glukose (-UL) und einer SD/Galaktose (-UL) Platte gespottet und diese bei 37 °C inkubiert. Als positive Interaktionskandidaten werden nur die Klone gewertet, die bei 37 °C auf Galaktose, nicht aber auf Glukose wachsen. Um die Autoaktivierung des möglichen Interaktionspartners mit dem pADNS-RRS-Protein auszuschließen, so dass die Rettung des Phänotyps nicht auf der Interaktion mit dem Köderprotein beruht, wird jeder Kandidat zur Autoaktivierungskontrolle nur mit dem pADNS-RRS-mut-Vektor in Hefen kotransformiert und, wie oben beschrieben, auf den entsprechenden Platten und Temperaturen inkubiert. Damit soll ein Wachstum bei 37 °C auf Galaktose ausgeschlossen werden.

3.12 Arbeiten mit der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*

3.12.1 Fliegenhaltung

Zur Haltung und Zucht der verschiedenen *Drosophila*-Stämme werden Standardmethoden verwendet (Roberts et al. 1986).

3.12.2 Fixierung von *Drosophila*-Embryonen

Dechorionierung von *Drosophila*-Embryonen

Tote Fliegen und die restliche Hefe werden von den Apfelsaftagarplatten entfernt und Wasser auf die Platten gegeben. Die Embryonen werden mit Hilfe eines Pinsels von dem Agar gelöst, in ein Siebchen überführt und nochmals gut mit Wasser abgespült. Nun wird die Chorionhülle der Embryonen durch eine 3minütige Inkubation in 4%igem Natriumhypochlorid entfernt. Während dieser Inkubation wird das Natriumhypochlorid mehrmals durch das Siebchen pipettiert. Nach der Dechorionierung werden die Embryonen abermals mit Wasser abgespült, um auch das restliche Natriumhypochlorid zu entfernen.

Chemische Fixierung

Die zuvor dechorionierten Embryonen werden in ein mit 4 ml Heptan gefülltes Fixiergläschen überführt. Zu den in Heptan befindlichen Embryonen werden 4 ml 4%iges Paraformaldehyd gegeben, und die Embryonen für 20 min auf dem Schüttler in diesem 2-Phasen-Gemisch bei höchster Stufe geschüttelt. Alternativ werden 4 ml 37%iges Formaldehyd zu den Embryonen gegeben, und diese für 5 min auf dem Schüttler inkubiert. In

dieser Zeit werden die Embryonen fixiert. Nach der Fixierung sammeln sich die Embryonen in der Interphase. Die untere, paraformaldehydhaltige (formaldehydhaltige) Phase wird mit einer Pasteurpipette abgenommen. Zu den Embryonen werden 5 ml Methanol gegeben und anschließend für 30 sek. gevortext. Hierbei wird die Vitellinmembran der Embryonen entfernt. Die fixierten Embryonen sammeln sich anschließend am Boden. Die zwei Phasen werden abgenommen und frisches Methanol zu den Embryonen gegeben. Diese können im Anschluss in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert werden.

Ethanol-Fixierung

Diese Fixierung wird vorgenommen, wenn das Aktinzytoskelett erhalten bleiben soll. Dazu werden die Embryonen, wie bei der chemischen Fixierung, mit Formaldehyd oder Paraformaldehyd fixiert. Zur Ablösung der Vitellinmembran verwendet man hier anstelle des Methanols 6 ml eiskaltes 90%iges Ethanol. Die Embryonen werden in diesem Gemisch für 1 min geschüttelt (nicht gevortext). Anschließend sammeln sich die fixierten Embryonen am Boden, können mit eiskaltem Ethanol gewaschen, und im Anschluss in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert werden.

Hitze-fixierung

Die dechorionierten Embryonen werden in ein 50 ml Falcon mit 10 ml Triton-Natriumchlorid-Lösung gegeben, die zuvor im Wasserbad auf 95 °C erwärmt wurde. Das Falcon mit den Embryonen wird für etwa 5 sek. in dem Wasserbad inkubiert und danach sofort für 10 sek. gevortext. Zu den 10 ml Triton-Natriumchlorid-Lösung werden 40 ml eiskalte Triton-Natriumchlorid-Lösung gegeben und das Falcon für 2 min auf Eis gehalten. Die Embryonen sinken zu Boden und der Überstand wird vollständig abgenommen. Anschließend werden die Embryonen mit einem Pinsel in ein mit 4 ml Heptan gefülltes Fixiergläschen überführt. Nach Zugabe von 4 ml einer Methanol/EGTA-Lösung werden die Embryonen für 30 sek. gevortext. Auch hier sind, wie bei der chemischen Fixierung, nur die Embryonen fixiert, die nach dem Vortexen und der Bildung der zwei Phasen sich auf dem Boden des Gefäßes befinden. Der Überstand wird vollständig abgenommen, die Embryonen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und noch zweimal mit der Methanol/EGTA-Lösung gewaschen. Die Embryonen können bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C in Methanol gelagert werden.

3.12.3 Antikörperfärbung an *Drosophila*-Embryonen

Durch eine Antikörperfärbung ist es möglich, ein Protein im mikroskopischen Bild sichtbar zu machen. Sie läuft nach folgendem Grundprinzip ab: Ein Antikörper reagiert mit

seinem Antigen, ein Bereich in dem Zielprotein, welcher Epitop genannt wird. Hierbei unterscheidet man monoklonale von polyklonalen Antikörpern. Monoklonale Antikörper sind nur gegen ein einziges Epitop im Zielprotein gerichtet, wogegen polyklonale Antikörper mehrere Epitope innerhalb eines Proteins binden. Um die Antikörper-Antigen-Reaktion sichtbar zu machen, benötigt man ein Signal an einem Antikörper. Eine Verstärkung des Signals erreicht man, wenn man es an einen zweiten Antikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist, koppelt. Der erste Antikörper bietet in diesem Fall wiederum Epitope für den zweiten Antikörper, so dass dieser spezifisch an den ersten bindet. Um den zweiten Antikörper sichtbar zu machen, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Entweder ist der Antikörper mit einem fluoreszierenden chromophoren Anteil gekoppelt, der unter einem Fluoreszenzmikroskop durch die Anregung von Licht- oder Laserenergie sichtbar gemacht werden kann, oder die Markierung des zweiten Antikörpers besteht aus einem Enzym, dass durch die Umsetzung eines Substrates einen Farbniederschlag auslöst, der im Hellfeld eines Lichtmikroskops zu sehen ist.

Fluoreszente Antikörperfärbung an gesamten *Drosophila* Embryonen

Bevor mit der eigentlichen Färbung begonnen werden kann, müssen die fixierten Embryonen von Methanol in PBT überführt werden. Hierzu werden die Embryonen jeweils für 5 min drehend mit den folgenden Lösungen inkubiert: 1. Methanol:PBT = 95:5; 2. Methanol:PBT = 60:40; 3. Methanol:PBT = 40:60; 4. Methanol:PBT = 20:80. Nach jedem Waschschrift müssen die Embryonen zuerst in dem 1,5 ml Reaktionsgefäß abgesunken sein, bevor der Überstand abgenommen und die neue Waschlösung zugegeben werden kann. Nach der Überführung der Embryonen von Methanol in PBT folgen vier 10minütige Waschschriffe mit PBT. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen werden die Embryonen anschließend noch zwei Mal für 20 min mit PBTN inkubiert. Der erste Antikörper wird, entsprechend in PBTN verdünnt, zu den Embryonen gegeben, und diese ÜN bei 4 °C drehend inkubiert. Um den ungebundenen und unspezifisch gebundenen Primärantikörper zu entfernen, schließen sich am nächsten Tag vier Waschschriffe mit PBT an. Um nun wiederum unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, folgen zwei Waschschriffe mit PBTN. Im Anschluss werden die Embryonen 2 Std. bei RT mit dem fluoreszenzmarkierten, sekundären Antikörper in der entsprechenden Verdünnung in PBTN inkubiert. Wichtig hierbei ist, dass ab diesem Schritt sämtliche Ansätze dunkel gehalten werden, so dass die Fluoreszenzwirkung nicht zerstört wird. Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper werden die Embryonen 6x 20 min mit PBT gewaschen, wodurch nicht gebundener Sekundärantikörper entfernt wird. Die Embryonen werden nun in Gelmount auf einem Objektträger eingebettet und mit einem Deckglas abgedeckt.

Chemische Antikörperfärbung an gesamten *Drosophila* Embryonen

Nachdem die Embryonen, wie bei der fluoreszenten Antikörperfärbung beschrieben, in PBT überführt worden sind, werden sie 4x mit PBT gewaschen, und anschließend 20 min in PBTN inkubiert, wodurch unspezifische Bindungsstellen abgesättigt werden. Der erste Antikörper wird, entsprechend in PBTN verdünnt, zu den Embryonen gegeben, und diese ÜN bei 4°C drehend inkubiert. Am nächsten Tag wird der primäre Antikörper durch 4x 10minütiges Waschen mit PBT entfernt. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, folgen zwei Wachschriffe mit PBTN. Im Anschluss werden die Embryonen für 2 Std. bei RT mit dem zu dem primären passenden sekundären biotinylierten Antikörper inkubiert. Dieser wird anschließend durch 4x 10minütiges Waschen entfernt. Es folgt eine weitere Inkubation durch die Zugabe eines Komplexes aus Avidin / biotinylierter Meerrettich-Peroxidase („Vectastain ABC-Kit“, Vector Laboratories, Burlingame, USA) für 30 min. Im Anschluss werden die Embryonen 5x 5 min mit PBT gewaschen. Die endgültige Färbung erfolgt danach in 500 µl Färbelösung (je eine Tablette des Sigma Fast™ 3,3'-Diaminobenzidine Sets (DAB Peroxidase Substrat) werden in 1 ml A.bidest gelöst) und wird, nachdem man sie unter einer Stereolupe verfolgt hat, durch zweimaliges Waschen mit PBT gestoppt. Die Embryonen werden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut 2x mit PBT gewaschen. Um die Embryonen zu dehydrieren, werden sie jeweils 5 min mit 30%igem, 50%igem, 70%igem und zuletzt zweimal 100%igem Ethanol gewaschen. Um die Embryonen unter dem Lichtmikroskop genauer analysieren zu können, werden sie in Kanadabalsam auf einem Objektträger eingebettet.

3.12.4 *In-situ* Hybridisierung an *Drosophila* Embryonen

Die *in-situ* Hybridisierung erlaubt eine Aussage über die tatsächliche Verteilung einer mRNA eines bestimmten Gens. Hierbei synthetisiert man ein komplementäres Gegenstück zu der endogenen mRNA, das sich an die endogene mRNA anlagert und durch eine eingebaute Markierung sichtbar gemacht werden kann. So einen markierten, komplementären „antisense“ Strang bezeichnet man als *in-situ* Sonde.

Herstellung einer DIG-markierten *in-situ* Sonde

Das Gen, zu deren mRNA eine DIG-markierte Sonde hergestellt werden soll, muss sich in einem Plasmid befinden, das einen SP6, T3 oder T7 Promotor enthält. Bei den hier verwendeten Vektoren (pScript und pSP64) befindet sich sowohl am 5'-Ende als auch am 3'-Ende des inklonierten Fragments ein solcher Promotor, so dass das Gen von beiden Richtungen aus abgelesen werden kann. Bevor mit der Herstellung der DIG-markierten Sonde begonnen werden kann, muss der Vektor durch einen Restriktionsverdau linearisiert werden, so dass das inklonierte Gen gegenläufig abgelesen werden kann. Der

linearisierte und aufgereinigte Vektor kann dann als Matrizen-DNA in einem Reaktionsansatz eingesetzt werden. Damit die DIG-markierte Sonde in ausreichender Menge vorliegt, werden 1 μg des linearisierten Vektors, 2 μl des Reaktionspuffers, 2 μl des DIG-oxygenin RNA labeling Mix, 2 μl der entsprechenden Polymerase (T3, T7 oder SP6) und 1 μl RNase-Inhibitor auf Eis zusammenpipettiert. Der Ansatz wird anschließend mit DEPC behandeltem Aqua bidest. auf 20 μl aufgefüllt und für 2 Std. bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit erfolgt die RNA-Synthese des Gegenstranges, der durch den Einbau von DIGoxygenin-UTP markiert wird. Bei der Herstellung eines Transkripts, das länger als 1 kb ist, wird die synthetisierte Sonde durch Zugabe von Carbonatpuffer in kleinere Fragmente gespalten. Dadurch erleichtert sich die Anlagerung an die RNA der Zelle. Der Verdau mit dem Carbonatpuffer erfolgt bei 65 °C für 40 min. Im Anschluss werden folgende Lösungen zu der Probe gegeben: 15 μl Stopplösung, 10 μl 4 M Lithiumchlorid, 10 μl 10 mg/ml Phenol/Chloroform-extrahierter tRNA, und 300 μl 100%iges Ethanol. Der Ansatz wird für 30 min bei -20 °C eingefroren und dann für weitere 30 min bei 13000 UpM und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das erhaltene Pellet mit 300 μl 70%igem Ethanol für 10 min bei 13000 UpM und 4 °C gewaschen. Das Pellet wird im Anschluss getrocknet und in 50 μl Hybe-Puffer resuspendiert. Die Sonde kann so bei -20 °C gelagert werden.

Chemische *in-situ* Hybridisierung an gesamten *Drosophila* Embryonen

Die mit 4% Paraformaldehyd fixierten Embryonen werden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und von Methanol in PFA überführt. Hierzu werden sie 2x mit Methanol, 1x mit Methanol:PFA = 3:1, und 1x mit Methanol:PFA 1:3 für jeweils 5 min bei RT auf dem Drehrad gewaschen. Im Anschluss werden die Embryonen in 500 μl 4%igem Paraformaldehyd für 10 min bei RT drehend inkubiert. Es folgen 3 Waschschrte für jeweils 2 min mit PBT um das restliche Paraformaldehyd zu entfernen. Anschließend werden die Embryonen 4x 10 min mit PBT bei RT drehend inkubiert. Um die in Hybe gelöste DIG-markierte Sonde zu den Embryonen geben zu können, müssen diese zuvor von PBT in Hybe (ohne Dextransulfat) überführt werden. Dies geschieht durch Waschen mit Hybe (ohne Dextransulfat)/PBT (1:1) und Hybe (ohne Dextransulfat) für jeweils 2 min bei RT auf dem Drehrad. Danach folgt die Vorhybridisierung der Embryonen in 200 μl Hybe (ohne Dextransulfat) bei RT für mindestens eine Stunde. In dieser Zeit wird die DIG-markierte Sonde bei 95 °C für 10 min denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Nach der Vorhybridisierung wird die Sonde in entsprechender Konzentration mit 30 μl Hybe (mit Dextransulfat) zu den Embryonen gegeben und ÜN bei 60 °C im Wasserbad inkubiert. Am nächsten Tag werden die Embryonen 2x 10 min bei 60 °C, und anschließend 6x 15 min mit auf 60 °C vorgewärmten Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss daran werden die Embryonen in PBT überführt und dort 2x 5 min,

gefolgt von einer 30minütigen Inkubation, bei RT gewaschen. Es folgt für 2 Std. die Inkubation mit dem anti-DIG-Alkalische-Phosphatase-Antikörperkonjugat, das gegen die eingebaute DIG-Markierung gerichtet ist. Nach dieser zweistündigen Inkubation wird der ungebundene Antikörper durch sechs 10minütige Waschschriffe mit PBT entfernt. Der Ansatz wird anschließend 2x für jeweils 2 min mit AP-Puffer gewaschen. Danach gibt man 500 μl AP-Puffer mit 10 μl Färbelösung (NBT/BCIP, Roche) zu den Embryonen, überführt sie in ein Mikroskopierschälchen und beobachtet die Farbreaktion unter der Stereolupe. Zeigen die Embryonen die gewünschte Färbung, wird die Farbreaktion durch Abnahme der Färbelösung und Zugabe von PBT abgestoppt. Die Embryonen werden noch zwei weitere Male für jeweils 10 min in PBT gewaschen, bevor sie, wie bei der chemischen Antikörperfärbung beschrieben, durch eine Ethanolreihe dehydriert werden. Die Embryonen werden im Anschluss in Kanadabalsam auf einem Objektträger eingedeckelt.

Kutikulapräparation

Die Kutikula stellt das Außenskelett von Insekten und somit auch von *Drosophila melanogaster* dar. Es schützt und formt den Körper. Die Kutikula besteht aus faserigen Material, Chitinfibrillen und Proteinkomponenten, die die Fasern untereinander verbinden. Während der Embryogenese wird die Kutikula von der äußeren epithelialen Schicht an Zellen sezerniert. Aufgrund entwicklungsspezifischer Defekte kann sich die Kutikula durch Nekrose braun färben. Anhand anschließender Kutikulapräparation lassen sich phänotypische Gendefekte beschreiben.

Um Phänotypen bei der Kutikula von *Drosophila melanogaster* erkennen zu können, lässt man die Embryonen bei 25 °C fortwährend altern und entfernt die sich entwickelnden Larven mit Hilfe einer Pinzette. Für die Kutikulapräparation eignen sich die braunen Embryonen. Sie werden dechorioniert und mit Aqua bidest gut abgespült. Die Embryonen werden auf einen Objektträger überführt, auf den zuvor zwei Tropfen Hoyer's Medium gegeben wurden. Das Hoyer's Medium wird mit zwei Tropfen Milchsäure vermischt, und die Embryonen innerhalb dieses Gemischs mit einem Deckglas abgedeckt. Der Objektträger wird für 24-48 Std. bei 65 °C inkubiert. In dieser Zeit lösen sich die inneren Organe der Embryonen auf und die reine Kutikula ist im Lichtmikroskop zu erkennen. Um einen besonders starken Kontrast zwischen den Zähnchenreihen und der sogenannten nackten Kutikula zu erzielen, empfiehlt es sich die Dunkelfeldmikroskopie anzuwenden.

3.12.5 *Drosophila* Kreuzungsexperimente

Einem Großteil der Experimente mit *Drosophila melanogaster* gehen Kreuzungen verschiedener Fliegenstämme voraus. Hierbei ist zu beachten, dass immer Jungfrauen des einen Stammes mit Männchen des anderen Stammes gekreuzt werden, um einen definierten Genotyp zu erhalten. Die Identifikation einer *Drosophila* Jungfrau erfolgt generell

über die Zeit, in der ein frisch geschlüpftes Weibchen nicht kopulieren kann. Hält man die Fliegen bei 18 °C, kann man die Weibchen aus einem zuvor adultlosen Röhrchen bis zu 18 Std. später isolieren. Hält man die Fliegen dagegen bei 25 °C, bleiben die Weibchen nur bis zu 4 Std. jungfräulich. Um eine zu schnelle Entwicklung der Jungfrauen zu verhindern, werden sie in einem Röhrchen bei 18 °C gehalten.

3.12.6 Das GAL4-UAS System in *Drosophila melanogaster*

Das GAL4-UAS System ermöglicht es, beliebige Gene nach einem definierten räumlichen und zeitlichen Muster zu exprimieren (Brand und Perrimon, 1993). Dieses System basiert auf der Wirkung des GAL4-Transkriptionsfaktors aus der Hefe, für den in *Drosophila* normalerweise keine DNA-Bindungssequenz vorliegt. In der Hefe bindet er an UAS-Elemente (upstream activating sequences) und vermittelt so die Transkription des dem UAS-Element nachgeschalteten Gens. Als Ausgangsmaterial für das GAL4-UAS-System benötigt man bei *Drosophila* daher zwei Fliegenstämme, den Effektor- und den Treiberstamm, die miteinander gekreuzt werden müssen. Der Effektorstamm trägt durch Injektion eines so genannten UAS-Konstrukts, welches in das Fliegen-genom inseriert hat, vor einem ausgewählten offenen Leseraster mehrere UAS-Bindungsstellen für das GAL4-Protein. Ein solches UAS-Konstrukt wird durch Einklonierung des offenen Leserasters in den pUAST-Vektor hergestellt. Der Treiberstamm wurde durch die Transformation von Vektoren gewonnen, die einen charakteristischen fliegen-eigenen Enhancer vor der GAL4-Sequenz tragen. Kreuzt man Effektor- und Treiberstamm, kommt es in der F1-Generation zu Individuen, die in Abhängigkeit des Enhancers das dem UAS-Elementen nachgeschaltete Gen exprimieren. Dadurch, dass die GAL4-Bindeproteine nur dort exprimiert werden, wo normalerweise das dem Enhancer nachgeschaltete Gen exprimiert wird, wird auch nur in diesem Gewebe das Zielgen durch die GAL4-Bindung an die UAS-Bindestellen exprimiert.

3.12.7 P-Element vermittelte Keimbahntransformation in *Drosophila melanogaster*

P-Elemente sind die wichtigsten mobilen genetischen Elemente in *Drosophila*, die methodisch nutzbar gemacht werden konnten. P-Elemente sind 2,9 kb lang und tragen an den Enden eine invertierte Wiederholungssequenz von 31 bp. Sie kodieren für eine Transposase, welche die Mobilisierung und den Wiedereinbau der P-Elemente im Genom katalysiert. Diese Mobilisierung ist strikt auf die Keimbahn beschränkt, da durch differentielles Spleißen in den Somazellen ein Inhibitor der Transposase entsteht. Modifizierte P-Elemente lassen sich als Transformationsvektoren von *Drosophila* nutzen (Rubin und Spradling, 1982; Spradling und Rubin, 1982). Hierzu werden zwei verschieden modifizierte P-Elemente verwendet. Das so genannte Helferplasmid kodiert für die Tran-

posase. Ihm fehlen aber die invertierten Wiederholungssequenzen, wodurch es nicht in das Genom inseriert und im weiteren Verlauf der Zellteilungen nicht weitervererbt wird. Das Transposasegen hingegen kann transkribiert werden und die Insertion eines zweiten P-Elementes katalysieren, das die invertierten Wiederholungssequenzen trägt. Dieses P-Element trägt zwischen den invertierten Wiederholungssequenzen das gewünschte DNA-Fragment (z.B. ein Gen) und ein Markergen, die Transposase ist deletiert. Um P-Element transformierte Fliegenlinien zu erhalten, injiziert man in das posteriore Polplasma von Embryonen vor der Zellularisierung ein Gemisch der beiden P-Elemente. Die Embryonen bilden zu diesem Zeitpunkt ein syncytiales Blastoderm aus (Stadium 3 der Embryogenese nach Campos-Ortega und Hartenstein, 1997), in dessen Verlauf sich am posterioren Pol die so genannten Polzellen abschnüren, welche die Vorläufer der späteren Keimbahnzellen darstellen. Wenn diese Polzellen die beiden P-Elemente aufnehmen, sind die Keimbahnzellen der injizierten Fliegen transformiert und ihre Nachkommen tragen das Transgen in sämtlichen Zellen. Als Marker der erfolgten Transformation dient üblicherweise ein Augenmarker. In der vorliegenden Arbeit wurden Embryonen weißäugiger Fliegen (Genotyp *yellow white, yw*) mit dem wildtypischen *white* Gen als Marker injiziert, so dass die transformierten Nachkommen rotäugig sind.

Für die Injektion der beiden P-Elemente werden 6 μg Vektor-DNA mit dem gewünschten DNA-Fragment zusammen mit 2 μg Helferplasmid-DNA mit Natriumacetat und Ethanol gefällt. Anschließend wird das DNA-Sediment in 50 μl Injektionspuffer gelöst und ist bereit, in die Embryonen injiziert zu werden. Hierzu werden 30 min alte Embryonen durch 5minütige Inkubation mit Hilfe eines Pinsels auf dem Rand eines Agarblöckchens aufgereiht. Die Mikropyle der Embryonen sollte hierbei immer zur selben Seite zeigen. Ein Objektträger wird am Rand entlang mit doppelseitigem Klebeband beklebt und die Embryonen mit leichtem Druck auf das Klebeband und somit auf den Objektträger überführt. Bevor die Embryonen injiziert werden können, müssen sie in einer Petrischale mit Silikagel für 10 min getrocknet werden, damit sie beim Einstich der Nadel nicht platzen. Anschließend werden die Embryonen mit Halocarbon-Öl (Sigma-Aldrich) überschichtet und der Objektträger so unter dem Mikroskop platziert, dass das posteriore Ende der Embryonen zur Injektionsnadel gerichtet ist. Die Injektionsnadel wurde zuvor mit der in Injektionspuffer gelösten DNA beladen. Die Nadel wird in die Injektionsapparatur eingespannt und so platziert, dass Embryonen und Nadel gleichermaßen im Mikroskop scharf gestellt werden können. Um die Injektionsnadel zu öffnen, wird sie am Deckgläschen abgebrochen, und dann mittels der Feinjustierung des Mikromanipulators in die aufgereihten Embryonen eingeführt und die DNA-Lösung appliziert. Nach der Injektion aller Embryonen wird der Objektträger auf einer Apfelsaft-Agarplatte platziert, wo sich die Embryonen bei 18 °C weiter entwickeln können. Die überlebenden Larven werden in ein Fliegenröhrchen überführt. Da die Insertion der P-Elemente in die Keimbahn der inji-

zierten Embryonen erfolgte, kann die Selektion erfolgreich transformierter Fliegen erst in der F1-Generation erfolgen. Hierzu werden die injizierten Fliegen (F0-Generation) direkt nach dem Schlüpfen abgesammelt und einzeln mit *white* Fliegen gekreuzt. In den Nachkommen dieser Kreuzungen können die transformierten Individuen anhand ihrer orange bis roten Augenfarbe identifiziert werden. Orange- bis rotäugige Fliegen werden vereinzelt und erneut mit *white* Fliegen gekreuzt. Der chromosomale Insertionsort der transformierten P-Elemente wird nach Standardmethoden durch Kreuzen mit Balancerchromosomen bestimmt (siehe Greenspan, 1997). Die etablierten, transformierten Linien werden homozygotiert und eventuell über einem Balancerchromosom gehalten. Für jedes P-Element werden mehrere transformierte Linien erstellt, um Positionseffekte auf das P-Element auszuschließen.

3.12.8 Identifikation des P-Element Insertionslokus durch „plasmid rescue“

Am 5'-Ende eines P-Elements befindet sich die Sequenz des gesamten pBluescript-Vektors. Flankiert wird diese Plasmidsequenz von zwei unterschiedlichen Polylinkersequenzen, die unterschiedliche Enzymschnittstellen aufweisen. Spaltet man genomische DNA einer P-Element Insertionslinie mit einem Enzym, das sich nur am 5'-Ende der Vektorsequenz befindet, kommt es zu einem DNA-Fragment, auf dem sich die Vektorsequenz zusätzlich zu einem Abschnitt genomischer DNA befindet. Ligiert man die geschnittenen DNA-Fragmente und transformiert sie in Bakterien, kann nur der Resistenz besitzende, religierte Vektor in einer Bakterienkultur vermehrt werden. Nach anschließender Plasmidpräparation kann das zusätzlich aufgenommene genomische DNA-Fragment sequenziert werden. Es stellt den Insertionslokus des P-Elements dar. Um festzustellen, ob nur ein P-Element in dem Fliegen genom inseriert ist, kann das genomische Fragment mit dem ursprünglich verwendeten Enzym zusammen mit einem Enzym aus der 3'-flankierenden Polylinkersequenz aus dem pBluescript-Vektor isoliert werden. Kommt es zu zwei Fragmenten unterschiedlicher Größe, konnten zwei Insertionssequenzen isoliert werden.

3.12.9 Mutagenese durch P-Element-Mobilisierung

Das P-Element der Linie *wech*^{EP(2)2291} wird durch Einkreuzen eines „jump starter chromosoms“ (Robertson et al., 1988) mobilisiert. Die verwendete „jump starter“-Linie trägt das Transposase-Gen auf dem 3. Chromosom und hat den folgenden Genotyp: *wg*^{59f} / CyO; SbΔ2-3 / TM6 Ubx. Aus der F1-Generation werden Männchen, die phänotypisch *white*, CyO und Sb sind, mit Weibchen des Genotyps *w*; Pm / CyO gekreuzt. In der F2-Generation werden die Männchen, die phänotypisch *white* und CyO sind, und somit wahrscheinlich das P-Element verloren haben, mit Weibchen des Genotyps

w;Pm / CyO gekreuzt. Es werden insgesamt etwa 200 Einzellinien etabliert. Treten in der F3-Generation der beiden ersten Kreuzungen Fliegen ohne rote Augen und CyO-Balancer auf, ist mit dem Verlust des P-Elements eine Reversion hin zum Wildtyp erfolgt (siehe Abb. 7.6).

3.12.10 Generierung von mutanten Keimbahn-Klonen

Zur Herstellung von mutanten Keimbahn-Klonen der zuvor durch P-Element-Exzision erzeugten *wech*⁶⁶-Linie, muss diese zuerst durch Kreuzung mit der Linie w;P[w⁺,FRT]G13,L / CyO auf das FRT-Chromosom rekombiniert werden (Chou and Perrimon, 1992). Aus der F1-Generation werden Weibchen des Genotyps w; *wech*⁶⁶ / P[w⁺,FRT]G13,L mit w;Pm / CyO Männchen gekreuzt. Alle Nachkommen, bei denen eine erfolgreiche Rekombination stattgefunden hat, und die den Genotyp w; *wech*⁶⁶; P[w⁺,FRT]G13,L / CyO aufweisen, werden zur Etablierung eines Stammes verwendet. Für die Generierung der mutanten Keimbahn-Klone werden Männchen des Genotyps yw, FLP; FRT^{w+} ovo^{D1} / CyO, die aus der Kreuzung von Weibchen des Genotyps yw, P[ry⁺ FLP]hoc^{sco} / CyO mit Männchen des Genotyps w, FRT G13^{w+} ovo^{D1} / CyO hervorgegangen sind, mit Weibchen des Fliegenstammes w; *wech*⁶⁶; P[w⁺,FRT]G13,L / CyO gekreuzt. Röhrrchen mit einem Tag alten Gelegen werden während des zweiten und dritten Larvenstadiums jeweils für 2 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Dabei wird auf Grund des Hitzeschocks das Flipase-Gen in den Larven aktiviert. Die aus diesen Larven hervorgehenden Weibchen mit dem Genotyp w, *wech*⁶⁶; P[w⁺,FRT]G13,L / FRT^{w+} ovo^{D1} werden mit Männchen des Genotyps w, *wech*⁶⁶ / CyO; *twi*-GFP gekreuzt. Die Embryonen aus diesen Kreuzungen werden auf Phänotypen analysiert.

Kapitel 4

Ergebnisse

Im Rahmen eines Hefe-Zwei-Hybrid Screens wurde das Gen *wech* von *Drosophila melanogaster* als Interaktionspartner des Gap Junction Proteins Innexin3 identifiziert (Löer, 2003). Sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten findet man Orthologe von *wech*. Doch über die Funktion der Gene und den biologischen Prozess in den sie involviert sind, war zu diesem Zeitpunkt nichts bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Funktion von *wech* mit Hilfe einer Kombination von genetischen, molekularbiologischen und biochemischen Techniken in *Drosophila melanogaster* untersucht. Des Weiteren wurde überprüft, ob eine mögliche Abhängigkeit der beiden Interaktionspartner im Hinblick auf morphologische Defekte besteht.

4.1 Molekulare Charakterisierung des *wech*-Lokus (CG1624)

Mit Hilfe einer Datenbankanalyse (flybase) konnte gezeigt werden, dass sich der *wech*-Lokus auf dem rechten Arm des zweiten Chromosoms von *Drosophila melanogaster* an Position 43C7 - D1 befindet. Die *wech*-Transkriptionseinheit erstreckt sich über einen genomischen Bereich von 7993 bp und beinhaltet drei alternative Spleißformen, die sich aus sechs Exons und fünf Introns (RA und RC) bzw. fünf Exons und vier Introns (RB) zusammensetzen (Abb. 4.1 A). Im ersten Exon ist ein P-Element (EP2291) inseriert. Um seine genaue Insertionsstelle im *wech*-Lokus zu bestimmen, wurde ein „plasmid rescue“ Experiment durchgeführt. Hierzu wurde genomische DNA der P-Elementfliegenlinie, die den pCaSpeR-Vektor pEP enthält, präpariert und mit dem Enzym *EcoRI* geschnitten. Nach der anschließenden Ligation des pCaSpeR-Vektors pEP konnte das integrierte genomische Fragment sequenziert werden. Eine Datenbankanalyse zeigt, dass das P-Element den *wech*-Lokus betrifft und sich an Position + 65 befindet, wenn die Position +1 den Transkriptionsstart von *wech* kennzeichnet (Abb. 4.1 A). Damit wurde die in der Daten-

bank angegebene Position für die Insertion des P-Elements in der Fliegenlinie *wech*^{EP2291} bestätigt.

Die Exon-Intron-Grenzen und die Nukleotidsequenzen bezüglich des alternativen Spleißens in der 5'-Region wurden mittels PCR näher analysiert. Hierzu wurden zwei Primerpaare P1/P2 und P3/P4 generiert. Das Primerpaar P1/P2 ist so gewählt, dass es nur die vorhergesagten Transkripte RA und RB erkennt, und das Primerpaar P3/P4 sollte nur das Transkript RC erkennen, da dieses einen 44 bp früheren Transkriptionsstart aufweist (Abb. 4.1 B). Die PCR auf cDNA-Ebene mit anschließender Sequenzierung der PCR-Produkte zeigt, dass die Primerkombination P1/P2 nur die Transkripte RA und RB erkennt, wogegen die Primerkombination P3/P4 alle drei Transkripte erkennt (Abb. 4.1 C). Somit konnte gezeigt werden, dass alle drei *wech*-Transkripte den gleichen Transkriptionsstart haben, und dadurch die Transkripte RA und RB 44 bp länger sind als in der Datenbank (flybase) angegeben (Abb. 4.1 D).

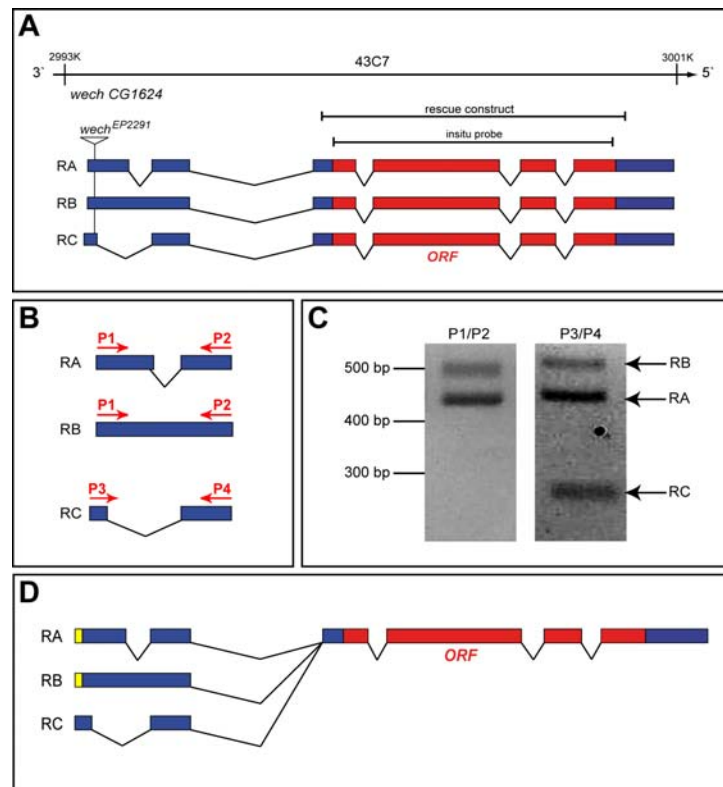


Abb. 4.1: Genomische Organisation des *wech*-Lokus. **A:** Der *wech*-Lokus befindet sich auf dem zweiten Chromosom an Position 43C7 - D1 und besteht aus drei Transkripten (RA, RB und RC), die durch alternatives Spleißens entstehen. Der offene Leserahmen ist in allen drei Transkripten gleich und hat eine Länge von 2497 bp. **B:** Primerkombinationen zur Bestätigung der Exon-Intron-Struktur von Exon1 bzw. 2 in den drei Transkripten. **C:** Ergebnis der PCR auf cDNA-Ebene. Die Primerkombination P3/P4 erkennt alle drei Transkripte im Vergleich zur Primerkombination P1/P2, die nur die Transkripte RA und RB erkennt. **D:** Korrektur des in der Datenbank angegebenen Transkriptionsstarts für die Transkripte RA und RB (gelb).

4.1 Molekulare Charakterisierung des *wech*-Lokus (CG1624)

Der längste offene Leserahmen der *wech*-Transkripte hat eine Länge von 2497 bp und ist in allen drei Transkripten identisch. Der offene Leserahmen besitzt ein Startcodon, dessen Umgebung (TCTTATG) in guter Übereinstimmung mit der *Drosophila*-Konsensussequenz für den Translationsstart, $T/GAA^T/GATG$ (Cavener, 1987) ist (siehe Abb. 7.3). In der 3'-Sequenz der cDNA findet man zwei für eukaryotische Transkripte typische Polyadenylierungssignale AATAA (siehe Abb. 7.3).

Der offene Leserahmen von *wech* kodiert für ein 832 Aminosäuren langes Protein. Dieses hat ein errechnetes Molekulargewicht von 90,57 kDa und einen errechneten isoelektrischen Punkt von pH 6,05. Des Weiteren weist das Wech-Protein 46 Phosphorylierungsstellen und 4 N-Glykosylierungsstellen auf (siehe Abb. 7.3).

Das *wech*-Gen kodiert für ein Multidomänenprotein mit einer BBox-Zinkfingerdomäne und einer coiled-coil-Domäne, die charakteristisch für Mitglieder der RBCC/TRIM-Proteinfamilie sind (Meroni und Diez-Roux, 2005). Mitglieder dieser Proteinfamilie besitzen meistens ein dreiteiliges Motiv, das aus einer Ringfingerdomäne, ein oder zwei BBox-Zinkfingerdomänen und einer coiled-coil-Domäne besteht. Das *Drosophila* Wech-Protein weist keine N-terminale Ringfingerdomäne auf. Es besitzt dagegen eine C-terminale NHL-Domäne (Slack und Ruvkun, 1998), die ebenfalls häufig in Verbindung mit der BBox-Zinkfingerdomäne und der coiled-coil-Domäne auftritt.

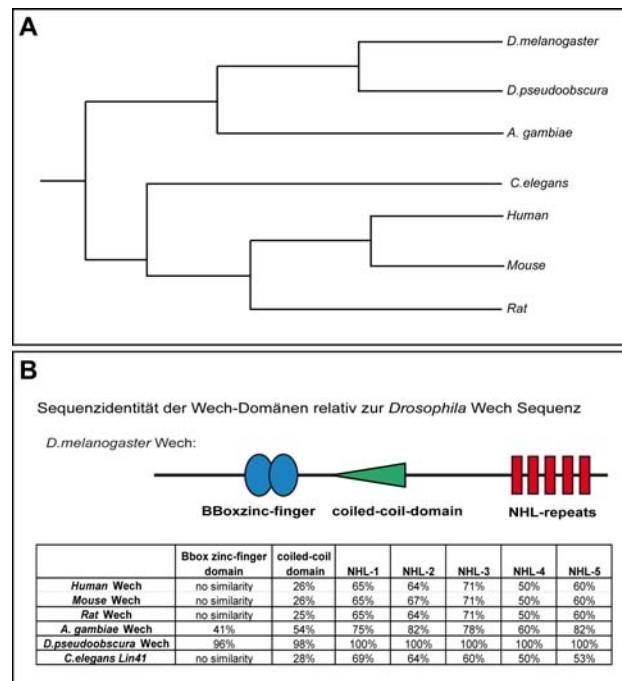


Abb. 4.2: Sequenzidentität des *Drosophila* Wech-Proteins. A: Phylogenetischer Stammbaum der Wech-Proteine von Vertebraten und Invertebraten. **B:** Sequenzidentität der Wech-Domänen relativ zur *Drosophila* Wech-Sequenz (%). Die Proteindomänen von *D. melanogaster* Wech sind mit den Wech Orthologen in Vertebraten und Invertebraten verglichen.

Mittels einer Datenbankanalyse konnten Wech-Orthologe in Vertebraten und Invertebraten identifiziert werden. Bei dem Vergleich der Aminosäuresequenzen ist auffällig, dass die unterschiedlichen Wech-Proteine speziell in den C-terminalen NHL-Domänen eine hohe Sequenzidentität aufweisen (siehe Abb. 4.2 B und Abb. 7.4). Diese Sequenzidentität ist innerhalb der Invertebraten nochmals deutlich höher als bei den Vertebraten, relativ zur *Drosophila* Wech-Sequenz (Abb. 4.2 B). Dies spiegelt auch der phylogenetische Stammbaum wieder, bei dem sich schon früh eine Trennung zwischen Vertebraten und Invertebraten zeigt (Abb. 4.2 A).

Über die molekulare Funktion der Wech-Proteine ist noch nichts bekannt. Nur das *C. elegans* Orthologe Lin41 ist näher charakterisiert, und stellt einen entscheidenden Faktor bei der Regulation der Entwicklung von der L4-Larve zum Adulten dar (Slack et al., 2000).

Um Aufschluss über die molekulare Funktion und den biologischen Prozess, bei dem die Wech-Proteine eine Rolle spielen, zu erhalten, wurde Wech und sein mutanter Phänotyp in *Drosophila melanogaster* im Folgenden charakterisiert.

4.2 Expressionsmuster des *wech* Transkripts

Durch Färbung von wildtypischen Embryonen mit der *wech in-situ* Sonde konnte das Expressionsmuster des *wech* Transkripts während der Embryogenese beschrieben werden (Abb. 4.3).

Die *in-situ* Hybridisierung von wildtypischen Embryonen mit der *wech* Antisense-Sonde zeigt, dass sich das räumliche Expressionsmuster von *wech* im Verlauf der Embryogenese verändert, so dass *wech* schließlich nur noch im ventralen Nervensystem, Gehirn und peripheren Nervensystem zu finden ist (Abb. 4.3, A-H). Zu Beginn der Embryogenese, im Blastodermstadium (Stadium 5), zeigt *wech* noch ein ubiquitäres Verteilungsmuster im Embryo (A). Im Stadium des ausgestreckten Keimstreifens (Stadium 9-11) zeigt sich eine Expression von *wech* im gesamten Neuroektoderm und den Neuroblasten im Procephalon (B). Während sich der Keimstreifen zurückbildet (ab Stadium 12), kann weiterhin eine Färbung im Neuroektoderm und den Neuroblasten im Procephalon beobachtet werden (C). Ab Stadium 13 findet man *wech* im Gehirn und im sich entwickelnden ventralen Strickleiternnervensystem (D-G). Anhand des Expressionsmusters kann zwischen Konnektiven und Kommissuren unterschieden werden (Pfeile in E). Neben der Färbung von Gehirn und ventralem Nervensystem tritt ab Stadium 14 zusätzlich auch eine segmentale Färbung auf (Pfeil in G, H). Diese Färbung weist auf eine Expression von *wech* im peripheren Nervensystem hin.

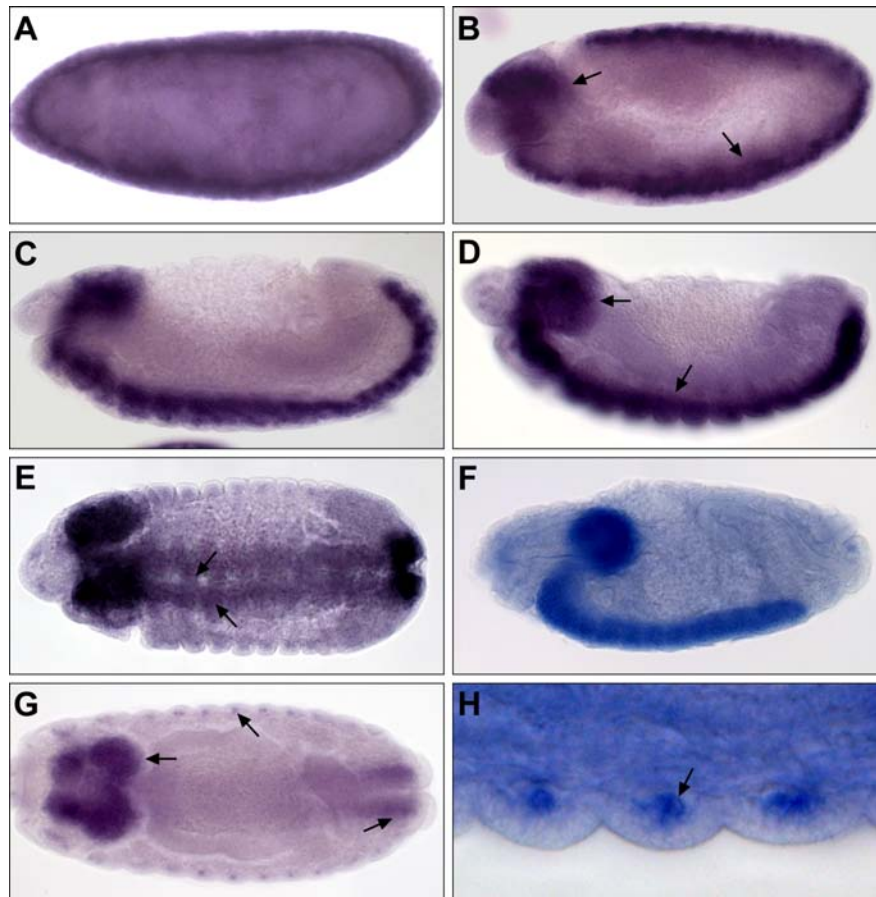


Abb. 4.3: *In-situ* Hybridisierung von wildtypischen Embryonen mit der *wech* Antisense-Sonde. In Stadium 5 (A) wird *wech* ubiquitär exprimiert. Ab Stadium 9 spezifiziert sich die Expression auf das Neuroektoderm (unterer Pfeil in B) und die Neuroblasten im Procephalon (oberer Pfeil in B). Ab Stadium 13 detektiert man Expression im Gehirn (oberer Pfeil in D) und im ventralen Nervensystem (unterer Pfeil in D). E zeigt die Expression im ventralen Nervenstrang, so dass man das strickleiterartige Nervensystem erkennt und zwischen Konnektiven (oberer Pfeil in F) und Kommissuren (unterer Pfeil in F) unterscheiden kann. In G kann man zwischen der rechten und linken Gehirnhälfte differenzieren (linker Pfeil). Ebenso ist eine leichte Färbung in den posterioren Spirakeln vorhanden (rechter Pfeil). Neben diesen Färbungen erkennt man zusätzlich noch ein segmentales Expressionsmuster (mittlerer Pfeil). Dieses ist in H vergrößert dargestellt und zeigt die *wech* Expression im peripheren Nervensystem (Pfeil). Anterior befindet sich links, posterior rechts. A, B, C, D und F zeigen eine laterale Ansicht des Embryos; E und G eine Aufsicht des Embryos. H ist eine Vergrößerung der segmentalen Expression von G.

4.3 Spezifität des anti-Wech Antikörpers

Für die Charakterisierung der molekularen Funktion von Wech sowie der Wech Proteinexpression, wurde von der Firma Davids (Regensburg) ein anti-Wech Antikörper aus dem Hasen generiert. Die Zielsequenz lag hierbei direkt vor der NHL-Domäne und umfasste die Aminosäuren 536 - 550 (Sequenz: LSLSFATEGHEDGQV). Dieser Antikörper wurde zunächst durch Immunoblotanalyse und in Immunfluoreszenzfärbungen an Embryonen und an HeLa-Zellen auf seine Spezifität untersuchen.

4.3.1 Immunoblot-Versuche mit dem anti-Wech Antikörper

Die Spezifität des anti-Wech Antikörpers wurde in einem heterologen System analysiert, in dem Bakterien des Stammes XL1 blue das gesamte Wech-Protein exprimieren. Hierzu wurde die Sequenz zuvor in das Expressionsplasmid (pGEX) inkloniert, und das generierte Konstrukt sequenziert, um die Richtigkeit der inklonierten Sequenz, sowie das gemeinsame Leseraster zum GST-Protein, dass sich ebenfalls in dem pGEX-Vektor befindet, zu überprüfen. Der Vektor mit dem GST-Wech-Fusionsprotein, sowie der leere pGEX-Vektor als Kontrolle, wurden in Bakterien transformiert und durch Zugabe von IPTG die Expression des Fusionsproteins induziert. Als Kontrolle diente jeweils ein Ansatz, bei dem die Expression des Fusionsproteins nicht durch Zugabe von IPTG induziert wurde. Im anschließenden Immunoblot mit dem anti-Wech Antikörper konnte nur in dem Proteinextrakt, der das Fusionsprotein nach Induktion exprimiert, eine Bande, die in etwa der Größe des Wech-Proteins entspricht, nachgewiesen werden. Das errechnete Molekulargewicht des Fusionsproteins hatte eine Größe von 115 kDa. Allerdings konnte nur eine Bande in der Größe von etwa 90 kDa detektiert werden, zusätzlich zu einer Bande bei 25 kDa, die dem freien GST entspricht. In allen anderen Extrakten sind diese Banden nicht zu finden (Abb. 4.4 A und B).

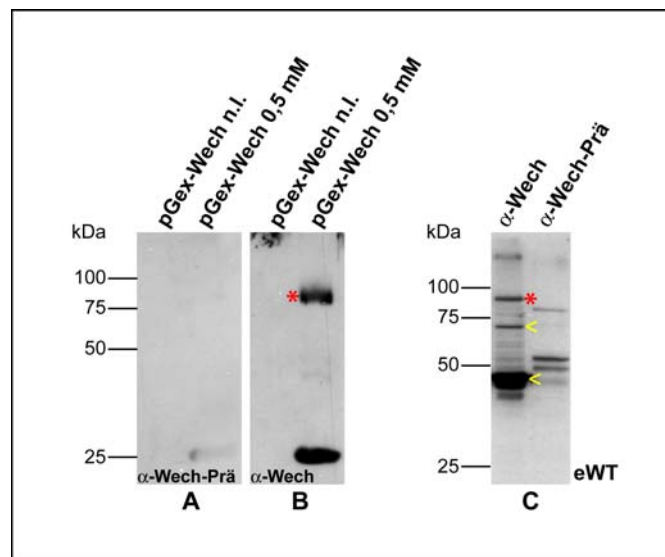


Abb. 4.4: Spezifitätstest des anti-Wech Antikörpers. Der Immunoblot aus Proteinextrakten mit induzierten und nicht induzierten GST-Wech-Fusionsproteinen wurde mit dem anti-Wech Präimmunsereum (**A**) und dem anti-Wech Antikörper (**B**) inkubiert. Das Resultat zeigt, dass nur im Fall des induzierten Fusionsproteins mit dem anti-Wech Antikörper eine Proteinexpression nachgewiesen werden kann (roter Stern in **B**). **C**: Lysat von wildtypischen Embryonen wurde mit dem anti-Wech Antikörper bzw. dem anti-Wech-Präimmunsereum im Immunoblot detektiert. Die spezifische Wech-Bande (Stern in **C**) konnte nach Inkubation mit dem anti-Wech-Präimmunsereum nicht detektiert werden. Die durch einen gelben Pfeil gekennzeichneten Signale stellen mögliche kleinere Proteinvarianten von Wech dar (**C**). **pGex-Wech**: Expression des GST-Wech Fusionsproteins; **n.I.**: nicht induziert; **0,5 mM**: mit 0,5mM IPTG induziertes Fusionsprotein; **eWT**: embryonaler wildtypischer Extrakt.

Neben dem Spezifitätstest in einem heterologen System wurden Proteinextrakte aus wildtypischen Embryonen auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Dieses wurde neben dem anti-Wech Antikörper auch mit anti-Wech Präimmunsrum detektiert. In dem Extrakt, der mit dem anti-Wech Antikörper untersucht wurde, treten mehrere starke und schwache Banden auf, wovon die bei etwa 90 kDa dem ermittelten theoretischen Molekulargewicht des Wech-Proteins entspricht. Neben dieser Bande treten zwei weitere starke Banden auf, die einem Molekulargewicht entsprechen, das auf mögliche alternative Startcodons innerhalb von Wech zurückzuführen ist. Diese Banden finden sich nicht in dem Proteinextrakt der mit dem anti-Wech Präimmunsrum analysiert wurde (Abb. 4.4 C). Daher können sie als spezifisch angesehen werden.

4.3.2 Spezifität des anti-Wech Antikörpers in der Immunfluoreszenz

Parallel zu den Immunoblot Experimenten wurde die Spezifität des anti-Wech Antikörpers auch in der Immunfluoreszenz untersucht. Hierzu wurden HeLa-Zellen mit einem WechGFP-Fusionsprotein transfiziert und anschließend fixiert. In der nachfolgenden Immunfluoreszenzfärbung zeigte sich, dass nur die Zellen, die mit dem WechGFP-Fusionsprotein transfiziert waren ein positives GFP- und Wech-Signal aufweisen (Abb. 4.5, A-C).

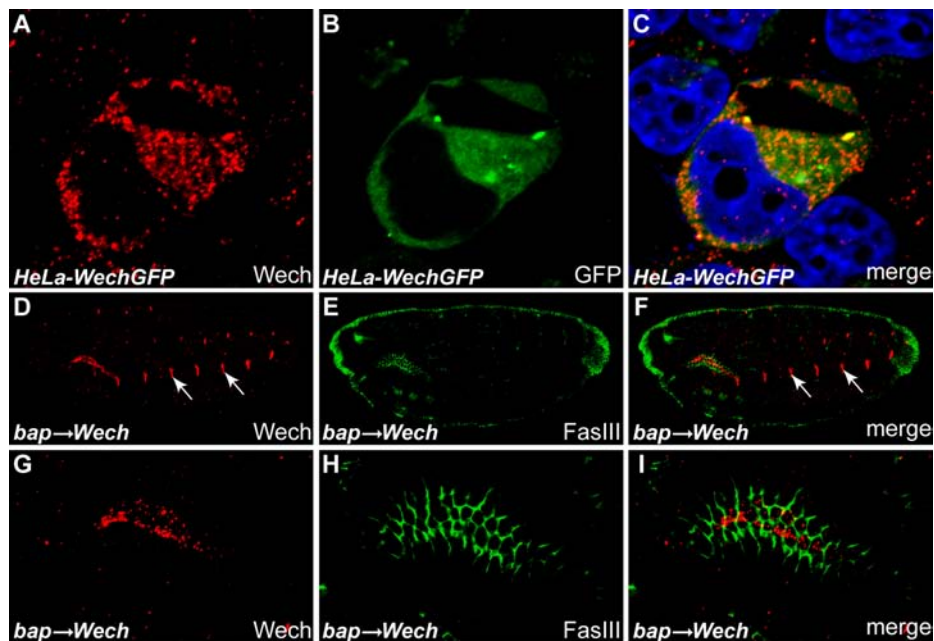


Abb. 4.5: Spezifitätstest des anti-Wech Antikörpers in der Immunfluoreszenz. A-C: HeLa-Zellen wurden mit einem WechGFP-Fusionsprotein transfiziert. Wech-Expression (A) ist nur in den Zellen vorhanden, die auch ein GFP-Signal (B) aufweisen. C: die Zellkerne sind mit DAPI (blau) angefärbt. D-I: Überexpression von Wech mit dem GAL4-UAS-System führt zu einer spezifischen Wech-Expression in der Speicheldrüse. Zusätzlich ist das endogene Wech in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle zu erkennen (D, F). G-I: zeigen eine Vergrößerung der Speicheldrüse von (D-F).

Neben den Immunfluoreszenzfärbungen an HeLa-Zellen wurde die Spezifität des anti-Wech Antikörpers auch in *Drosophila* mit Hilfe des GAL4-UAS-Systems untersucht. Zu diesem Zweck wurde die *bapGal4-532*-Treiberlinie verwendet, die eine Überexpression in den Speicheldrüsen ermöglicht.

Wie in Abbildung 4.5 D-I deutlich zu erkennen, weist der Embryo ein spezifisches Signal in der Speicheldrüse auf. In der Vergrößerung zeigt sich, das Wech punktuell an der apikalen Seite der Zellen lokalisiert ist (Abb. 4.5 G-I). Neben dem spezifischen Signal in den Speicheldrüsen ist die endogene Wech-Expression in den epidermalen Muskelanhaftungsstellen zu erkennen (Pfeile in Abb. 4.5 D, F).

4.4 Anti-Wech Immunfluoreszenzen in Embryonen

Zur Charakterisierung der Wech-Proteinexpression wurden an wildtypischen *Drosophila*-Embryonen Immunfluoreszenzfärbungen mit dem anti-Wech Antikörper durchgeführt. Die Auswertung der Färbung erfolgte mittels konfokaler Laserscannmikroskopie.

Die Ergebnisse der Wech-Proteinexpression weichen deutlich von dem Muster der Genexpression ab. Zu Beginn der Embryogenese konnte, wie zuvor auch schon in der *in-situ* Hybridisierung gesehen (vgl. Abb. 4.3 A), eine ubiquitäre Verteilung des Wech-Proteins in dem Embryo beobachtet werden (Abb. 4.6 A, B). Wech ist hier ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert, wobei die Expression vermehrt an der Plasmamembran auftritt (Abb. 4.6 C, D). Mit Einsetzen der Gastrulation verändert sich die Wech-Proteinexpression dahingehend, dass eine verstärkte Expression in den invaginierenden Zellen beobachtet werden kann (Abb. 6 E), die sich im weiteren Verlauf der Embryogenese entlang des Keimbands und im Bereich des anterioren und posterioren Mitteldarmprimordiums konzentriert (Abb. 4.6 F, G). Zum Ende der Embryogenese findet man die Wech-Proteinexpression in jedem Segment spezifisch an den Segmentgrenzen (Abb. 4.6 H). Um diese Proteinexpression näher charakterisieren zu können, wurde eine Kofärbung mit dem β PS-Integrin Antikörper durchgeführt, der an der basalen Oberfläche von Tendonzellen Integrintransmembranrezeptoren als integrale Bestandteile der basalen hemiadhäsiven Verbindungen (hemiaherent junctions, HAJ) detektiert (Prokop et al., 1998) (Abb. 4.6 I). Wech kolokalisierte vollständig mit dem β PS-Integrin Antikörper (Abb. 4.6 J), so dass die Proteinexpression zu diesem Zeitpunkt der Embryogenese nur noch in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle zu finden ist. In Abbildung 4.6 K-M ist die Expression des Wech-Proteins in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle noch einmal vergrößert dargestellt.

Somit stellt sich das Ergebnis der Wech-Proteinlokalisierung folgendermaßen dar: Die Wech-Proteinexpression stimmt nur in den sehr frühen Embryonalstadien mit der Genex-

pression überein. Ab dem Zeitpunkt der Gastrulation weicht das Genexpressionsmuster von der Proteinexpression dahingehend ab, dass keine Wech-Expression in Zellen des sich entwickelnden zentralen und peripheren Nervensystems beobachtet werden konnte. Dagegen fand sich Expression im Bereich des anterioren und posterioren Mitteldarmprimordiums. Aber auch diese Expression war ab Stadium 12 nicht mehr erkennbar. Erst ab Stadium 14/15 war erneut eine Wech-Expression vorhanden, die sich nun aber segmental befand und den epidermalen Muskelanhaftungsstellen entspricht, was durch Kofärbung mit dem β PS-Integrin Antikörper bestätigt werden konnte.

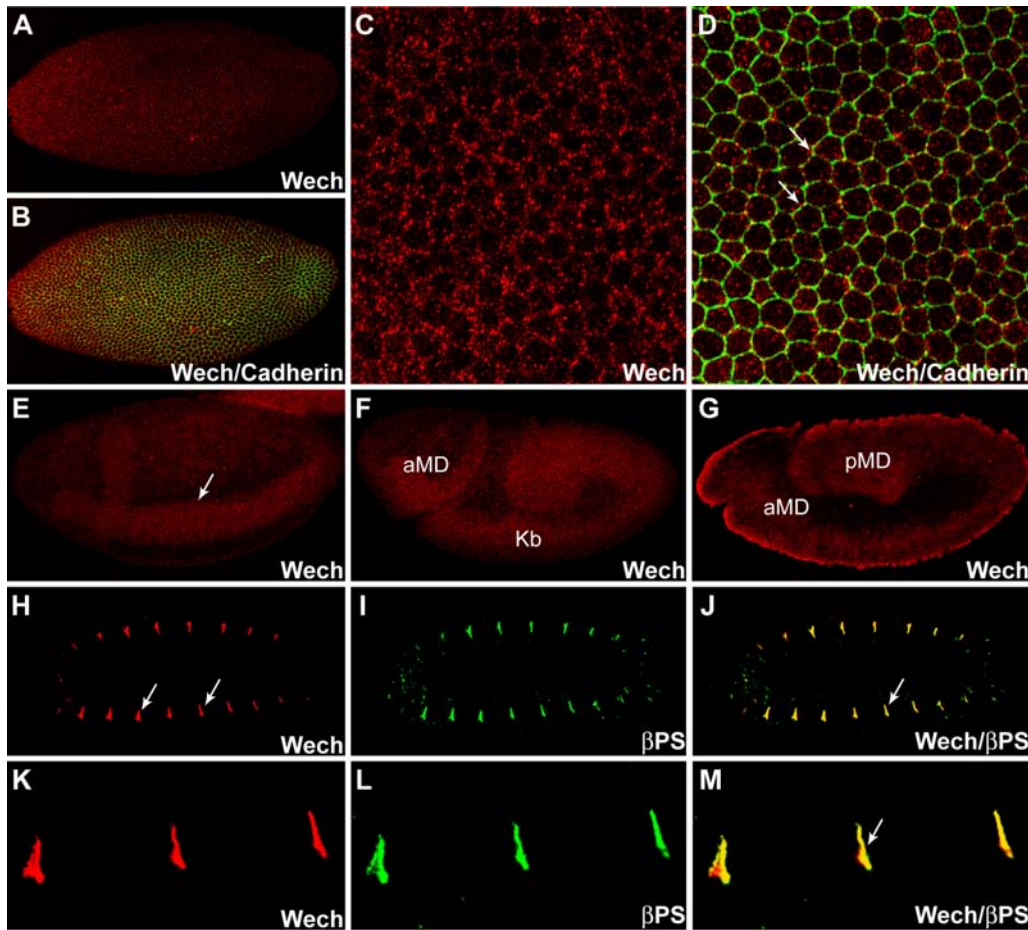


Abb. 4.6: Wech-Proteinexpression in wildtypischen Embryonen. Zu Beginn der Embryogenese (Stadium 6) ist Wech ubiquitär exprimiert (**A**, **B**). Eine Kofärbung mit dem Membranmarker Cadherin zeigt, dass Wech sich ausschließlich im Zytoplasma der Zellen befindet (**C**, **D**); hierbei vermehrt aber an der Plasmamembran auftritt (Pfeile in **D**). Mit dem Beginn der Gastrulation findet sich eine verstärkte Expression von Wech in den invaginierenden Zellen (Pfeil in **E**), die sich später entlang des Keimbands (**F**) und dem anterioren und posterioren Mitteldarmprimordium konzentriert (**G**). In den späten Embryonalstadien (**H**-**M**) weist Wech eine segmentale Expression auf (**H**), die der epidermalen Muskelanhaftungsstelle entspricht, was die Kofärbung mit dem β PS-Integrin Antikörper zeigt (Pfeil in **J**). **K**-**M** zeigen Detailaufnahmen von **H**-**J**. **Kb**: Keimband; **aMD**: anteriores Mitteldarmprimordium; **pMD**: posteriores Mitteldarmprimordium.

4.5 Wech Lokalisation in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle

Wie zuvor schon gezeigt, ist Wech in den späten Stadien der Embryogenese in den epidermalen Muskelanhaftungsstellen exprimiert. Diese Expression soll im weiteren Verlauf näher untersucht werden. Dazu wurden wildtypische Embryonen mit dem Aktinzytoskelettmarker Phalloidin, dem Membranmarker Fasciilin III und Wech gefärbt. Abbildung 4.7 zeigt, dass Wech im gesamten Embryo in den epidermalen Muskelanhaftungsstellen exprimiert wird. Die Expression befindet sich in der epidermalen Tendonzelle, die zwischen jedem Segment die Muskeln mit der Epidermis verbindet.

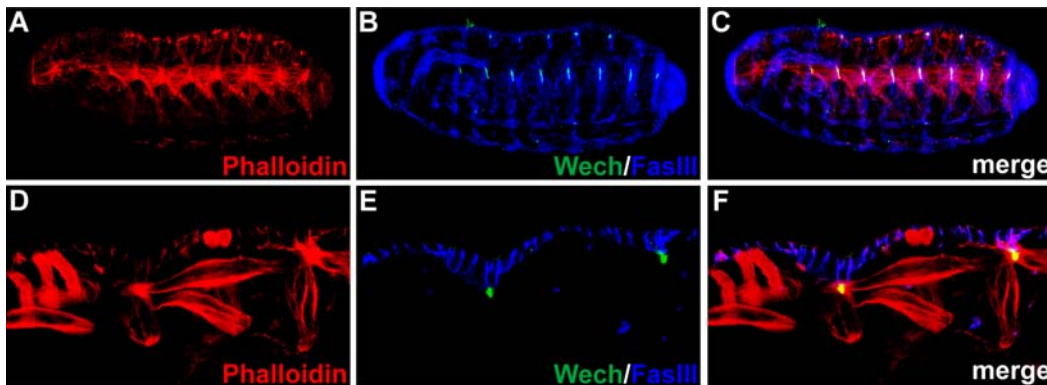


Abb. 4.7: Wech-Expression in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle. A-C: Übersicht eines wildtypischen Embryos. Das Aktinzytoskelett wurde mit Phalloidin, und die Epidermis mit dem Membranmarker Fasciilin III sichtbar gemacht. Wech-Expression findet sich ausschließlich in den epidermalen Muskelanhaftungsstellen. D-F: Detailaufnahmen der dorsalen epidermalen Muskelanhaftungsstellen. Wech zeigt eine basale Lokalisation in der epidermalen Tendonzelle (E), kolokalisiert aber auch mit Phalloidin (F), das in den Muskelzellen exprimiert ist.

Die Detailaufnahmen in Abbildung 4.7 D-F zeigen, dass Wech basal in der Tendonzelle exprimiert ist. Durch die Kolokalisation mit dem Aktinzytoskelettmarker Phalloidin ist aber eine zusätzliche Expression von Wech in den Muskelzellen nicht auszuschließen.

Zur Feststellung, ob Wech in den epidermalen und mesodermalen Zellen der Muskelanhaftungsstelle exprimiert ist, wurden Kofärbungen mit entsprechenden Markerproteinen für beide Zelltypen durchgeführt. Kofärbungen mit dem zytoplasmatischen Protein Short Stop (auch Kakapo genannt) (Gregory und Brown, 1998), das in der epidermalen Tendonzelle vorkommt, zeigen, dass Wech mit Short Stop kolokalisiert. Jedoch findet man basale Expression von Wech ohne ein zusätzliches Short Stop-Signal (Abb. 4.8 C). Um zu klären, ob diese Wech-Proteinexpression in den Muskelzellen lokalisiert ist, wurden Kofärbungen mit dem muskelspezifischen Integrin α PS2 durchgeführt (Abb. 4.8 D-F). Auch hier zeigt Wech keine vollständige Kolokalisation mit dem Markerprotein (Abb. 4.8 F). Zur Bestätigung, dass Wech tatsächlich in beiden Zelltypen der epidermalen Muskelanhaftungsstelle vorkommt, wurden Kofärbungen mit β PS-Integrin, das

von beiden Zelltypen exprimiert wird, durchgeführt (Abb. 4.8 G-I). In diesem Fall zeigt Wech eine komplette Kolokalisation mit dem Markerprotein.

Aufgrund der oben aufgeführten Ergebnisse war es möglich, dass in Abbildung 4.8 J dargestellte Schema der Wech-Expression in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle zu erstellen. Wir können festhalten, dass Wech in beiden Zelltypen, der epidermalen Tendonzelle und den mesodermalen Muskelzellen, exprimiert ist. Die Expression beschränkt sich dabei auf Regionen, in denen Integrine vermehrt vorkommen, die die Adhäsion zwischen den beiden Zelltypen vermitteln. Dies lässt den Schluss zu, dass Wech eine Rolle bei der integrin-vermittelten Zelladhäsion spielt.

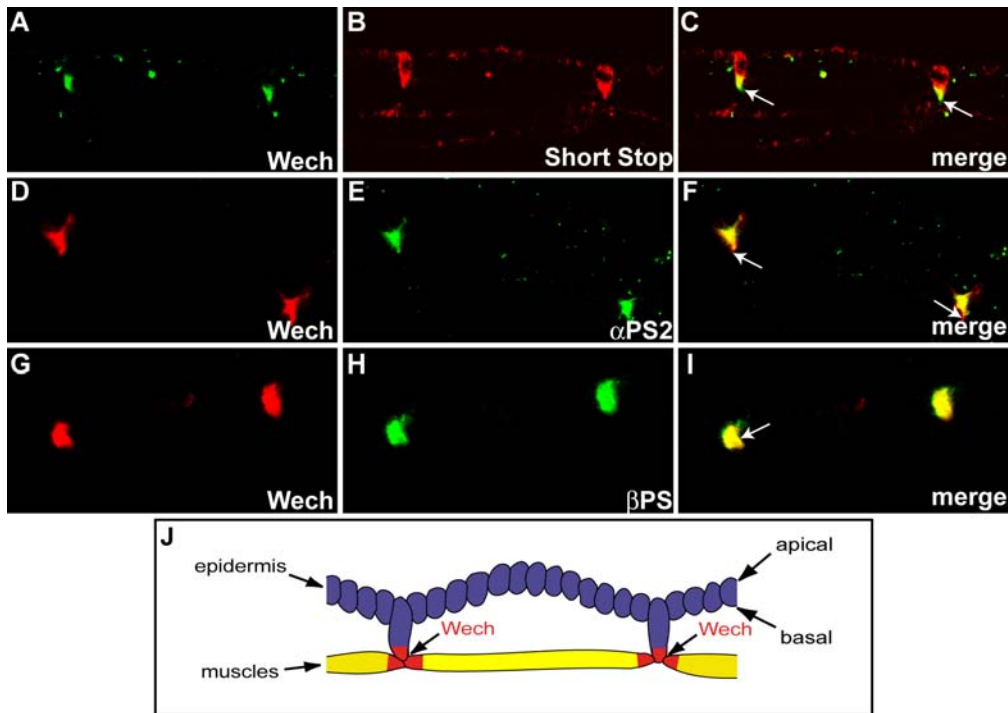


Abb. 4.8: Lokalisation von Wech in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle. A-F: Wech zeigt nur eine partielle Kolokalisation mit dem tendonzellspezifischen Markerprotein Short Stop (Pfeile in C), sowie dem muskelspezifischen Integrin α PS2 (Pfeile in F). Dagegen erfolgt mit β PS-Integrin (G-I) eine vollständige Kolokalisation (Pfeil in I). J: das Schema zeigt die Wech-Expression in der Muskelanhaftungsstelle. Wech ist in beiden Zelltypen im Bereich der integrin-vermittelten Zelladhäsion exprimiert. Die epidermalen Zellen sind in **blau**, die Muskelzellen in **gelb**, und die Wech-Expression in **rot** dargestellt.

4.6 Generierung von *wech*-Mutanten mittels P-Element vermittelter Mutagenese

Um die Funktion von Wech im Kontext der integrin-vermittelten Zelladhäsion näher zu analysieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit *wech*-Mutanten mittels P-Element vermit-

telter Mutagenese erzeugt. Hierzu wurde das in Exon 1 lokalisierte P-Element (Abb. 4.9) der Fliegenlinie *wech*^{EP2291} mit Hilfe einer Transposase mobilisiert. Die dazu erforderlichen Kreuzungen sind in Abbildung 7.6 dargestellt.

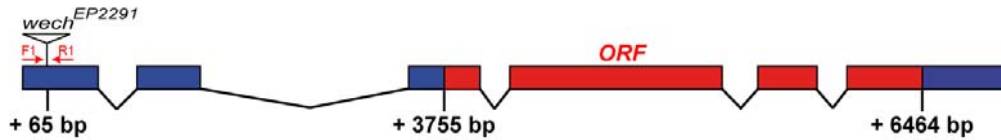


Abb. 4.9: Insertion des für die Mobilisierung verwendeten EP-Elements. Das P-Element der Fliegenlinie *wech*^{EP2291} befindet sich in Exon 1 an Position + 65 bp, wenn +1 den Transkriptionsstart von *wech* darstellt

Aus 1800 Fliegen der F2-Generation wurden 30 Stämme etabliert, von denen 19 das P-Element verloren haben (gekennzeichnet durch weiße Augen und CyO), bei neun Stämmen das P-Element an einem anderen Ort im Genom inseriert ist (gekennzeichnet durch rote Augen und CyO), sowie zwei Stämme, die das P-Element verloren haben und wildtypisch sind (gekennzeichnet durch weiße Augen, kein CyO).

4.6.1 Charakterisierung der generierten *wech*-Mutanten mittels PCR

Zur Charakterisierung der genomischen Region nach der P-Element-Exzision wurden zwei Primer gewählt, die das P-Element im 5'- und 3'-Bereich flankieren (vgl. Abb. 4.9). Mittels genomischer PCR und anschließender Sequenzierung konnte so geklärt werden, welche Sequenzveränderungen bei der P-Element-Mutagenese stattgefunden haben.

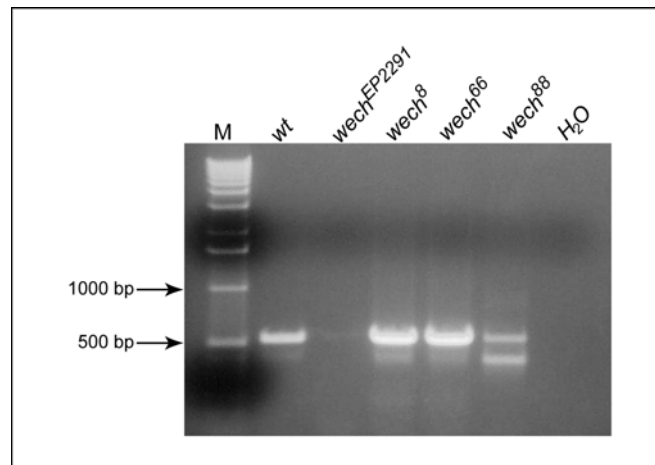


Abb. 4.10: PCR zur Bestimmung der genomischen Region nach P-Element Mobilisierung. Dargestellt sind die Ergebnisse mit den in Abbildung 4.9 dargestellten Primern F1 und R1. Das 541bp große Fragment konnte im Wildtyp nachgewiesen werden. In den P-Element-Exzisionslinien finden sich ebenfalls Signale in ähnlicher Größe. Kein Signal ist bei der Ausgangslinie *wech*^{EP2291} und der Wasserkontrolle vorhanden.

Abbildung 4.10 zeigt das Ergebnis der PCR. Als Kontrollen wurden wildtypische DNA, sowie die Ausgangslinie mit dem inserierten P-Element verwendet. Das erwartete wildtypische Fragment, amplifiziert durch die Primer F1 und R1, weist eine Länge von 541 bp auf. In den ausgewählten Linien, die das P-Element nicht mehr besitzen, tritt eine Bande bei ebenfalls etwa 541 bp auf, die nicht vom Wildtyp unterschieden werden kann. Diese Banden wurden mit Hilfe der TOPO-Klonierung in den pCRII-Vektor kloniert und anschließend sequenziert. Hierbei zeigte sich, dass das P-Element nicht vollständig aus dem Genom entfernt werden konnte. Sowohl bei der Fliegenlinie *wech*⁸ als auch bei *wech*⁶⁶ ist eine 11 bp lange Sequenz (GTAAACAAAA) vom P-Element des pCaSpeR-Vektors in dem Genom verblieben. Die Insertion dieser 11 bp in der 5'-UTR des *wech*-Lokus führt wahrscheinlich zu einem Verlust des *wech* Transkripts und somit zur Letalität.

4.6.2 Analyse der *wech*-Expression in den erzeugten Mutanten

Zur Bestätigung, dass die beobachtete Letalität der durch P-Element Mobilisierung generierten Fliegenlinien *wech*⁸ und *wech*⁶⁶ auf einen Verlust des *wech*-Transkripts zurückzuführen ist, wurden an diesen Mutanten, sowie einer Defizienz für *wech* und wildtypischen Embryonen zur Kontrolle *in-situ* Hybridisierungen durchgeführt. Um zu zeigen, dass ein Verlust der *wech*-Färbung auch einen Verlust der *wech*-Expression bedeutet, wurde als interne Färbekontrolle eine *in situ* Antisense-Sonde von *black cells* verwendet, die spezifisch in den Kristallzellen exprimiert ist (durch Pfeile in Abb. 4.11 gekennzeichnet). Wie in Abbildung 4.11 dargestellt, zeigen die wildtypischen Embryonen (A-C) eine Expression von *wech* im zentralen Nervensystem, sowie die Färbung von *black cells* in den Kristallzellen. Im Gegensatz dazu weisen die durch P-Element Mobilisierung erzeugten *wech*-Mutanten eine deutliche Reduktion des *wech*-Transkripts auf (Abb. 4.11, D-I). Die *wech*⁸ Mutanten zeigen nur noch eine leichte Färbung des zentralen Nervensystems (Abb. 4.11, D-F), wogegen diese bei den *wech*⁶⁶ Mutanten nochmals vermindert ist (Abb. 4.11, G-I). Im Vergleich zu den Mutanten, die somit keine vollständigen Transkriptnull-Mutanten sind, findet man in der Defizienz von *wech* keine *wech*-Expression (Abb. 4.11, J-K). In allen Embryonen konnte eine Färbung von *black cells* in den Kristallzellen nachgewiesen werden (siehe Pfeile in Abb. 4.11, D, I und K). Dadurch wurde bestätigt, dass die Reduktion der *wech*-Expression auf eine Verminderung des *wech*-Transkripts in diesen mutanten Embryonen zurückzuführen ist, und nicht etwa auf eine fehlerhafte *in-situ* Hybridisierung.

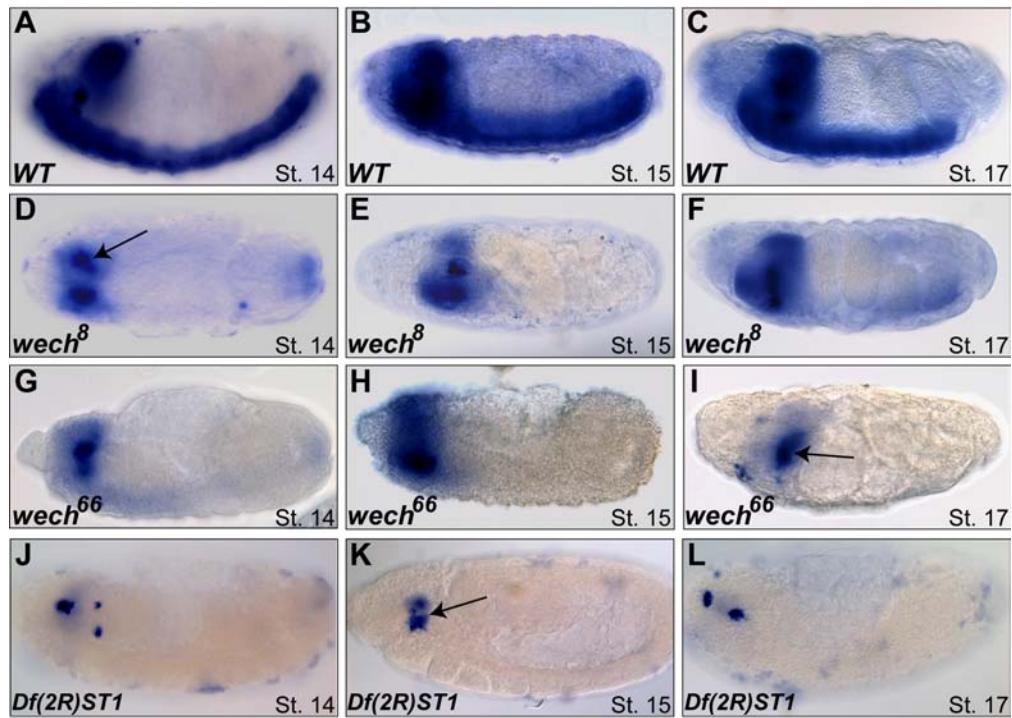


Abb. 4.11: *In-situ* Hybridisierung der *wech*-Mutanten. A-C: wildtypische Embryonen, die Expression von *wech* im zentralen Nervensystem, sowie *black cells* in den Kristallzellen aufweisen. D-F: *wech*⁸-mutante Embryonen weisen eine deutliche Reduktion des *wech*-Transkripts im zentralen Nervensystem auf. Dagegen ist die Expression von *black cells* unverändert (Pfeil in D). G-I: *wech*⁶⁶-Mutanten zeigen ebenfalls eine starke Reduktion des *wech*-Transkripts und eine unveränderte Expression von *black cells* in den Kristallzellen (Pfeil in I). J-L: in der *wech*-Defizienz ist keine Expression von *wech* zu beobachten. Die Embryonen zeigen nur Expression von *black cells* in den Kristallzellen (Pfeil in K). A, B, C, E, F, G, H, I, K und L zeigen eine laterale Ansicht des Embryos; D und J zeigen eine ventrale Ansicht des Embryos. Dargestellt sind Embryonen des Stadiums 14-17.

Neben der *in-situ* Hybridisierung konnte für die *wech*⁶⁶-Mutante eine Reduktion des Transkripts auch mittels real-time PCR-Analysen nachgewiesen werden (Abb. 4.12). Um die Reduktion des Transkriptlevels auf real-time PCR-Ebene zu kontrollieren, wurde eine induzierbare RNAi-Fliegenlinie generiert, indem ein 750 bp großes Fragment in den pWiz-Vektor inkloniert und in wildtypische Embryonen injiziert wurde (Lee und Carthew, 2003). Um die *wech* Transkription ubiquitär mit den RNAi-Linien zu inhibieren, wurde der *hs-Gal4* Treiberstamm verwendet und die Embryonen einem zweistündigen Hitzeschock im Stadium 6-7 der Embryogenese ausgesetzt. Hierbei zeigte sich, dass das *wech*-Transkript in diesen Mutanten um etwa 57% im Vergleich zur Wildtypkontrolle reduziert ist. In zygotischen *wech*⁶⁶ Mutanten kann man dagegen eine weitaus stärkere Transkriptreduktion beobachten. *Wech* weist hier noch eine Restaktivität von 17,8% im Vergleich zum Wildtyp auf (Abb. 4.12).

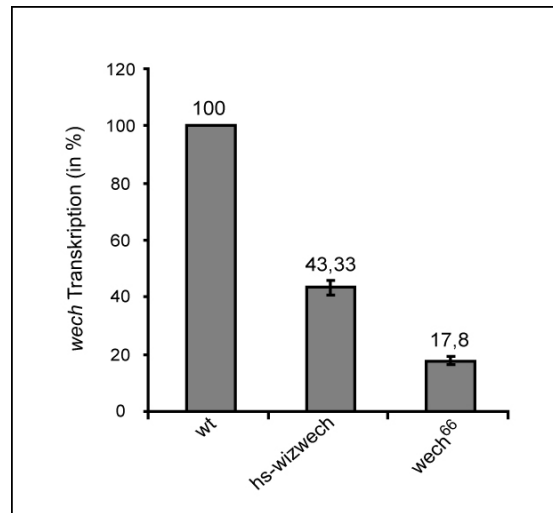


Abb. 4.12: Real-time PCR Analyse der *wech*⁶⁶-Mutante und *wech*-RNAi-Linie. Dargestellt sind die Expressionslevel in *hs-wech*-RNAi Embryonen und zygotischen Embryonen der *wech*⁶⁶-Linie im Vergleich zu wildtypischen Embryonen. Man erkennt eine Reduktion des Transkriptionslevels von *wech* in *hs-wech*-RNAi (43,33%) und zygotischen *wech* Mutanten (17,8%). **wt** = Wildtyp; **wizwech** = *wech* RNAi-Linie.

4.6.3 Bestimmung der Letalität der *wech*-Mutanten

Um die mögliche Letalität der homozygoten *wech*-Mutanten zu spezifizieren, wurden die Mutanten *wech*⁸ und *wech*⁶⁶, sowie die *wech*-Defizienz (*Df(2R)ST1*) mit Hilfe des Krüppel-GFP-Balancers umbalanciert. Dadurch war in der F1-Generation eine Unterscheidung zwischen homozygoten und heterozygoten Mutanten möglich, da nur die homozygoten Mutanten keine GFP-Expression in den Bolvic-Organen aufweisen. Zusätzlich wurden transheterozygote *wech*⁸/*wech*⁶⁶ sowie *wech*-Defizienz /*wech*⁶⁶ Mutanten näher untersucht. Insgesamt wurden für jeden Genotyp 1000 Embryonen analysiert. Als Kontrolle dienten wildtypische Embryonen. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.13 dargestellt. Von den homozygot mutanten Embryonen entwickelten sich über einen Zeitraum von fünf Tagen nur etwa 4-5 % zu lebensfähigen Larven, die jedoch im L1-Stadium starben. Die restlichen Embryonen waren im Stadium 16-17 der Embryogenese letal. Die Tatsache, dass sich die Mutationen in den transheterozygoten Embryonen nicht gegenseitig komplementieren bestätigt, dass nur das *wech* Gen mutiert ist.

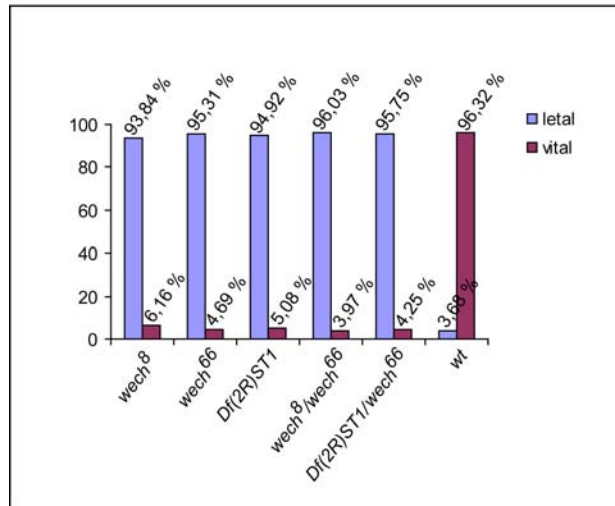


Abb. 4.13: Graphische Darstellung der Letalität der für *wech* mutanten Fliegenlinien. Es konnte gezeigt werden, dass die *wech*⁸ und *wech*⁶⁶ Mutante sowie die *wech*-Defizienz (*Df(2R)ST1*) im Stadium 16-17 embryonal letal sind, und die Stämme sich bezüglich der Mutation nicht komplementieren.

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass die *wech*-Mutanten eine späte embryonale Letalität besitzen, die auf den Verlust des *wech*-Transkripts zurückzuführen ist.

4.6.4 Phänotyp der *wech*-Mutante

Da *Wech* mit den Integrinen α PS2 und β PS kolokalisiert (vgl. Abb. 4.8) und diese Mutanten einen Muskeldefekt aufweisen (Prokop et al., 1998), wurde der embryonale Phänotyp der *wech*⁶⁶-Mutante im Hinblick auf mögliche Muskeldefekte näher analysiert. In wildtypischen Embryonen besitzt jedes Segment des Embryos 30 genau definierte Muskeln, die über sogenannte Muskelanhaftungsstellen untereinander und mit der Epidermis verbunden sind (Abb. 4.14 A und C; Abb. 7.1). In β PS-Integrinmutanten (*mys*^{XG43}) ist dieser stereotype Muskelaufbau zerstört (Brown, 1994). Die Muskelanhaftungsstellen reißen, da durch den Verlust der Integrine keine Verbindung mit dem Zytoskelett der einzelnen Zellen besteht, und sich die Muskeln bei Kontraktion aufgrund verminderter Zelladhäsion voneinander und von der Epidermis ablösen und sich dadurch abrunden (Abb. 4.14 B und D). Die hier charakterisierte *wech*⁶⁶-Mutante weist einen ähnlichen Muskelphänotyp wie die Integrinmutanten auf. Dieser ist in den *wech*⁶⁶-Mutanten aber weniger stark ausgeprägt. Man findet nur in den späten Stadien (Stadium 15-17) sich ablösende und zum Teil abgerundete Muskeln (Abb. 4.14 E und G). Im Vergleich dazu zeigt die Defizienz von *wech* (*Df(2R)ST1*) einen weitaus stärkeren Phänotyp mit abgerundeten Muskeln und einem fast vollständig zerstörten Muskelaufbau (Abb. 4.14 F und

H).

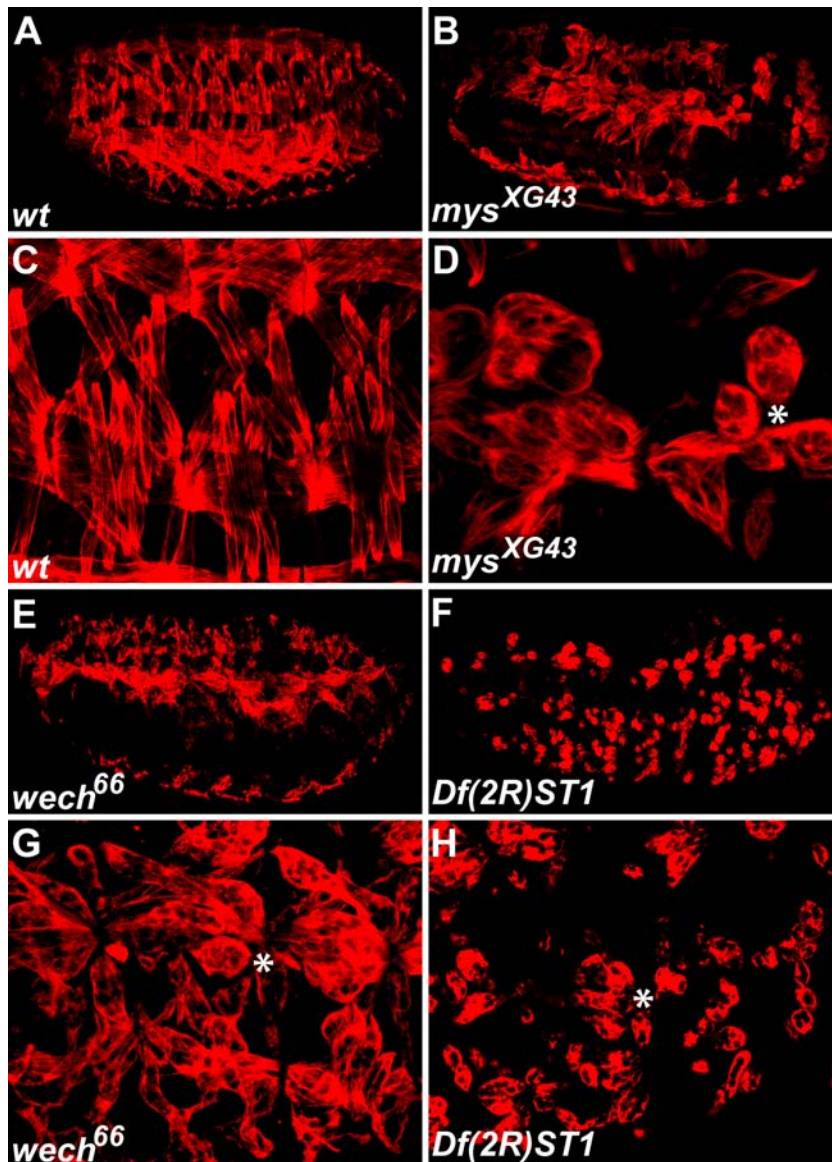


Abb. 4.14: Muskelphänotypen der *myospheroid*- und *wech*-Mutanten. **A:** wildtypische Embryonen zeigen ein stereotypes Muster der Muskeln in jedem Segment. **C:** Vergrößerung der Segmente A3 und A4 aus **A**. Im Vergleich dazu ist dieses Muster in *myospheroid*-Mutanten nicht mehr vorhanden und die Muskeln sind abgerundet und nicht mehr untereinander und mit der Epidermis verbunden (**B** und **D**). Einen ähnlichen Phänotyp mit sich abrundenden Muskeln zeigen *wech*-Mutanten (**E** und **G**). Dieser ist in der *wech*-Defizienz noch verstärkt (**F** und **H**). Das Aktinzytoskelett der Muskeln wurde mit Phalloidin angefärbt. Die Sterne (*) kennzeichnen abgerundete und abgelöste Muskeln (**D**, **G** und **H**).

Der weitaus schwächere Muskelphänotyp der *wech*⁶⁶-Mutante im Vergleich zu der β PS-Integrinmutante könnte auf die starke maternale Komponente von *wech* zurückzuführen sein. Um dies näher zu charakterisieren, wurde FRTG13 mit der *wech*⁶⁶-Mutante rekombiniert, so dass mit Hilfe einer Flippase die Genfunktion von *wech* auch maternal

ausgeschaltet werden kann (vgl. 3.12.10).

Durch die Erzeugung maternal und zygotischer *wech*-Nullmutanten konnte der embryonale Phänotyp mit den abgerundeten und zum Teil abgelösten Muskeln verstärkt werden. Die abgelösten Muskeln sind in den Nullmutanten schon zu Beginn des Embryonalstadiums 15 deutlich zu erkennen (Abb. 4.15), so dass der Phänotyp eher dem der β PS-Integrinmutante entspricht (vgl. Abb. 4.14 B und D).

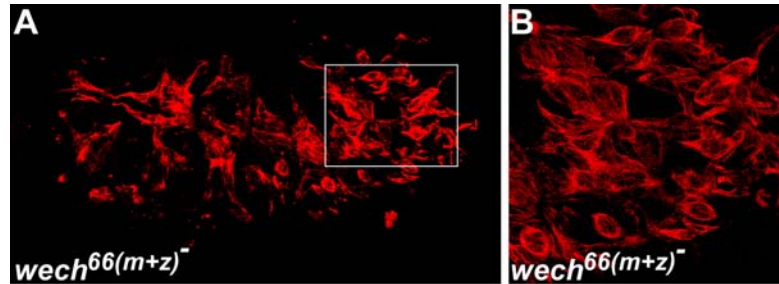


Abb. 4.15: Maternale und zygotische *wech*-Mutante. A: Die maternale und zygotische *wech*-Nullmutante weist deutlich mehr abgerundete Muskeln im Vergleich zu der zygotischen *wech*-Mutante auf. B: Detail des in A markierten Bereichs. Die Muskeln wurden mit Phalloidin angefärbt.

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass die *wech*-Mutante einen ähnlichen Phänotyp wie die *myspheroid*-Mutante aufweist. Der *wech* mutante Phänotyp ist aber im Vergleich zu dem von *myspheroid*, der auch Defekte in der Ausbildung des Darms aufweist, ausschließlich auf die epidermale Muskelanhaftungsstelle beschränkt.

Um festzustellen, ob die abgerundeten Muskeln in der *wech* Mutante auf einen Zelladhäsionsdefekt oder einen Defekt bei der Myoblastenfusion zurückzuführen sind, wurde der DA1-Muskel bezüglich der Anzahl seiner Kerne untersucht. In wildtypischen Embryonen besitzt der DA1-Muskel zwischen neun und elf Kerne, die durch die Expression des Markerproteins Even-skipped gekennzeichnet sind. In Mutanten, bei denen die Fusion der Myoblasten gestört ist, weist der DA1-Muskel eine reduzierte Anzahl an Even-skipped exprimierenden Kernen auf (Paululat et al., 1999). Bei den 20 untersuchten Hemisegmenten der *wech*⁶⁶ Mutante besaßen alle analysierten DA1-Muskel zwischen neun und zehn Even-skipped positive Kerne, was darauf hindeutet, dass diese Mutanten einen Adhäsions- und keinen Fusionsdefekt aufweisen (Abb. 4.16, A und B). Neben der Analyse der DA1-Muskel wurden in *wech* mutanten Embryonen die Kerne der abgerundeten Muskeln in den abdominalen Segmenten A3 und A4 ausgezählt und mit denen von *myspheroid* Mutanten verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Mehrzahl der abgerundeten Muskeln vielkernig ist und in etwa denen von *myspheroid* Mutanten entspricht (Abb. 4.16, C). Dies bestätigt die Vermutung, dass der Verlust von *wech* keinen Fusionsdefekt, sondern Zelladhäsionsdefekte verursacht.

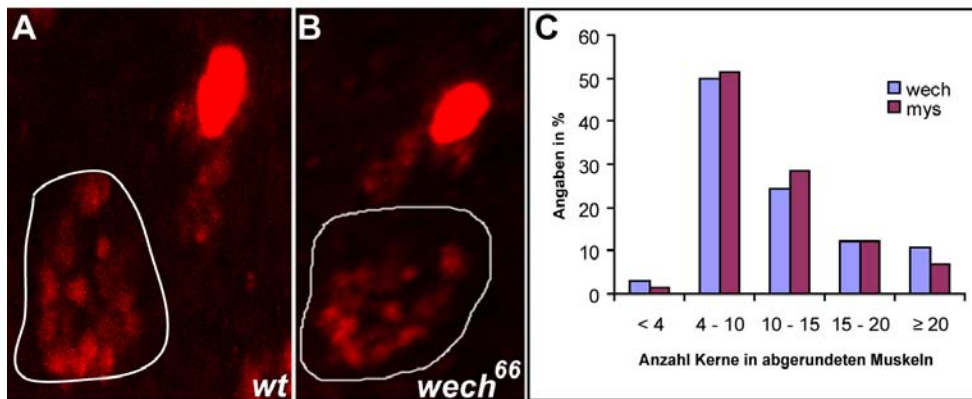


Abb. 4.16: Muskelphänotyp von *wech*⁶⁶ Mutanten. **A-B:** Even-Skipped Expression in den DA1-Muskeln eines Embryos in Stadium 15. Im Vergleich zum Wildtyp (**A**), mit neun bis elf Even-Skipped positiven Kernen, weisen die *wech*⁶⁶ Mutanten ebenfalls zwischen neun und zehn Even-Skipped positive Kerne auf (**B**). **C:** Vergleich der Anzahl an Kernen in abgerundeten Muskeln der Abdominal-segmente A3 und A4 von *wech* und *myspheroid* Mutanten.

4.6.5 Rettung des *wech* mutanten Phänotyps

Um zu zeigen, dass der mutante Phänotyp von *wech* durch die ektopische Expression von Wech in den entsprechenden Geweben gerettet und damit auf den Verlust von *wech* zurückgeführt werden kann, wurde das WechGFP-Fusionsprotein in den pUAST-Vektor kloniert und durch Injektion transgene Fliegenlinien hergestellt. Die so erzeugten Fliegen, die das Konstrukt in ihr Genom integriert haben, wurden in dem folgenden Experiment verwendet. Da Wech sowohl in den mesodermalen Muskeln, als auch in der epidermalen Tendonzelle exprimiert ist (vgl. Abb. 4.8), wurde für die Rettung des *wech* mutanten Phänotyps eine Kombination aus dem tendonzellspezifischen Treiber *stripe*-Gal4 und dem muskelspezifischen Treiber *mef2*-Gal4 verwendet. Die Expression des WechGFP-Fusionsproteins in beiden Zellen führt zu einer vollständigen Rettung des embryonal letalen Phänotyps (Abb. 4.17, C). Dagegen kann durch die Expression des WechGFP-Fusionsproteins in nur einer der beiden Zellen der Phänotyp nicht vollständig gerettet werden. Ein Teil der Embryonen ist noch embryonal letal. So kann durch die Expression in der Tendonzelle die Letalität zu 84,99% und durch die Expression in den Muskeln die Letalität zu 86,9% gerettet werden. Bei der Kombination aus den beiden Treiberlinien erhält man dagegen eine Rettung des Phänotyps von 92,8%, die in etwa der entspricht, wenn man einen ubiquitären Treiber wie *hs*-Gal4 verwendet (93,19%) (Abb. 4.17, D).

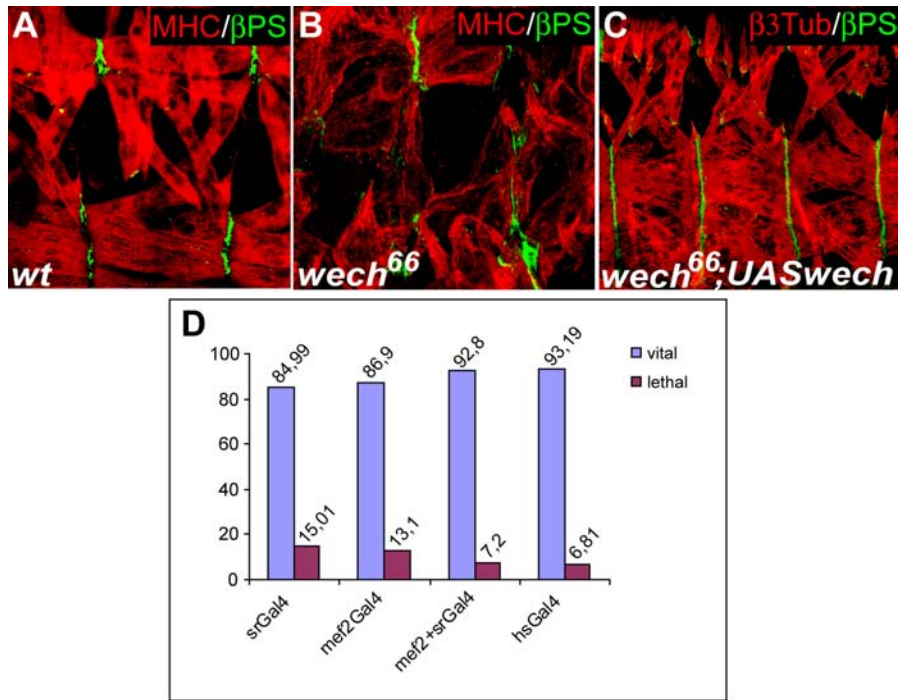


Abb. 4.17: Rettung des *wech* mutanten Phänotyps. **A-C:** Im Vergleich zu den Muskelfekten der *wech*⁶⁶ Mutante (**B**), kann durch Expression eines WechGFP-Fusionsproteins in den Muskeln und der epidermalen Tendonzelle dieser Phänotyp gerettet werden (**C**) und entspricht dem Wildtyp (**A**). **D:** Rettung des *wech* mutanten Phänotyps unter Verwendung verschiedener Treiberlinien. Angegeben sind die Prozentigkeiten der überlebenden und letalen Embryonen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der in der *wech* Mutante identifizierte Phänotyp auf den Verlust der *wech* Expression zurückzuführen ist, und durch die ektopische Expression in der epidermalen Tendonzelle und den mesodermalen Muskeln in den Mutanten gerettet werden kann. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die abgelösten und abgerundeten Muskeln keinen Fusionsdefekt aufweisen, und der Phänotyp von *wech* daher, ähnlich dem von *myspheroid*, auf einen Verlust der Zelladhäsion zurückzuführen ist. Aufgrund dessen wurde im Folgenden die Funktion von Wech bei der integrin-vermittelten Zelladhäsion näher charakterisiert.

4.7 Die Rolle von Wech in der integrin-vermittelten Zelladhäsion

4.7.1 Lokalisation von Wech in β PS-Integrin-Mutanten

Um festzustellen, welche Rolle Wech bei der integrin-vermittelten Zelladhäsion spielt, wurde die Expression von Wech in β PS (*myspheroid*)-Mutanten untersucht. In wildtypischen Embryonen zeigt Wech eine starke kortikale Anreicherung in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle (Abb. 4.18 A). Diese kortikale Akkumulation von Wech geht in

zygotischen *myspheroid*-Mutanten verloren. In diesen Mutanten ist die Proteinexpression reduziert, und das Protein diffus in der Muskelanhaftungsstelle verteilt. Des Weiteren zeigt es eine teilweise zytoplasmatische Lokalisation (Abb. 4.18 B).

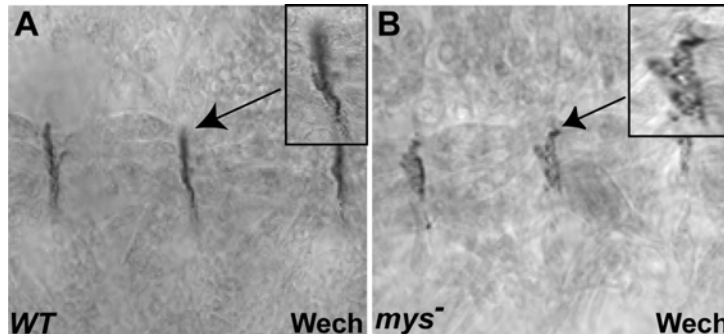


Abb. 4.18: Expression von Wech in *myspheroid*-Mutanten. **A:** in wildtypischen Embryonen ist Wech kortikal in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle exprimiert. **B:** in zygotischen *myspheroid*-Mutanten ist die kortikale Akkumulation von Wech verloren gegangen, und Wech ist auch an anderen Stellen im Zytoplasma exprimiert. Dargestellt sind epidermale Muskelanhaftungsstellen von einem Embryo in Stadium 17. Die Ausschnitte zeigen jeweils eine Vergrößerung der Muskelanhaftungsstelle

Diese Daten deuten darauf hin, dass β PS-Integrin für die Lokalisation von Wech in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle erforderlich ist.

4.7.2 Expression von Integrinen in *wech*-Mutanten

Um zu bestätigen, dass die kortikale Lokalisation von Wech in der Muskelanhaftungsstelle von den Integrinrezeptoren abhängig ist, wurde als Vergleich die Expression von Integrinen in *wech*-Mutanten untersucht.

Wie in Abbildung 4.19 anhand der lateralen epidermalen Muskelanhaftungsstellen gezeigt, weist sowohl das β PS-Integrin (Abb. 4.19 A-C) als auch das α PS2-Integrin (Abb. 4.19 G-I) in wildtypischen Embryonen eine deutliche Expression in den lateralen epidermalen Muskelanhaftungsstellen auf. Daneben erkennt man auch leichte Expression in den Anhaftungsstellen der einzelnen Muskeln untereinander (Abb. 4.19 B und H, Pfeile). Diese Expression der beiden Integrine verändert sich in *wech*-Mutanten, im Vergleich zu der Wech-Expression in *myspheroid*-Mutanten, nicht. Sowohl das β PS-Integrin als auch das α PS2-Integrin sind in den *wech*-Mutanten noch in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle exprimiert (Abb. 4.19 D-F und J-L). Des Weiteren konnte auch kein Verlust der Expression in den Anhaftungsstellen der Muskeln untereinander beobachtet werden. Auch hier sind die Integrine α PS2 und β PS weiterhin wie in den wildtypischen Embryonen exprimiert (Abb. 4.19 E und K, Pfeile).

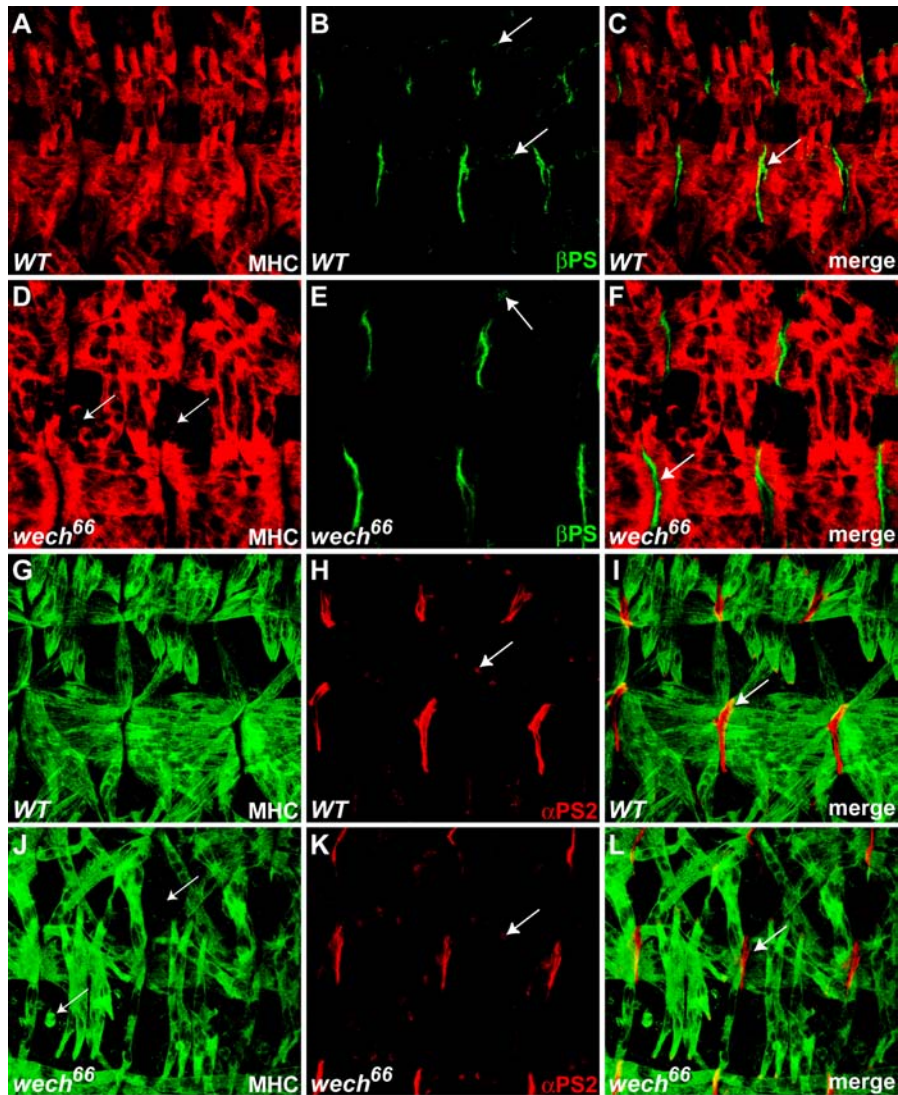


Abb. 4.19: Expression von α PS2- und β PS-Integrinen in *wech*-Mutanten. A-C: Expression von β PS in den Muskelanhaftungsstellen von wildtypischen Embryonen (Pfeil in C). B: der Pfeil deutet auf β PS-Expression an den Kontaktstellen zwischen zwei Muskeln. D-F: Die Expression von β PS ist unverändert in *wech*⁶⁶-Mutanten (Pfeile in E und F). G-H: α PS2 ist vergleichbar wie β PS in den Muskelanhaftungsstellen von wildtypischen Embryonen exprimiert (Pfeil in H). I: der Pfeil deutet auf α PS2-Expression an den Kontaktstellen zwischen zwei Muskeln. J-L: In *wech*⁶⁶-Mutanten zeigt α PS2 keine Veränderung der Expression in den Muskelanhaftungsstellen (Pfeile in K und L).

Um auszuschließen, dass die korrekte Lokalisation von α PS2- und β PS-Integrin in zygotischen *wech*-Mutanten auf die maternale Komponente von Wech zurückzuführen ist, wurde die Expression von β PS, das sowohl in den Muskeln als auch in der Tendonzelle exprimiert ist, in maternalen und zygotischen Nullmutanten von *wech* untersucht.

Hierbei zeigte sich, dass der Phänotyp von *wech* bezüglich dem Verlust der integrinvermittelten Zelladhäsion im Vergleich zu den zygotischen Mutanten noch verstärkt ist (vgl. Abb. 4.14 E). Dort, wo in den maternalen und zygotischen Nullmutanten die ab-

gerundeten Muskeln noch in Kontakt stehen oder mit der epidermalen Tendonzelle verbunden sind, findet man weiterhin eine Expression des dort exprimierten β PS-Integrins (Abb. 4.20 A - D, Pfeile in B und D).

In diesem Zusammenhang wurde des Weiteren die Lokalisation von Wech in maternalen und zygotischen Nullmutaten von β PS-Integrin (*myspheroid*) näher analysiert. Da Wech embryonal erst spät in den Muskelanhaftungsstellen eine Expression zeigt, die *myspheroid* maternalen und zygotischen Mutanten aber einen Keimbanddefekt aufweisen und somit früh in der Embryogenese sterben, wurde die Expression von Wech in diesen Mutanten in den Oozyten charakterisiert (Abb. 4.20 E und F). In wildtypischen Oozyten ist Wech membranständig in einem punktuellen Muster exprimiert (Abb. 4.20 E). Diese membranständige Expression ist in Oozyten von maternalen und zygotischen *myspheroid*-Nullmutanten nicht mehr vorhanden. Es findet sich immer noch eine punktuelle Expression von Wech, die aber nicht mehr lokalisiert an der Plasmamembran, sondern diffus im Zytoplasma zu finden ist (Abb. 4.20 F).

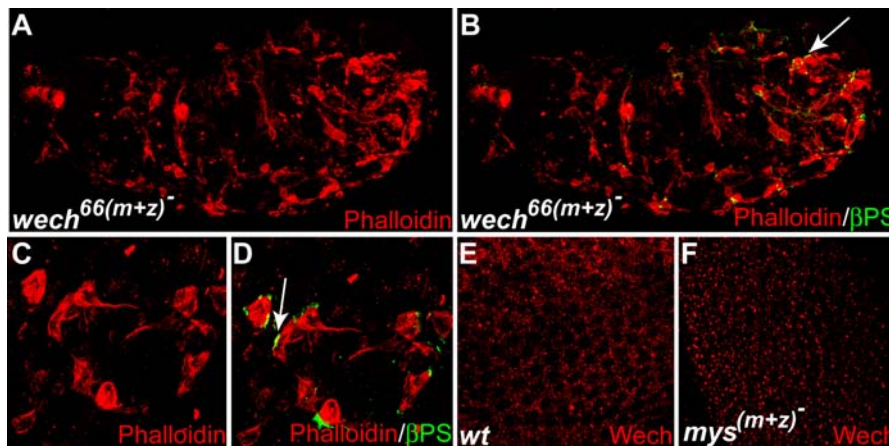


Abb. 4.20: Expression des muskel- und tendonzellspezifischen β PS-Integrins in maternalen und zygotischen *wech*-Nullmutanten A-D: in maternalen und zygotischen *wech*-Nullmutanten ist der Verlust der integrin-vermittelten Zelladhäsion mit abgerundeten Muskeln deutlich ausgeprägt. β PS-Integrin-Expression ist aber weiterhin an den Kontaktstellen zwischen zwei Muskeln und der Epidermis vorhanden (Pfeil in B und D). Im Vergleich zu wildtypischen Oozyten (E) zeigt Wech keine membranständige Expression mehr in *myspheroid* maternalen und zygotischen Nullmutanten (F). Die Muskeln in A-D wurden mit Phalloidin angefärbt.

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass speziell der β PS-Integrin-Rezeptor für die Lokalisation von Wech in den epidermalen Muskelanhaftungsstellen verantwortlich ist. Darüber hinaus können aufgrund der oben genannten Ergebnisse die für *wech*-Mutanten typischen abgerundeten und zum Teil fehlenden Muskeln nicht auf einen Verlust der Integrin-Funktion zurückgeführt werden, da sowohl das α PS2-Integrin als auch das β PS-Integrin in den *wech*-Mutanten keine veränderte Proteinexpression aufweisen. Trotzdem zeigen sie die für diese Mutanten typischen Verluste der integrin-vermittelten Zelladhä-

sion. Zur weiteren Charakterisierung der verminderten Zelladhäsion in *wech*-Mutanten wurde aus diesem Grund der sogenannte zytoplasmatische Integrin-Komplex näher untersucht.

4.7.3 Wech und der zytoplasmatische Integrin-Komplex

Die Hauptkomponenten des Integrin-assoziierten Proteinkomplexes sind Talin, Integrin-linked kinase (ILK) und Tensin (siehe 1.4). Diese Komponenten sind mit dem Aktinzytoskelett verbunden und verknüpfen es so mit den Integrinrezeptoren an der Plasmamembran. Fehlt eines der Proteine aus dem Komplex, ist die integrin-vermittelte Zelladhäsion gestört, und führt im Fall der Muskulatur zu abgerundeten und von der Epidermis abgelösten Muskeln (Brown et al., 2002; Torgler et al., 2002; Zervas et al., 2001). Neben den genannten Hauptkomponenten ist PINCH eine weitere, in den Komplex involvierte Komponente. Clark et al. (2003) konnten zeigen, dass PINCH die Funktion von ILK beeinflusst, indem es direkt an ILK bindet, oder einen Faktor rekrutiert, der für die Modifikationen von ILK verantwortlich ist.

In Abbildung 4.21 sieht man eine schematische Darstellung der bisher nachgewiesenen Interaktionen zwischen den Integrinrezeptoren, den Komponenten des Proteinkomplexes und dem Aktinzytoskelett.

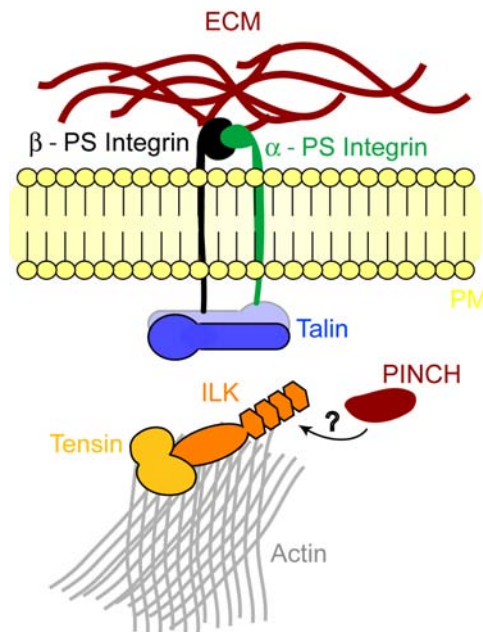


Abb. 4.21: Modell der Interaktionen zwischen dem integrin-assoziierten Proteinkomplex und den Integrinrezeptoren. ILK und Tensin binden an das Aktinzytoskelett, wogegen Talin als Homodimer direkt mit dem β PS-Integrinrezeptor in der Plasmamembran interagiert. Der Integrinrezeptor, bestehend aus einem α - und β PS-Heterodimer, ist extrazellulär mit der Extrazellulären-Matrix verbunden. PINCH bindet direkt oder über einen zusätzlichen Faktor an ILK (gekennzeichnet durch Pfeil und ?).

Das zytoplasmatische Protein Talin bindet als antiparalleles Homodimer direkt an den zytoplasmatischen C-terminalen Teil des β PS-Integrinrezeptors. Die Interaktion von Talin mit dem Integrinrezeptor führt zur Akkumulation von Integrinen an dieser Stelle und ebenso zur Aktivierung der Integrine („inside-out signalling“). Durch die Aktivierung sind die Integrine nun in der Lage mit Komponenten der extrazellulären Matrix zu interagieren und dadurch das sogenannte „outside-in signalling“ zu vermitteln (Hynes, 2002).

Die weiteren Komponenten des integrin-assoziierten Proteinkomplexes, ILK und Tensin, sind direkt mit dem Aktinzytoskelett verbunden. Hierbei ist zu beachten, dass ILK für die korrekte Lokalisation von Tensin in dem Proteinkomplex verantwortlich ist. Fehlt die ILK-Funktion, ist Tensin nicht mehr in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle lokalisiert (Torgler et al., 2003). Darüber hinaus kommt bei einem Verlust der ILK-Funktion keine Interaktion des Aktinzytoskeletts mit der Plasmamembran zustande (Zervas et al., 2001).

Ob die Komponenten ILK/Tensin und Integrinrezeptor/Talin miteinander interagieren, und ob für diese putative Interaktion weitere Proteine benötigt werden, ist unbekannt.

Koexpression von Wech mit den Komponenten des integrin-assoziierten Proteinkomplexes

Um festzustellen, ob Wech mit den Komponenten des integrin-assoziierten Proteinkomplexes kolokalisiert, wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt (Abbildung 4.22).

Dargestellt sind jeweils dorsale, epidermale Muskelanhaftungsstellen. Die Proteine des integrin-assoziierten Komplexes zeigen, genauso wie β PS-Integrin (vgl. Abb. 4.8), eine basale Lokalisation in der Tendonzelle. Dasselbe gilt für Wech, dass mit allen vier gezeigten Komponenten, Talin (Abb. 4.22, A-C), ILK (Abb. 4.22, D-F), Tensin (Abb. 4.22, G-I), und PINCH (Abb. 4.22, J-L) kolokalisiert. Hierbei ist zu beachten, dass die Expression von ILK und Tensin mit Hilfe eines GFP-Fusionsproteins erreicht wurde. Dabei wurde das jeweilige Fusionsprotein unter dem entsprechenden endogenen Promotor exprimiert, so dass eine wildtypische Expression des Proteins beobachtet werden konnte.

Auffällig bei den Expressionsstudien war, dass die Kolokalisation von Wech mit den Komponenten des integrin-assoziierten Proteinkomplexes nur in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle auftritt, und nicht etwa im Vorder- oder Hinterdarm, wo zum Beispiel ILK und Tensin, genauso wie Integrine, ebenfalls exprimiert sind.

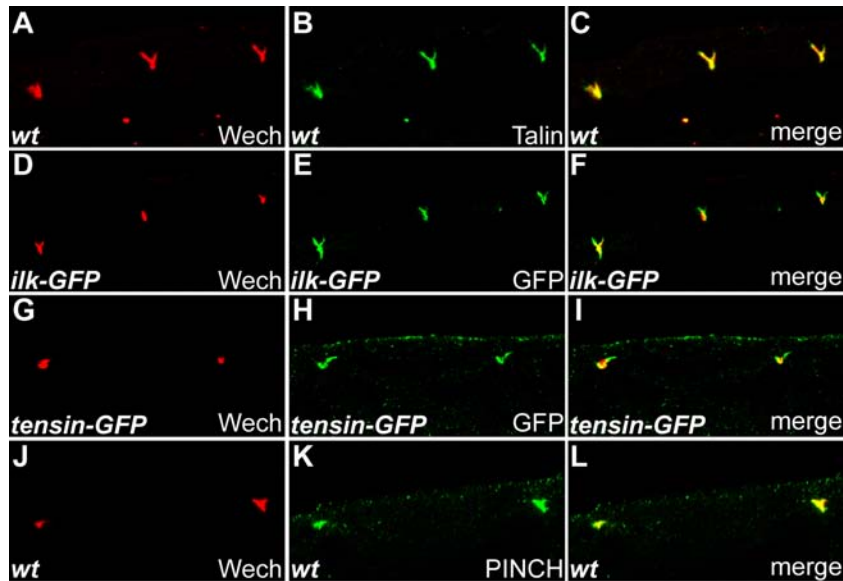


Abb. 4.22: Koexpression von Wech mit dem integrin-assoziierten Proteinkomplex. **A-C:** Kolokalisation von Wech mit dem zytoplasmatischen Protein Talin. **D-F:** ILK-GFP und Wech sind in der Muskelanhaftungsstelle koexprimiert. **G-I:** Wech kolokalisiert mit Tensin. **J-L:** Kolokalisation von PINCH mit Wech. Dargestellt sind dorsale, epidermale Muskelanhaftungsstellen. *wt* = Wildtyp

Fehllokalisierung von Wech in *tal*-Mutanten

Bei der Analyse zur Charakterisierung, welche der Komponenten des integrin-assoziierten Proteinkomplexes für die Expression von Wech in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle verantwortlich sind, wurde mit Talin begonnen, das direkt mit dem Integrinrezeptor verbunden ist (vgl. Abb. 4.21).

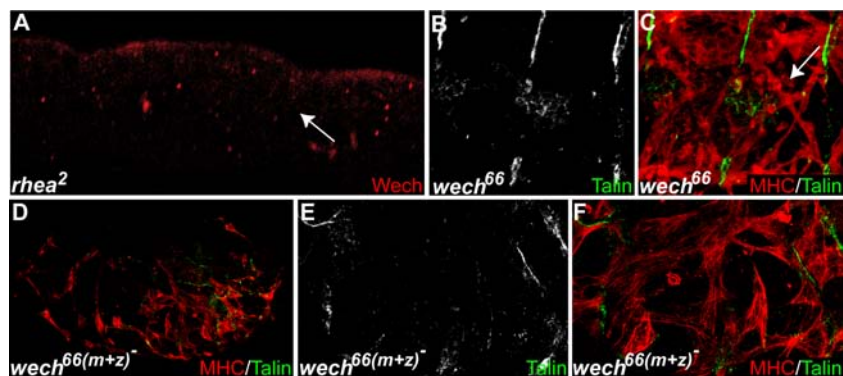


Abb. 4.23: Expression von Talin in *wech*-Mutanten. **A:** In *tal* (*rhea*²) Mutanten ist Wech nicht mehr in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle lokalisiert (Pfeil). **B-C:** in zygotischen *wech*-Mutanten zeigt Talin dagegen weiterhin eine Expression in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle. Pfeil in **C** deutet auf abgerundete Muskeln. **D-F:** Die Expression von Talin bleibt auch in maternalen und zygotischen *wech*-Nullmutanten erhalten. **E-F** sind Vergrößerungen von **D**.

In *talin* (*rhea*²) Mutanten ist Wech nicht mehr in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle lokalisiert (Abb. 4.23 A). Im Vergleich dazu zeigt Talin weder in zygotischen *wech*-Mutanten (Abb. 4.23, B-C), noch in maternalen und zygotischen *wech*-Nullmutanten eine Fehllokalisierung (Abb. 4.23, D-F). Die Expression von Talin in diesen Mutanten ist vergleichbar mit der von β PS-Integrin (vgl. Abb. 4.20).

Die oben gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Expression von Wech vermutlich der von Talin nachgeschaltet ist. Um dies genauer zu untersuchen, wurde die Expression der beiden anderen Komponenten des integrin-assoziierten Proteinkomplexes, ILK und Tensin, deren Lokalisation wiederum von Talin abhängig ist, näher analysiert.

ILK- und Tensin-Expression in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle sind von Wech abhängig

In dem integrin-assoziierten Proteinkomplex sind ILK und Tensin die beiden Komponenten, die direkt mit dem Aktinzytoskelett verbunden sind (vgl. Abb. 4.23). Die Expressionsanalyse der ILK- und Tensin-GFP-Fusionsproteine in *wech*-Mutanten zeigt, dass beide Proteine in den epidermalen Muskelanhaftungsstellen fehllokalisiert sind. In *wech*-Mutanten ist die Expression von ILK im Vergleich zum Wildtyp stark reduziert, und nur noch teilweise in den lateralen Muskelanhaftungsstellen vorhanden (Abb. 4.24, C-D, Pfeile in C). Dagegen ist die Expression von Tensin in den lateralen Muskelanhaftungsstellen von *wech*-Mutanten nicht mehr detektierbar (Abb. 4.24, G-H, Pfeil in G). Dies ist auf die durch den Verlust von Wech stark reduzierte Expression von ILK in den Muskelanhaftungsstellen zurückzuführen, da in den *wech*-Mutanten keine ausreichende Menge an ILK in den epidermalen Muskelanhaftungsstellen vorhanden ist, um Tensin in den Proteinkomplex zu rekrutieren.

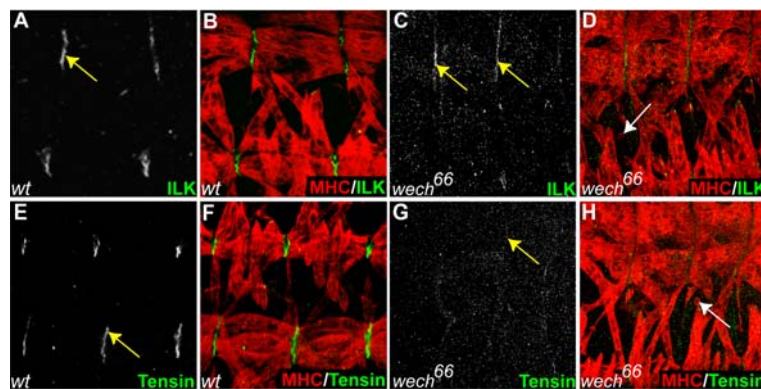


Abb. 4.24: Fehllokalisierung von ILK und Tensin in *wech*-Mutanten. Im Vergleich zur ILK-Expression in der Muskelanhaftungsstelle in wildtypischen Embryonen (A-B, Pfeil in A), ist die ILK-Expression in *wech*-Mutanten deutlich reduziert (C-D, Pfeil in C). Tensin, das ebenfalls im Wildtyp in der Muskelanhaftungsstelle exprimiert ist (E-F, Pfeil in E), zeigt keine Expression in *wech*-Mutanten (G-H, Pfeil in G). Die Pfeile in D und H deuten auf abgerundete Muskeln in den *wech*-Mutanten. Dargestellt sind laterale, epidermale Muskelanhaftungsstellen.

Zur Bestätigung, dass Wech für die Rekrutierung und Expression von ILK und Tensin in die epidermale Muskelanhaftungsstelle verantwortlich ist, wurde die Expression und Lokalisation von Wech in *ilk*-Mutanten untersucht. Die *ilk*-Mutanten weisen ebenfalls einen Verlust der integrin-vermittelten Zelladhäsion auf, und sind durch von der Epidermis abgelöste und abgerundete Muskeln gekennzeichnet.

Es zeigte sich, dass die Wech-Expression in den *ilk*-Mutanten weder reduziert ist, noch eine Fehllokalisierung des Proteins vorliegt (Abb. 4.25, Pfeil in B). Aus diesen Experimenten ließ sich schließen, dass Wech für die Lokalisation und Expression der beiden mit dem Aktinzytoskelett verbundenen integrin-assoziierten Proteine, ILK und Tensin, in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle verantwortlich ist.

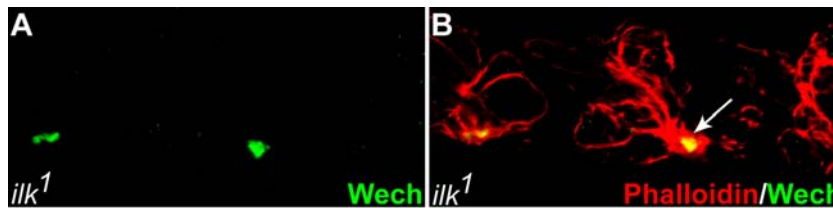


Abb. 4.25: Expression von Wech in *ilk*-Mutanten. A-B: Wech zeigt keine Fehllokalisierung oder eine Reduktion der Expression in *ilk*-Mutanten (Pfeil in B). B: *ilk*-Mutanten sind ebenfalls durch einen Verlust der integrin-vermittelten Zelladhäsion, einhergehend mit abgerundeten Muskeln, gekennzeichnet. Die Muskeln wurden mit Phalloidin angefärbt.

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass Wech eine wichtige Rolle für die korrekte Lokalisation von ILK, und somit auch Tensin, in den epidermalen Muskelanhaftungsstellen spielt. Darüber hinaus wird Talin, das mit dem zytoplasmatischen Teil des Integrinrezeptors interagiert, für die Rekrutierung von Wech in die epidermale Muskelanhaftungsstelle benötigt. Ob die Lokalisation von Wech in der Muskelanhaftungsstelle von Talin oder von β PS-Integrin abhängig ist, kann anhand der oben gezeigten Ergebnisse nicht eindeutig geklärt werden, da erst durch die Interaktion von Talin mit β PS-Integrin die Integrin-Heterodimere in der Membran angereichert werden, und somit die Akkumulation von Integrin-Heterodimeren eine Rekrutierung von Wech in die Muskelanhaftungsstellen auslösen kann.

Wech interagiert mit ILK

Um zu untersuchen ob Wech mit ILK interagiert, wurden biochemische Analysen durchgeführt. Hierzu wurden HeLa-Zellen mit einem Wech-Myc-Fusionsprotein, sowie verschiedenen ILK-Flag Fusionsproteinen kotransfiziert. Zur Charakterisierung der ILK-Interaktionsdomäne wurden zu diesem Zweck die N-terminalen Ankyrin-Wiederholungen sowie die C-terminale Proteinkinasedomäne als Flag-Fusionsprotein exprimiert (Abb. 4.26, A).

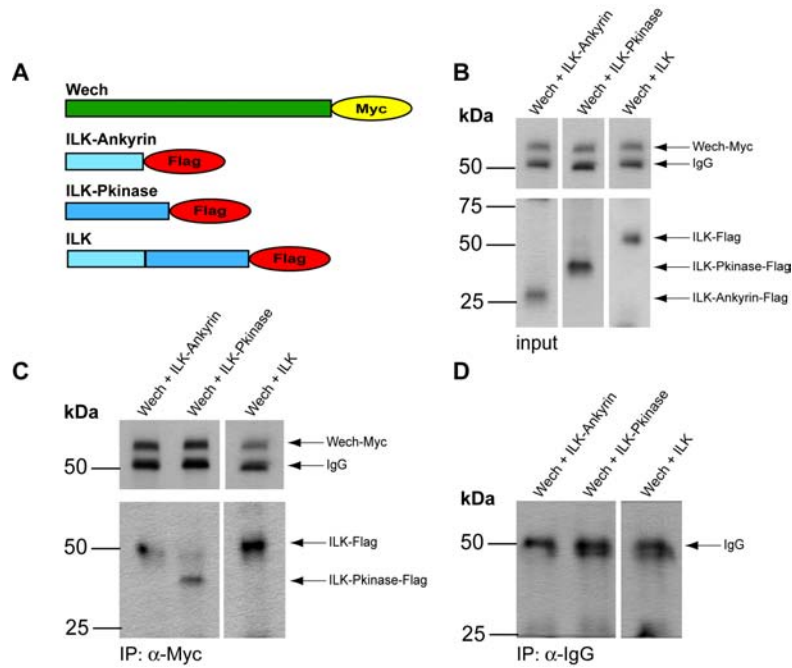


Abb. 4.26: Wech interagiert mit der Proteinkinase-Domäne von ILK. **A:** Schema der Wech- und ILK-Fusionsproteine. **B:** Expression der kotransfizierten Wech-Myc Fusionsproteine mit entweder dem ILK-Ankyrin-Flag, dem ILK-Pkinase-Flag und dem ILK-Flag Fusionsprotein. **C:** Koimmunpräzipitation des Wech-Myc Fusionsproteins mit dem jeweiligen ILK-Flag Fusionsprotein. Wech interagiert mit ILK, speziell mit der Pkinase-Domäne von ILK, nicht aber mit der ILK-Ankyrindomäne. **D:** Kontrolle der IP mit anti-Maus-Immunglobulinen. **IP** = Immunpräzipitation; **Pkinase** = Proteinkinasedomäne; **IgG** = Immunglobulin.

Vor Durchführung der Koimmunpräzipitation wurde die Expression der verschiedenen Fusionsproteine in den Lysaten der HeLa-Zellen kontrolliert. Abbildung 4.26 B zeigt, dass alle transfizierten Fusionsproteine in HeLa-Zellen exprimiert werden. Aufgrund dieses Ergebnisses konnte dann mit der Koimmunpräzipitation der verschiedenen Proteinkomplexe begonnen werden. Für die Immunpräzipitation wurde ein anti-Myc-Antikörper (9E10, Santa Cruz), sowie als Kontrolle normale Maus-Immunglobuline eingesetzt. In dem folgenden Western-Blot wurde der anti-Flag-Antikörper (M2, Sigma) zur Detektion der an das Wech-Myc-Fusionsprotein gebundenen ILK-Proteinkomplexe eingesetzt. Hierbei stellte sich heraus, dass Wech in der Lage ist mit ILK zu interagieren, und diese Interaktion speziell mit der Proteinkinasedomäne von ILK erfolgt (Abb. 4.26, C). Neben der Immunpräzipitation wurde die erfolgreiche Anreicherung der Wech-Myc-Fusionsproteine als interne Kontrolle mittels des Myc-Antikörpers im Western-Blot nachgewiesen (Abb. 4.26 C, oberer Western-Blot). In ebenfalls durchgeführten Negativkontrollen mit den normalen Maus-Immunglobulinen konnte keines der Signale von der Immunpräzipitation für die Flag-Fusionsproteine erhalten werden (Abb. 4.26, D). So ist eine direkte Interaktion zwischen Wech und ILK für die Rekrutierung des ILK/Tensin-Proteinkomplexes durch Wech in die epidermale Muskelanhaftungsstelle verantwortlich.

Zur Charakterisierung welche Domäne von Wech für die Interaktion mit der Proteinkinase-Domäne von ILK verantwortlich ist, wurden zwei Wech-Myc-Fusionsproteine hergestellt, die zum einen eine Deletion der N-terminalen BCC-Domäne, sowie der C-terminalen NHL-Domäne aufweisen (Abb. 4.27, A). Diese Wech-Deletionskonstrukte, sowie das Wech-Myc-Fusionskonstrukt, wurden, zusammen mit dem ILK-Pkinase-Flag-Fusionskonstrukt, in HeLa-Zellen kotransfiziert. Die Effizienz der Transfektion bzw. der Nachweis der verschiedenen Fusionsproteine ist in Abbildung 4.27 B gezeigt. Alle hergestellten Extrakte enthalten eine Kombination aus ILK-Pkinase-Flag Fusionsprotein und dem entsprechenden Wech-Myc Fusionsprotein. Die Immunpräzipitation dieser Proteinextrakte mit dem anti-Myc Antikörper und anschließendem Western-Blot mit dem anti-Flag Antikörper zeigt, dass die BCC-Domäne von Wech für die Interaktion mit der ILK-Proteinkinasedomäne verantwortlich ist (Abb. 4.27, C). In den Kontrollen der Immunpräzipitation mit den normalen Maus-Immunglobulinen konnte keines der Signale von der Immunpräzipitation für das Flag-Fusionsprotein erhalten werden (Abb. 4.27, D).

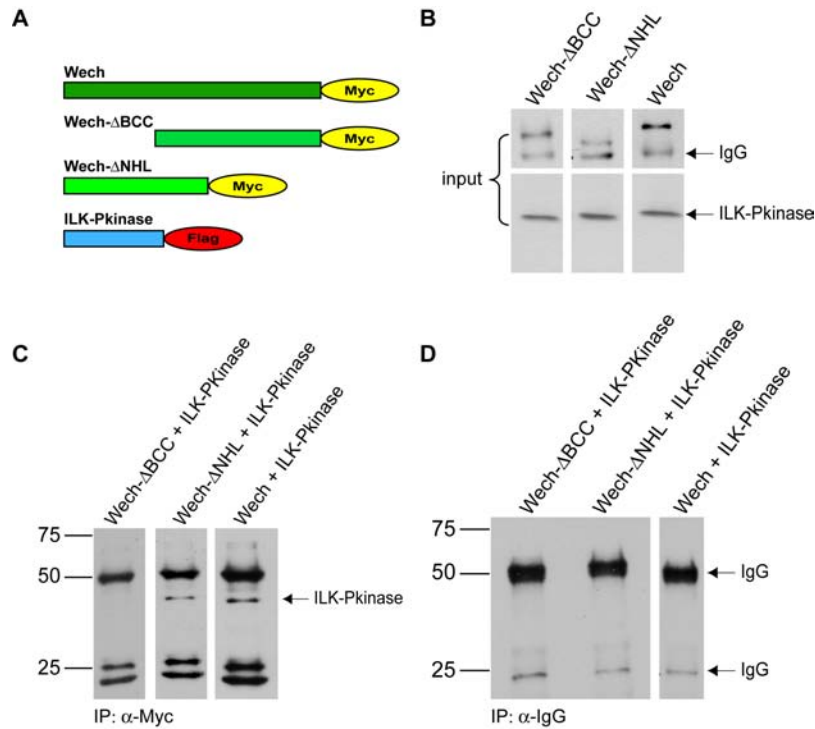


Abb. 4.27: Die BCC-Domäne von Wech ist für die Interaktion mit ILK verantwortlich. **A:** Schema der Wech- und ILK-Fusionsproteine. **B:** Expression der kotransfizierten Wech-Myc Fusionsproteine mit dem ILK-Pkinase-Flag Fusionsprotein. **C:** Koimmunpräzipitation der Wech-Myc Fusionsproteine mit dem ILK-Pkinase-Flag Fusionsprotein. Die Interaktion von ILK mit Wech erfolgt über die BCC-Domäne. Bei Deletion dieser Domäne kann keine Interaktion nachgewiesen werden. **D:** Kontrolle der IP mit anti-Maus-Immunglobulinen. **IP** = Immunpräzipitation; **Pkinase** = Proteinkinasedomäne; **IgG** = Immunglobulin.

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass Wech mit ILK interagiert, und diese Interaktion über die N-terminale BCC-Domäne von Wech mit der C-terminalen Proteinkinasedomäne von ILK erfolgt.

Talin interagiert über seine Kopf-Domäne mit Wech

Aufgrund der in *talin*-Mutanten mittels Immunfluoreszenzfärbung festgestellten Fehllokalisation von Wech, wurde in weiteren biochemischen Experimenten untersucht, ob Wech mit Talin interagiert. Hierzu wurde ein GST-Wech Fusionsprotein, sowie der leere pGEX-Vektor als Kontrolle, in *E.coli* BL21-Zellen transformiert und durch Zugabe von IPTG die Expression des Fusionsproteins induziert. Als Kontrolle diente jeweils ein Ansatz bei dem das Fusionsprotein nicht durch Zugabe von IPTG induziert wurde. Die nach Ernte der Bakterienkulturen aufgereinigten Proteinkomplexe wurden im Anschluss bei einer Immunpräzipitation mit wildtypischen Embryolysat eingesetzt. Eine mögliche Interaktion zwischen Talin und Wech wurde mit Hilfe des anti-Talin Antikörpers analysiert (Abb. 4.28).

Nur in dem Ansatz mit dem GST-Wech Fusionsprotein kann ein Signal mit dem anti-Talin Antikörper erhalten werden. Dies deutet darauf hin, dass Wech ein Interaktionspartner von Talin ist.

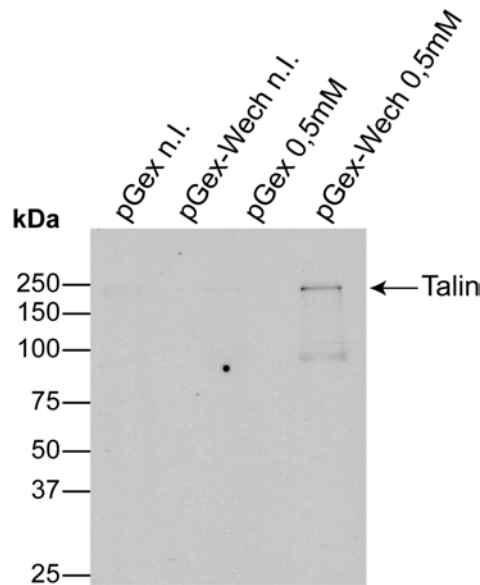


Abb. 4.28: Interaktion des GST-Wech Fusionsproteins mit Talin. Proteinextrakte aus Bakterien mit induziertem und nicht induziertem GST-Wech Fusionsprotein wurden mit einem Proteinextrakt aus wildtypischen Embryonen inkubiert und der anschließende Immunoblot mit dem anti-Talin Antikörper detektiert. Das Ergebnis zeigt, dass nur im Fall des induzierten GST-Wech Fusionsproteins ein Signal mit dem anti-Talin Antikörper nachgewiesen werden kann. Das errechnete Molekulargewicht von Talin beträgt 264 kDa. **pGex:** GST-Protein; **pGex-Wech:** GST-Wech Fusionsprotein; **n.I.:** nicht induziert; **0,5mM:** mit der entsprechenden Menge an IPTG induziertes Fusionsprotein.

Talin besitzt zwei Domänen, eine N-terminale Kopf- und eine C-terminale Schwanz-Domäne. Zur genaueren Analyse, welche der beiden Domänen von Talin für die Interaktion mit Wech verantwortlich ist, wurde die Kopf-Domäne von Talin zusammen mit dem Wech-Myc Fusionskonstrukt und den Wech-Deletionskonstrukten in HeLa-Zellen koexprimiert. Eine Interaktion der verschiedenen Fusionsproteine wurde anschließend durch Koimmunpräzipitation untersucht.

Bei diesem Experiment bestätigte sich die Interaktion zwischen Wech und Talin aus der Koimmunpräzipitation mit dem GST-Wech Fusionsprotein und dem wildtypischen Embryolysat (vgl. Abb. 4.28). Es zeigte sich, dass die Interaktion zwischen Wech und Talin über die Kopf-Domäne von Talin erfolgt (Abb. 4.29, A). Dagegen können beide Wech-Domänen, sowohl die N-terminale BCC-Domäne, als auch die C-terminale NHL-Domäne diese Interaktionen vermitteln. Dabei ist zu beachten, dass die Interaktion zwischen der BCC-Domäne und Talin weitaus stärker ist als zwischen der NHL-Domäne und Talin (Abb. 4.29, A; schwächere Interaktion mit der NHL-Domäne durch roten Stern markiert). Die unterschiedliche Affinität der beiden Domänen zu Talin wurde mit Hilfe der Quantity One Software (Biorad) bestimmt, indem die in jedem Ansatz vorhandenen IgG-Banden als Normalisierungswert genommen und in Relation zu dem spezifischen Signal gesetzt wurden. Es zeigte sich, dass Talin eine 7fach höhere Affinität zu der BCC-Domäne im Vergleich zu der NHL-Domäne besitzt.

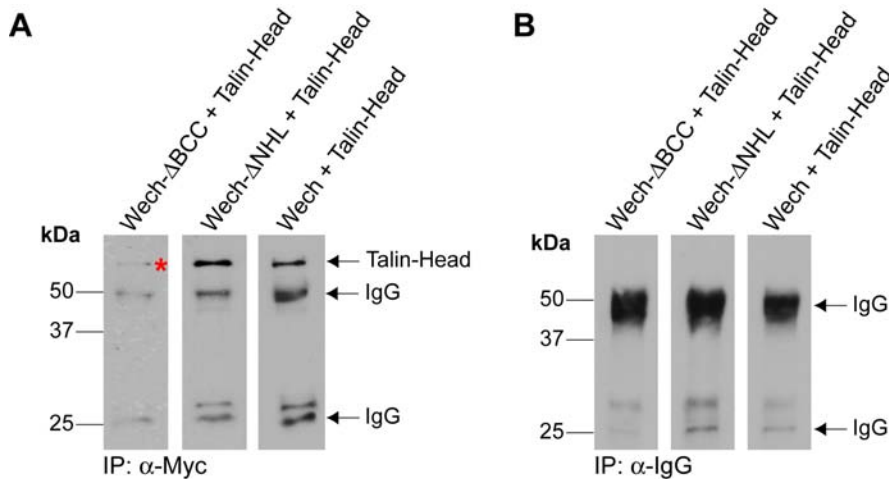


Abb. 4.29: Talin interagiert über die Kopf-Domäne mit Wech. **A:** Immunpräzipitation der verschiedenen Wech-Myc Fusionsproteine mit dem Talin-Head-Flag Fusionsprotein. Die Immunpräzipitation erfolgte mit dem anti-Myc Antikörper, der Western-Blot wurde mit dem anti-Flag Antikörper detektiert. Die Interaktion zwischen Talin und Wech wird über die Kopf-Domäne von Talin vermittelt. Wech interagiert über die BCC- und NHL-Domäne mit Talin, wobei die NHL-Domäne eine weitaus schwächere Interaktion zeigt (roter Stern). **B:** Kontrollen der Immunpräzipitation. Die Immunpräzipitation wurde mit den anti-Maus Immunglobulinen durchgeführt, und für den Western-Blot der anti-Flag Antikörper verwendet. Es kann keine spezifische Bande für ein Fusionsprotein nachgewiesen werden.

Abschließend lässt sich festhalten, dass Wech und Talin miteinander interagieren, und dass diese Interaktion über die Kopf-Domäne von Talin erfolgt. Auf Seiten von Wech wird die Interaktion primär von der BCC-Domäne vermittelt, kann aber auch, sollte keine BCC-Domäne vorhanden sein, über die NHL-Domäne erfolgen.

4.7.4 Modell der integrin-vermittelten Zelladhäsion in der Muskelanhaftungsstelle

Für die integrin-vermittelte Zelladhäsion in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle spielt, neben den mit der extrazellulären Matrix verbundenen Integrinrezeptoren, die immer aus einem α - und β -Integrin-Heterodimer bestehen, der zyttoplasmatische integrin-assoziierte Proteinkomplex eine entscheidende Rolle. In diesem Proteinkomplex befinden sich die Proteine Talin, ILK, Tensin, PINCH und Wech, das eine Schlüsselrolle spielt. Abbildung 4.30 gibt schematisch das Modell der integrin-vermittelten Zelladhäsion in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle wieder.

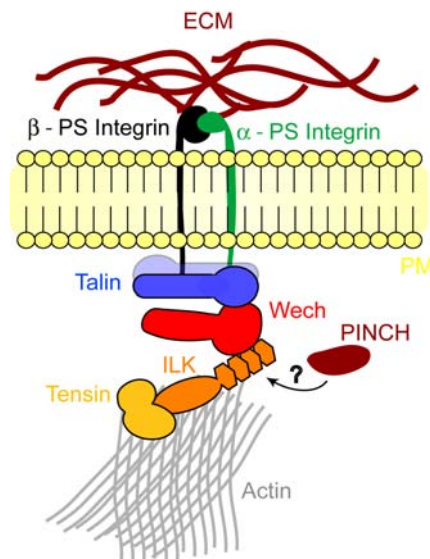


Abb. 4.30: Schema der Wech-Interaktionen in der integrin-vermittelten Zelladhäsion. Wech verbindet die beiden Proteinkomplexe über seine direkten Interaktionen mit Talin und ILK zu einem funktionalen Komplex.

Das zu dem integrin-assoziierten Proteinkomplex gehörende Talin interagiert mit dem zytoplasmatischen Teil der β PS-Untereinheit des Integrin-Heterodimers. Diese Interaktion führt zur Aktivierung und in Folge dessen zur Anreicherung der Integrine, und schafft dadurch die Voraussetzung für das sogenannte „inside-out signalling“ und, verbunden mit der Akkumulation von Integrinrezeptoren auch die Voraussetzung für das „outside-in signalling“. Neben Talin spielen die Proteine ILK und Tensin eine entscheidende Rolle bei der Verbindung der Integrinrezeptoren mit dem Aktinzytoskelett. ILK bindet direkt

an das Aktinzytoskelett und festigt diese Bindung durch Rekrutierung von Tensin, das ebenfalls eine Verbindung mit dem Aktinzytoskelett eingeht. Wie dieser Komplex aus ILK, Tensin und Aktinzytoskelett mit Talin und den Integrinrezeptoren in Verbindung steht war bisher unklar. Es stellte sich heraus, dass Wech hierbei eine entscheidende Rolle spielt. Wech interagiert sowohl mit ILK/Tensin, die eine Verbindung zum Aktinzytoskelett haben, als auch mit Talin, das mit den Integrinrezeptoren verbunden ist. Somit wirkt Wech als Verbindungsprotein zwischen den beiden Komplexen und rekrutiert über seine Verbindung mit ILK das Aktinzytoskelett zu den Integrinrezeptoren und Talin, wodurch die integrin-vermittelte Zelladhäsion möglich gemacht wird. Die Funktion von PINCH in diesem Zusammenhang ist noch unklar, da bisher keine direkte Interaktion zwischen PINCH und ILK bzw. PINCH und Wech nachgewiesen werden konnte.

4.8 Die BCC- und NHL-Domäne sind *in vivo* für die Funktion von Wech essentiell

Da durch Koimmunpräzipitationsexperimente nachgewiesen wurde, dass Wech bei der integrin-vermittelten Zelladhäsion aufgrund seiner Interaktionen mit Talin und LK, die durch die N-terminale BCC und C-terminale NHL-Domäne vermittelt werden, eine wichtige Rolle spielt, wurde die Funktion dieser Domänen *in vivo* näher analysiert. Hierzu wurden die beiden Deletionskonstrukte, Wech Δ BCC-Myc und Wech Δ NHL-Myc, mit Hilfe des *stripe*-Gal4-Treibers überexprimiert. Dabei zeigte sich, dass die Überexpression dieser Fusionsproteine zu einem dominant-negativen Effekt führt. Die Muskeln zeigen auch hier, wie bei der *wech*-Mutante, einen Adhäsionsdefekt, lösen sich von der epidermalen Muskelanhaftungsstelle und runden sich ab (Abb. 4.31, Pfeile in B und E).

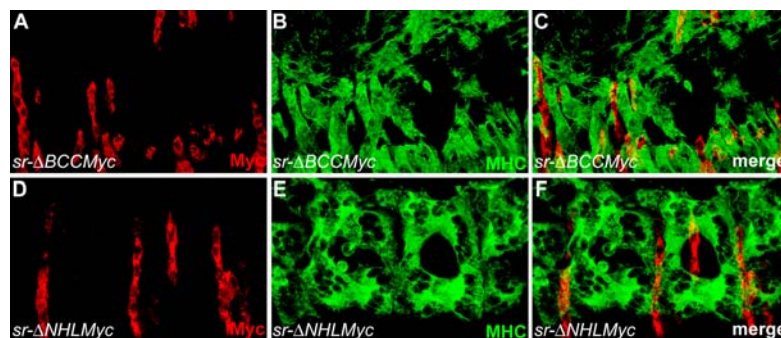


Abb. 4.31: Überexpression der Deletionskonstrukte der BCC- und NHL-Domäne führen zu einem dominant-negativen Effekt. **A-C:** Das Wech Δ BCC-Myc Fusionsprotein wurde mit dem *stripe*-Gal4-Treiber in der Tendonzelle überexprimiert und zeigt die für Stripe typische Expression in den Muskelanhaftungsstellen (**A**). Die Muskeln sind, wie in den *wech*-Mutanten, teilweise abgelöst (Pfeil in **B**). **D-F:** Überexpression des Wech Δ NHL-Myc Fusionsproteins mit dem *stripe*-Gal4-Treiber. **D** zeigt die Überexpression mit Myc. In **E** ist der Muskelphänotyp dargestellt.

Um den in Abbildung 4.31 gezeigten Phänotyp eingehender zu analysieren, wurde die Expression der Deletionskonstrukte anhand von Kofärbungen mit β PS-Integrin und Talin näher untersucht (Abb. 4.32).

In diesem Experiment zeigte sich, dass die beiden Deletionsvarianten im Zytoplasma akkumulieren und nicht mehr basal in der Tendonzelle exprimiert werden (Abb. 4.32, C, E, G und I). Sie zeigen somit keine oder nur eine schwache Kolo­kalisierung mit β PS-Integrin (Abb. 4.32, D und H) sowie Talin (Abb. 4.32, F und J). Im Vergleich dazu zeigt die Überexpression von Wech weiterhin eine basale Lokalisation in der Tendonzelle (Abb. 4.32, A), sowie eine fast vollständige Kolo­kalisierung mit β PS-Integrin (Abb. 4.32, B). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass sowohl die BCC als auch die NHL-Domäne von Wech *in vivo* für die Interaktion mit den Komponenten der integrin-vermittelten Zelladhäsion benötigt werden.

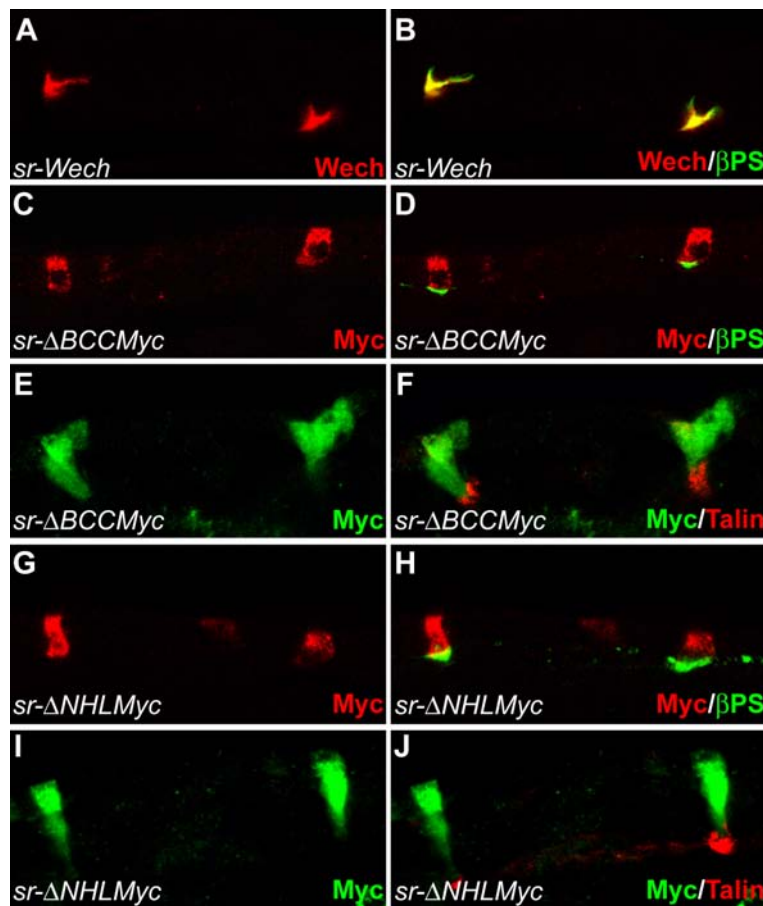


Abb. 4.32: Fehllokalisierung der Wech-Deletionsproteine in der Tendonzelle. A-B: Die Überexpression von Wech mit dem *stripe*-Gal4-Treiber führt zu keiner Veränderung in der Lokalisation von Wech. C-F: Die Überexpression von Wech Δ BCC-Myc mit dem *stripe*-Gal4-Treiber zeigt, dass das Fusionsprotein im Zytoplasma akkumuliert (C und E) und nicht mehr mit den basal lokalisierten Komponenten des Integrin-Komplexes, β PS und Talin, kolokalisiert (D und F). G-J: Die Überexpression von Wech Δ NHL-Myc mit dem *stripe*-Gal4-Treiber zeigt ebenfalls eine Akkumulation des Fusionsproteins im Zytoplasma (G und I). Ebenso kolokalisiert das Deletionsprotein nicht mit β PS und Talin (H und J).

In Embryonen von *Drosophila melanogaster* bilden sich zwischen der Tendonzelle und den Muskeln Verbindungen aus, in deren Spalt sich Material der extrazellulären Matrix befindet. Diese Struktur bezeichnet man als epidermale Muskelanhaftungsstelle. Sie bildet die Basis für die mechanischen Kräfte, die benötigt werden, um den Muskelkontraktionen in der Larve Stand zu halten. Es konnte gezeigt werden, dass Wech eine neue und essentielle Komponente dieser Muskelanhaftungsstelle darstellt. Wech verbindet die Integrinrezeptoren mit dem Aktinzytoskelett in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle, indem es direkt mit der Kopfdomäne von Talin und der Proteinkinase-Domäne von ILK interagiert, und so die beiden Hauptkomponenten des integrin-assoziierten Proteinkomplexes miteinander verbindet. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass für diese Interaktionen die BCC- und NHL-Domäne von Wech essentiell sind.

4.9 Identifikation von potentiellen Wech-Interaktionspartnern mit Hilfe des Ras-Recruitment-Systems

Zur Identifikation von weiteren potentiellen Interaktionspartnern des Wech-Proteins wurde eine embryonale *Drosophila* cDNA-Bank mit Hilfe des „Ras-Recruitment“-Systems (Cyto-Trap Vector Kit; Stratagene) durchsucht.

Das Cytotrap-System beruht auf folgendem Prinzip:

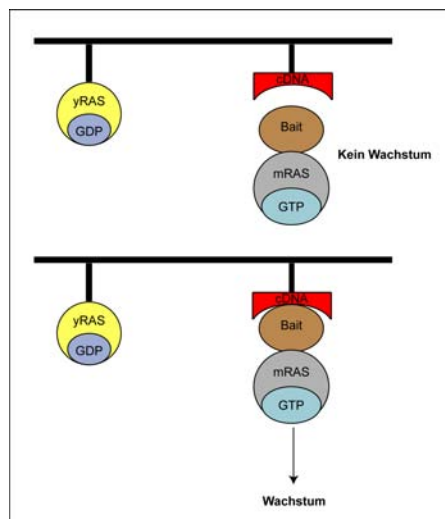


Abb. 4.33: Schematische Darstellung des „Ras-Recruitment“-Systems. Das Zielprotein (cDNA) ist über ein Myrestilierungssignal in der Zellmembran verankert. Das Köderprotein bindet bei einer Interaktion an das Zielprotein, wodurch das konstitutiv aktive mRas an die Zellmembran transportiert wird und die Ras-Signalkaskade aktiviert. Dadurch sind die mutanten *cdc25*-Hefen befähigt bei 37 °C zu wachsen.

Das „Ras-Recruitment“-System verwendet den temperatursensitiven *cdc25*-Hefestamm. Dieser besitzt eine Punktmutation im *cdc25*-Gen, welches für einen Guanyl-Nukleotid-Austauschfaktor kodiert. Dieser bindet an Ras, aktiviert es, und leitet so die Ras-Signalkaskade ein. Durch das Einfügen der Punktmutation ist der Guanyl-Nukleotid-Austauschfaktor inaktiv und verhindert das Wachstum der Hefen bei 37 °C (restriktive Temperatur), nicht aber bei 25 °C (permissive Temperatur). Die Mutation in dem *cdc25*-Gen kann in dem konventionellen System (verwendet den pSOS-Vektor) durch das *hSos*-Genprodukt komplementiert werden. Das *hSos*-Genprodukt agiert als Nukleotid-austauschfaktor und aktiviert die Ras-Signalkaskade, indem es GDP an Ras gegen GTP austauscht. Dieser Schritt ist in dem konventionellen System recht kritisch, da der Nukleotidaustausch nicht immer zuverlässig durchgeführt wird. Daher wurde hier nicht der pSOS-Vektor mit dem *hSos*-Genprodukt eingesetzt, sondern der pADNS-RRS-Vektor. Dieser Vektor besitzt ein konstitutiv aktives Ras aus Säugern, welches das Ras aus der Hefe zu ungefähr 90% komplementiert. Daher wird, sobald eine Interaktion zwischen dem Ziel- und Köderprotein erfolgt, die Ras-Signalkaskade in der Hefe durch das konstitutiv aktive Ras aus Säugern angeschaltet. Die Hefen können nun bei 37 °C wachsen.

4.9.1 Klonierung des Köderplasmids

Die NHL-Domäne des Wech-Proteins, die für die Aminosäuren 549 bis 832 kodiert, wurde mit Hilfe der Oligonukleotide Wech-Ras-NHL-*Hind*III und Wech-Ras-NHL-*Sma*I aus der *wech* cDNA amplifiziert. Über die Schnittstellen *Hind*III und *Sma*I wurde die Sequenz in die Mehrfachklonierungsstelle des pADNR-RRS Vektors ligiert. Die ligierten und präparierten Plasmide wurden anschließend sequenziert.

4.9.2 Test des Köderplasmids auf Autoaktivierung

Um eine mögliche Autoaktivierung des Köderproteins auszuschließen wurde eine Positivkontrolle (pSOS DE-Cadherin + pMyr Armadillo), eine Negativkontrolle (pADNS + pMyr), sowie das Köderplasmid (pADNS-WechNHL) mit dem leeren pMyr-Vektor in Hefezellen transformiert. Die transformierten Hefezellen wurden für fünf Tage auf einer SD-Glukoseplatte bei 25 °C inkubiert und anschließend jeweils drei Kolonien von jedem Ansatz auf eine SD-Glukoseplatte und eine SD-Galaktoseplatte überimpft. Diese Platten wurden weitere fünf Tage bei der restriktiven Temperatur von 37 °C inkubiert. Nach diesen fünf Tagen waren auf der SD-Glukoseplatte keine Kolonien gewachsen, wogegen bei den Positivkontrollen auf der SD-Galaktoseplatte Kolonien zu sehen waren. Bei den Negativkontrollen sowie dem Köderplasmid mit dem leeren Vektor waren dagegen keine Kolonien zu erkennen (Abb. 4.34).

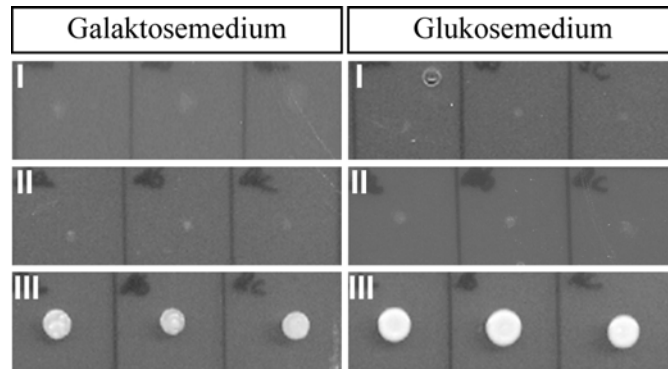


Abb. 4.34: Autoaktivierungstest der Wech-NHL-Domäne. Sowohl auf Galaktosemedium, als auch auf Glukosemedium kam es zu keinem Wachstum der Hefezellen, in die das Köderprotein zusammen mit dem pMyr-Vektor transformiert wurde (I). (II) stellt die Negativkontrolle da, (III) die Positivkontrolle.

Das Ergebnis zeigt, dass die NHL-Domäne von Wech weder an das auf Galaktose exprimierte Myrestilierungssignal selbst bindet, noch die Ras-Signalkaskade auf einem anderen Weg aktiviert. Die NHL-Domäne von Wech kann daher zur Suche nach neuen Interaktionspartnern verwendet werden.

4.9.3 Durchmusterung der *Drosophila* cDNA-Bank auf potentielle Interaktionspartner der WechNHL-Domäne

Von Köder- und Zielploid wurden jeweils 100 μg in kompetente Hefezellen kotransformiert und auf 30 SD-Glukoseplatten ausgestrichen und anschließend bei 25 °C (permissive Temperatur) inkubiert. Die durch die Kontrollplatte ermittelte Transformations-effizienz (siehe Methoden) betrug 12358 KfE/ μg . Nach vier Tagen Inkubation wurden die gewachsenen Kolonien mit Hilfe eines Filterabdrucks auf SD-Galaktoseplatten und SD-Glukoseplatten überimpft und bei der restriktiven Temperatur von 37 °C inkubiert. Kolonien, die auf den SD-Galaktoseplatten, nicht aber auf den SD-Glukoseplatten wuchsen, ließen die Vermutung zu, dass das transformierte Zielploid für einen möglichen Interaktionspartner des Wech-Proteins kodiert. Durch die Interaktion zwischen Köder- und Zielploid konnte die Punktmutation in dem *cdc25*-Gen komplementiert und so der Ras-Signalweg angeschaltet werden, wodurch den Hefen ein Wachstum bei 37 °C möglich war. Jeder einzelnen Kolonie wurde nun eine Nummer zugeordnet (1 - 682), und diese Kolonien abermals auf neue SD-Galaktose- bzw. SD-Glukoseplatten überimpft und wiederum bei 37 °C inkubiert. Nach vier Tagen zeigten noch 74 der 682 überimpften Kolonien Wachstum bei 37 °C.

Aus diesen 74 Kolonien wurde anschließend die pMyr-Plasmid-DNA aus den Hefezellen isoliert.

4.9.4 Isolierung der pMyr-Plasmid-DNA aus Hefezellen

Aus den 74 potentiell positiven Interaktionspartnern wurde die Plasmid-DNA gewonnen (siehe 3.11.1), in elektrokompetente Bakterien retransformiert und präparativ isoliert. Die transformierten Bakterien wuchsen nur dann auf Chloramphenikolplatten, wenn sie die pMyr-Vektor DNA enthielten. Die pADNS-Vektor DNA hingegen trug eine Ampizillinresistenz und ging den Bakterienklonen verloren. Aus den so selektierten Bakterienklonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und ein analytischer Restriktionsverdau durchgeführt.

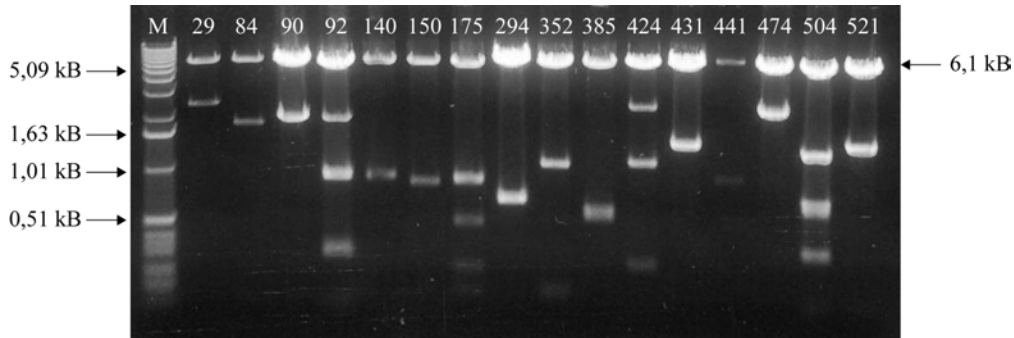


Abb. 4.35: Restriktionsverdau von potentiell positiven Interaktionspartnern. Der pMyr-Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* geschnitten. Die 6,1 kB Bande entspricht der Größe des pMyr-Vektors.

In allen 74 präparierten Klonen befand sich Ziel-DNA. Abbildung 4.35 zeigt den Restriktionsverdau von 16 potentiell positiven Interaktionspartnern.

4.9.5 Bestätigung der Interaktion von potentiell positiven Interaktionspartnern durch Retransformation in *cdc25*-Hefezellen

Zur Bestätigung der Interaktion zwischen der Wech-NHL-Domäne und dem Zielprotein sollte zum einen das Wachstum der potentiell positiven Klone bei 37 °C auf SD-Galaktoseplatten bestätigt werden, zum anderen sollte ausgeschlossen werden, dass die potentiell positiven Klone auch ohne Bindung an das Köderprotein den Ras-Signalweg aktivieren und somit bei 37 °C auf Galaktose wachsen können. Für diesen Test wurden die aus den Hefezellen isolierten Plasmide erneut in kompetente *cdc25*-Hefezellen kotransformiert und bei 25 °C für 4 Tage auf SD-Glukoseplatten inkubiert. Gleichzeitig wurden Autoaktivierungstests mit den Zielproteinen durchgeführt, indem die gefundenen Zielplasmide mit dem leeren pADNS-RRS-Vektor in Hefezellen kotransformiert wurden. Zusätzlich wurde wiederum eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle in die Hefen transformiert. Anschließend wurden von jedem Ansatz jeweils drei Kolonien auf SD-Galaktose- und auf SD-Glukoseplatten überimpft und bei 37 °C inkubiert.

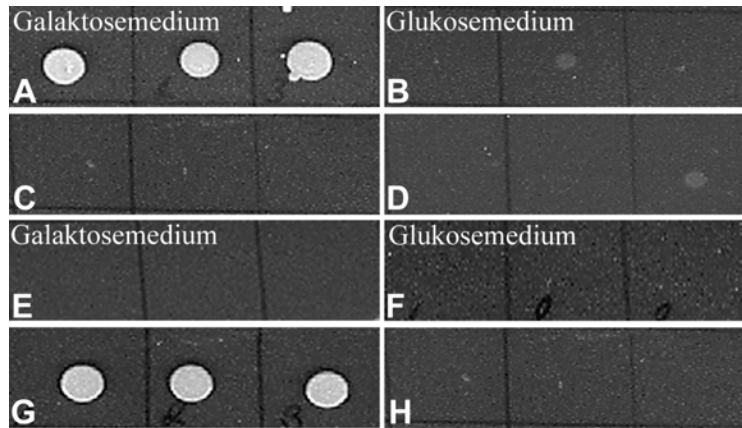


Abb. 4.36: Bestätigung der Interaktion zwischen Köder- und Zielplasmiden sowie Autoaktivierungstest der Zielplasmide. Hefezellen, transformiert mit Zielplasmid und Köderplasmid, wachsen bei 37 °C auf Galaktosemedium (**A**), jedoch nicht auf Glukosemedium (**B**). Der Test auf Autoaktivierung des Zielplasmids mit dem pADNS-RRS Vektor weist sowohl auf Galaktosemedium (**C**) als auch auf Glukosemedium (**D**) kein Wachstum bei 37 °C auf. Die Negativkontrolle (pMyr + pADNS-RRS) zeigt weder Wachstum auf Galaktosemedium (**E**), noch auf Glukosemedium (**F**). Dagegen weist die Positivkontrolle (pSos-DE-Cadherin + pMyr-Armadillo) ein Wachstum bei 37 °C auf Galaktosemedium (**G**) und kein Wachstum auf Glukosemedium (**H**) auf.

Alle 74 in diesem Retest eingesetzten Klone zeigten Wachstum bei 37 °C auf Galaktosemedium und kein Wachstum bei 37 °C auf Glukosemedium. Somit konnte die Interaktion zwischen Köder- und Zielplasmid in der Hefe bestätigt werden. Bei keinem der Klone konnte eine Autoaktivierung in Gegenwart des leeren pADNS-RRS-Vektors nachgewiesen werden (Abb. 4.36).

4.9.6 Sequenzanalyse der potentiell positiven Interaktionspartner

Von den 74 positiven Klonen wurden 56 mit Hilfe des 5'-pMyr-Oligonukleotids ansequenziert.

Die vollständigen Sequenzen der potentiell positiven Klone wurden anschließend in Aminosäuresequenzen übersetzt und mit Hilfe der *Drosophila*-Internet-Datenbank (<http://www.fruitfly.org>) auf funktionelle Domänen und Sequenzhomologien untersucht.

Als mögliche Interaktionspartner wurden folgende Klone identifiziert:

Klonnr.	CG-Nummer	Gennamen	Funktion/Domäne
29-1	CG1696	l(1)G0269	NLI-Interaktionsfaktor, Dullard-ähnliche Phosphatase-Domäne

4.9 Identifikation von potentiellen Wech-Interaktionspartnern

Klonnr.	CG- Nummer	Genname	Funktion/Domäne
84-1	CG5870	β -Spectrin	Aktinbindung, Spectrin/ Pleckstrin-Domänen
90-1	CG6117	cAMP abhängige Proteinkinase (Pka-C3)	C-terminale Tyrosin-Protein- kinase, Serin/Threonin Proteinkinase
92-1	CG5355		Lipase, Thioesterase Peptida- se S9
140-1	CG4696	Muskelprotein 20 (Mp20)	Zelladhäsion, Muskel- kontraktion, Calponin-Wiederholungen
150-1	CG10939	SRY interagierendes Protein 1 (Sip1)	PDZ-, DHR-, und GLGF- Domänen
175-2	CG9177	eIF-5	Kalziumbindung, EF-Hand Domäne
294-2	CG7971		RNA-Spaltung
352-1	CG33205		ZASP-PDZ-Domäne
385-1	CG16944	stress sensitive B (sesB)	ADP/ATP Transport mitochondriales Protein
424-1	CG3244		Typ C Lectin, Zuckerbindung
431-1	CG9429	Calreticulin (Crc)	ER-Erkennungssequenz, Kalziumionen-Bindung
441-1	CG1624	Wech	BBox-Zinkfingermotiv, BBox C-terminale Domäne, NHL- Domäne
474-1	CG3126	C3G	Guaninnukleotid- Austauschfaktor für Ras-ähnliche GTPasen
504-1	CG9075	eIF-4a	ATP-abhängige Helikase, DEAD/DEAH-Box Helikase
521-1	CG4863	ribosomales Protein L3 (RpL3)	Proteinbiosynthese, Translationsfaktor

Interessante Interaktionspartner stellen die Klone 84, 90, 140 und 441 dar, da sie weitere Hinweise auf die zuvor beschriebene biologische Funktion von Wech geben.

β -Spectrin (Klon 84), das als potentieller Interaktionspartner von Wech identifiziert werden konnte, besitzt sogenannte Spectrin/Pleckstrin-Domänen und ist eine strukturelle Komponente des Zytoskeletts (Thomas und Kiehart, 1994). β -Spectrin zeigt eine apikolaterale Lokalisation an der Plasmamembran und bindet unter anderem an Aktin und Mikrotubuli (Sisson et al., 2000). Neben β -Spectrin konnte auch die cAMP-abhängige Proteinkinase (Pka-C3, Klon 90) als möglicher Interaktionspartner von Wech identifiziert werden. Diese Proteinkinase gehört zur Klasse der Serin/Threonin-Proteinkinasen und ist zu Beginn der Embryogenese in den mesodermalen Anlagen exprimiert (Melendez et al., 1995). Neben der Phosphorylierung von Aminosäuren ist Pka-C3 an der Weiterleitung von Nervenimpulsen bei der Muskelkontraktion beteiligt. Ein weiterer möglicher Interaktionspartner von Wech ist das Muskelprotein 20 (Mp20, Klon 140). Mp20 weist als strukturelle Besonderheiten Calponin-Wiederholungen auf und ist in der Lage an Aktin zu binden und eine Funktion bei Zelladhäsionsprozessen zu übernehmen. Mp20 wird in sämtlichen Muskelgeweben exprimiert, mit Ausnahme der asynchronen Flügelmuskulatur (Ayme-Southgate et al., 1989). In den Muskeln ist Mp20 speziell bei Prozessen der Muskelkontraktion essentiell, da RNAi-Screens gezeigt haben, dass eine Herunterregulation von *mp20* mRNA zu abgerundeten und abgelösten Zellen führt, vergleichbar mit dem Phänotyp von Integrinmutanten (Kiger et al., 2003).

Interessant ist die Interaktion von Wech mit sich selbst, die über die NHL-Domäne vermittelt wird (Klon 441), da dies ein erster Hinweis darauf ist, dass Wech, genauso wie Talin, möglicherweise Homodimere bilden kann.

Neben den genannten potentiellen Interaktionspartnern interagiert Wech, wie eingangs erwähnt, auch mit dem *Drosophila* Gap Junction Protein Innexin3. Diese Interaktion konnte durch biochemische Experimente bestätigt werden (Löer, 2003). Aufgrund der Tatsache das Innexin3 epidermal exprimiert ist, sollte im Folgenden speziell die Funktion von Innexin3 und Wech in der Tendonzelle untersucht, und eine mögliche Abhängigkeit der beiden Interaktionspartner im Hinblick auf morphologische Defekte gezeigt werden.

4.10 Die Funktion des Gap Junction bildenden Proteins Innexin3 in der Tendonzelle

Innexine sind eine zu den Connexinen in Vertebraten analoge Genfamilie, die am Aufbau von Gap Junction Kanälen beteiligt sind (Phelan, 2005; Bauer et al., 2005). Durch diese Kanäle können die Zellen in Geweben und Organen untereinander kommunizieren

und dabei Ionen und Moleküle bis zu einer Größe von ca. 1 kDa austauschen. Obwohl die Innexine keinerlei Sequenzhomologien zu Connexinen zeigen, besitzen die beiden Proteinfamilien doch eine vergleichbare Proteinstruktur (Abb. 4.37).

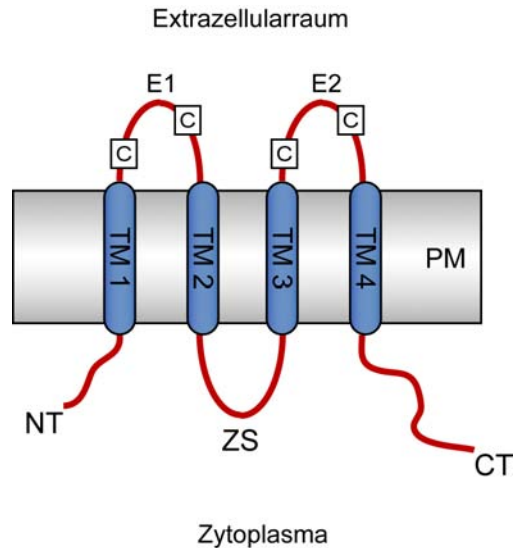


Abb. 4.37: Schematische Darstellung eines Innexin Proteins. Das Protein besteht aus vier Transmembrandomänen (TM1-TM4), zwei extrazellulären Schleifen (E1 und E2) mit jeweils zwei Cysteinen (C), einer zytoplasmatischen Schleife (ZS), sowie einem zytoplasmatischen Amino- (NT) und Carboxyterminus (CT). PM = Plasmamembran.

Innexine besitzen vier Transmembrandomänen, zwei extrazelluläre und eine zytoplasmatische Schleife, sowie einen zytoplasmatischen N- und C-Terminus. Interessanterweise findet man in den extrazellulären Schleifen der Innexine, wie auch bei den Connexinen, in einem definierten Abstand voneinander konservierte Cysteinreste.

Die Interaktion von Wech mit Innexin3 wurde mittels GST-Pulldown-Experimenten bestätigt. Darüber hinaus konnte im Rahmen dieser Experimente gezeigt werden, dass die NHL-Domäne von Wech die Interaktion mit dem zytoplasmatischen C-Terminus von Innexin3 vermittelt (Löer, 2003).

4.10.1 Innexin3 und Wech sind in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle koexprimiert

Aufgrund der Tatsache, dass das Gap Junction Protein Innexin3 über seinen C-Terminus mit der NHL-Domäne von Wech interagiert, wurde bei der Firma Davids (Regensburg) ein Peptidantikörper gegen den C-terminalen Teil des Innexin3 generiert, um eine mögliche Koexpression dieser beiden Proteine näher zu untersuchen. Die Spezifität des erzeugten anti-Innexin3 Antikörpers wurde biochemisch durch Immunoblot-Analysen von

aufgereinigten GST-Inx3-Fusionsproteinen und immunhistochemisch durch Färbungen an wildtypischen *Drosophila* Embryonen nachgewiesen (siehe 7.7).

Der Innexin3-Antikörper wurde dann für weitere Analysen des Expressionsmusters von Innexin3 in wildtypischen *Drosophila* Embryonen eingesetzt (Abb. 4.38). Das Expressionsmuster des gegen den Innexin3 C-Terminus gerichteten Antikörpers stimmt mit dem bereits auf seine Spezifität getesteten Antikörper gegen die zytoplasmatische Schleife überein (Löer, 2003). Innexin3 wird in der Epidermis, im Vorder- und Hinterdarm, und im Gehirn exprimiert (Abb. 4.38, A-F). Eine Besonderheit der epidermalen Expression ist die Anreicherung von Innexin3 in den Segmentgrenzen (Abb. 4.38, F). Interessanterweise ist mit dem neuen C-terminalen Antikörper eine zusätzliche Innexin3-Expression in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle nachweisbar (Abb. 4.38, G, H). Diese ist spezifisch, da der Antikörper bei dem Spezifitätstest in der Defizienz keine Expression in diesem Gewebe aufweist (Daten nicht gezeigt).

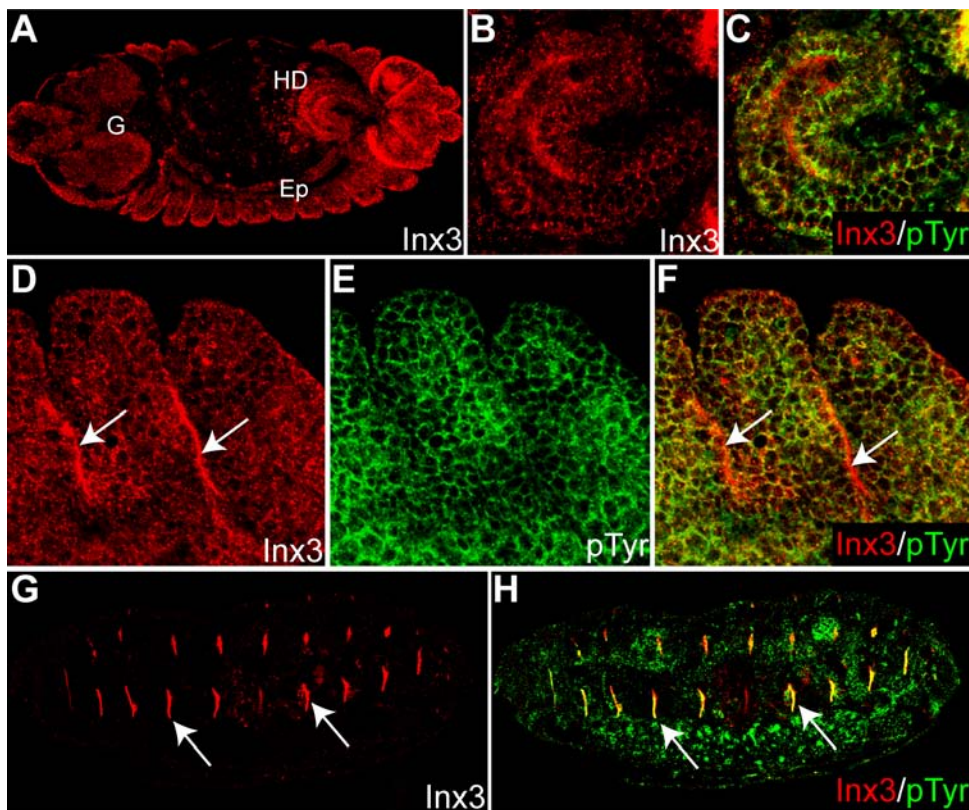


Abb. 4.38: Innexin3-Proteinexpression in wildtypischen *Drosophila* Embryonen. Als Membranmarker wurde Phosphotyrosin (pTyr) verwendet. **A:** Innexin3 ist in der Epidermis (**Ep**), dem Gehirn (**G**), sowie Vorder- (nicht in Fokusebene) und Hinterdarm (**HD**) exprimiert. **B, C:** Detail der punktierten Verteilung von Innexin3 im Hinterdarm. **D-F:** Auch die epidermale Expression ist punktiert, und überwiegend an der Plasmamembran lokalisiert. Eine verstärkte Expression findet man an den Segmentgrenzen (Pfeile in **D** und **F**). **G, H:** Der C-terminale Innexin3-Antikörper zeigt, im Vergleich zu dem gegen die zytoplasmatische Schleife gerichteten Antikörper, eine zusätzliche segmentale Expression, die der epidermalen Muskelanhaftungsstelle entsprechen könnte (Pfeile in **G** und **H**).

4.10 Die Funktion von Innexin3 in der Tendonzelle

Um festzustellen ob die Proteinexpression von Innexin3 in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle eventuell mit der von dem Interaktionspartner Wech, sowie der Integrine α PS2 und β PS übereinstimmt, wurden entsprechende Kofärbungen an wildtypischen Embryonen durchgeführt.

Abbildung 4.39 zeigt, dass Innexin3 mit den oben genannten Komponenten in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle kolokalisiert. Für Wech ist eine vollständige Kolokalisation mit Innexin3 in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle nachzuweisen (Abb. 4.39, A-E). Neben der Expression in der Tendonzelle findet man zusätzlich eine punktartige, membranständige Expression von Innexin3 in der Epidermis und dem Hinterdarm (Abb. 4.39, Pfeile in D und G). Allerdings ist in diesen Geweben das Wech-Protein nicht vorhanden. Genauso wie Wech zeigt Innexin3 auch eine Kolokalisation mit den Integrinen β PS und α PS2 in der Muskelanhaftungsstelle (Abb. 4.39 H, I und K-M). Zu beachten ist hier, dass keine vollständige Kolokalisation mit beiden Integrinen auftritt, und Innexin3 basal in der Tendonzelle lokalisiert ist. Des Weiteren zeigt Innexin3 keine Kolokalisation mit β PS-Integrin im Hinterdarm. β PS-Integrin ist apikal exprimiert, während die Proteinexpression von Innexin3 mehr lateral und basal in diesem Gewebe zu finden ist (Abb. 4.39, Pfeil in J).

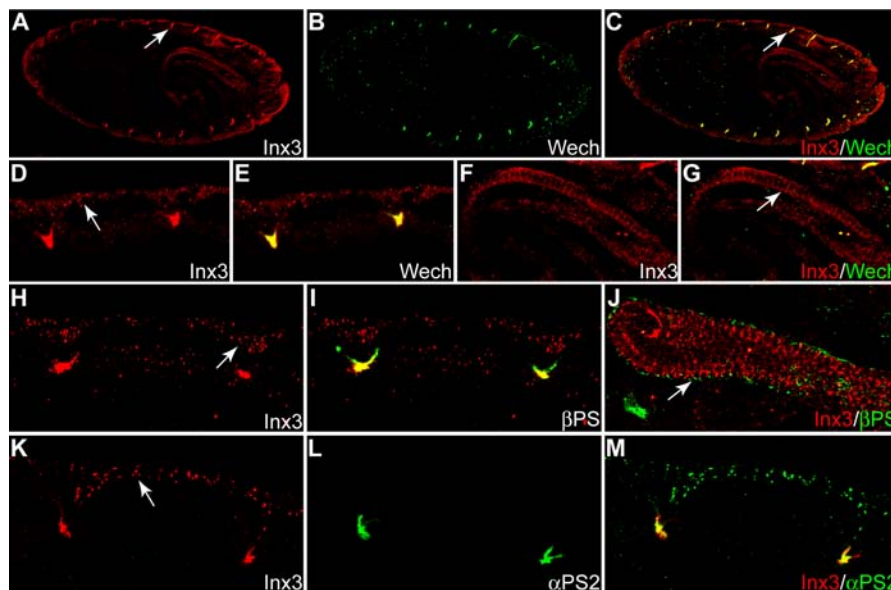


Abb. 4.39: Innexin3-Expression in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle. A-C: Übersicht eines wildtypischen Embryos. Innexin3-Expression findet sich in der Epidermis, dem Hinterdarm und der epidermalen Muskelanhaftungsstelle (Pfeil in A). Nur die Muskelanhaftungsstelle zeigt Kolokalisation mit Wech (Pfeil in C). D, E: Detail der Kolokalisation von Wech und Innexin3 in dorsalen Muskelanhaftungsstellen. Innexin3 zeigt zusätzlich eine punktartige Lokalisation in der Epidermis (Pfeil in D). F, G: Innexin3-Expression im Hinterdarm zeigt keine Kolokalisation mit Wech (Pfeil in G). H-J: Innexin3 kolokalisiert in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle teilweise mit β PS-Integrin, jedoch nicht im Hinterdarm (Pfeil in J). K-M: Innexin3 und α PS2-Integrin weisen ebenfalls eine auf die Muskelanhaftungsstelle beschränkte Kolokalisation auf. Pfeile in H und K weisen auf Proteinexpression von Innexin3 in der Epidermis.

Um festzustellen, ob Innexin3 eine zu Wech vergleichbare Funktion in der integrin-vermittelten Zelladhäsion aufweist, wurde im Folgenden der integrin-assoziierte Proteinkomplex näher analysiert.

4.10.2 Koexpression von Innexin3 mit den Komponenten des integrin-assoziierten Proteinkomplexes

Die Untersuchungen zur Funktion und Koexpression von Innexin3 mit den Proteinen des integrin-assoziierten Proteinkomplexes wurden mit den Hauptkomponenten Talin, Integrin-linked Kinase (ILK) und Tensin durchgeführt (Abb. 4.40). Hierbei zeigte sich, dass Innexin3 in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle sowohl mit Talin (Abb. 4.40 A-C), als auch mit ILK (Abb. 4.40, D-F) und Tensin (Abb. 4.40, K, L) kolokalisiert. Des Weiteren findet man in der Epidermis eine Expression von ILK, Tensin und Innexin3 (Abb. 4.40, G, H und M, N), wobei aber in diesem Gewebe keine Kolokalisation der Proteine festzustellen war. Innexin3 ist an der Plasmamembran in einer punktartigen Verteilung zu finden, während ILK mehr zytoplasmatisch lokalisiert ist (Abb. 4.40, Pfeil in H). Ähnliches gilt für Tensin. Allerdings ist hier eine teilweise Kolokalisation mit Innexin3 zu erkennen (Abb. 4.40, Pfeil in N). Diese lässt sich aber auf die Fokusebene der Aufnahme zurückführen, da sie nicht parallel zur Epidermis wie bei ILK lag. Darüber hinaus findet sich auch keine Kolokalisation der Proteine im Hinterdarm. Die Verteilung von ILK entspricht der von β PS-Integrin (siehe oben).

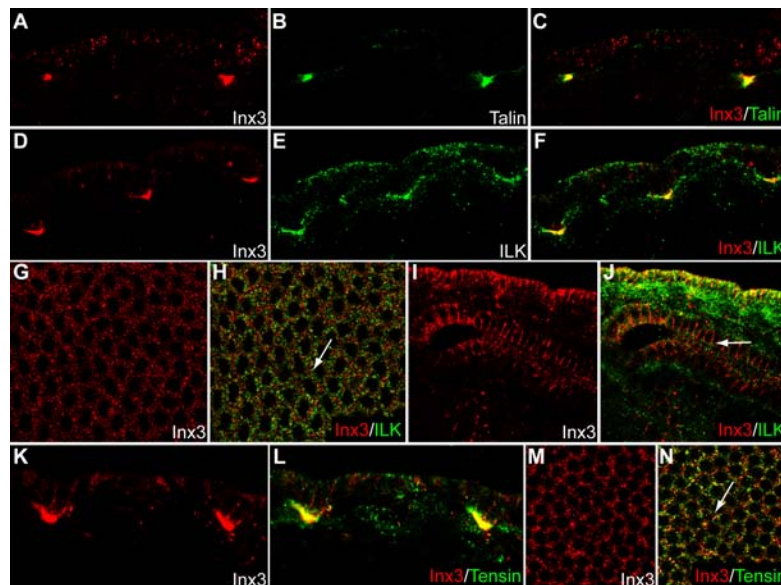


Abb. 4.40: Koexpression von Innexin3 mit dem integrin-assoziierten Proteinkomplex. A-F und K, L: Innexin3 kolokalisiert mit Talin, ILK und Tensin in den epidermalen Muskelanhaftungsstellen. G, H und M, N: In der Epidermis ist Innexin3 punktartig an der Plasmamembran lokalisiert, während ILK und Tensin auf beiden Seiten der Membran zytoplasmatisch exprimiert sind (Pfeile in H und N). H, J: Keine Kolokalisation von Innexin3 mit ILK im Hinterdarm (Pfeil in J).

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass Innexin3 mit den Komponenten des zytoplasmatischen Integrin-Komplexes in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle kolokalisiert. Die Kolokalisation ist jedoch auf dieses Gewebe beschränkt.

4.10.3 Innexin3 Expression in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle ist von Wech abhängig

Aufgrund der Tatsache, dass Innexin3, ähnlich wie Wech, mit den Komponenten des integrin-assoziierten Proteinkomplexes kolokalisiert, wurde im Folgenden die Position von Innexin3 in diesem Proteinkomplex analysiert. Hierzu wurde die Innexin3-Expression, wie auch bei dem Innexin3-Interaktionspartner Wech, dessen Lokalisation in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle von Talin abhängig ist, in *talín* (*rhea*²)-Mutanten untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass Innexin3 in diesen Mutanten nach wie vor in den epidermalen Muskelanhaftungsstellen lokalisiert ist (Abb. 4.41 A). Im Gegensatz dazu findet man in *wech*-Mutanten keine Expression von Innexin3 in den epidermalen Muskelanhaftungsstellen (Abb. 4.41 B-F). Innexin3 ist aber weiterhin in der Epidermis und dem Vorder- und Hinterdarm exprimiert (Abb. 4.41 C). Dies deutet darauf hin, dass Wech für die Lokalisation und Expression von Innexin3 in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle essentiell ist.

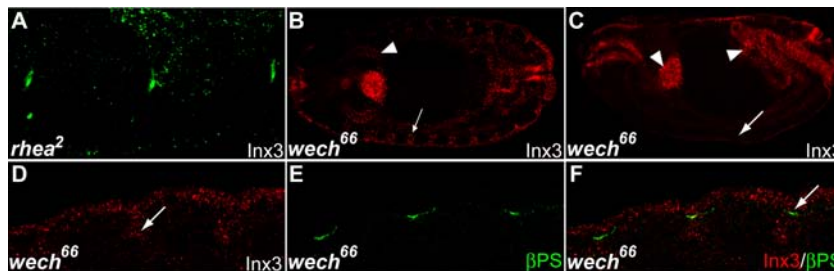


Abb. 4.41: Proteinexpression von Innexin3 in *talín* und *wech* Mutanten. **A:** In *talín* (*rhea*²) Mutanten ist keine Veränderung der Innexin3 Expression in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle zu beobachten. **B, C:** In *wech* Mutanten ist die Expression von Innexin3 in der Epidermis, den Speicheldrüsen und im Vorder- und Hinterdarm unverändert (Pfeilspitzen in **B** und **C**). Dagegen findet man keine Expression in den epidermalen Muskelanhaftungsstellen (Pfeile in **B** und **C**). **D-F:** Detailaufnahmen der epidermalen Muskelanhaftungsstellen in *wech*-Mutanten. Innexin3 zeigt keine Expression in der Muskelanhaftungsstelle (Pfeil in **D** und **F**). Als Marker für die epidermale Muskelanhaftungsstelle wurde β PS-Integrin verwendet.

4.10.4 Herunterregulierung von Innexin3 führt zu einem *wech* mutanten Phänotyp

Um festzustellen ob Innexin3, das vergleichbar wie Wech in der Tendonzelle exprimiert wird, und dessen Lokalisation in dieser Zelle von Wech abhängig ist, ebenfalls eine Funktion bei der Zelladhäsion spielt, wurde die Expression in der Tendonzelle durch die Ver-

wendung des *stripe*-Gal4 Treibers in Kombination mit einer *innexin3*-RNAi-Linie herunterreguliert. Hierbei zeigte sich, dass die mutanten Embryonen einen zu dem Interaktionspartner Wech identischen Phänotyp mit abgerundeten und von der Epidermis abgelösten Muskeln aufweisen (Abb. 4.42, vergleiche 4.14). Neben der *stripe*-Gal4 Treiberlinie wurde auch die muskelspezifische *mef2*-Gal4 Treiberlinie in Kombination mit der *innexin3*-RNAi-Linie verwendet. Bei diesem Experiment zeigte sich jedoch kein Phänotyp. Die Embryonen wiesen alle eine wildtypische Muskelanordnung auf.

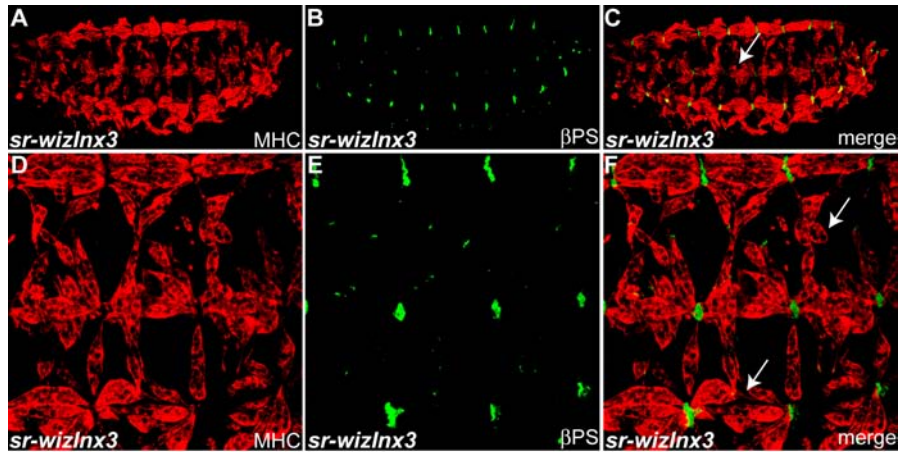


Abb. 4.42: Herunterregulierung von Innexin3 in der Tendonzelle. A-C: Übersicht über einen Embryo. Die Muskeln sind mit Myosin Heavy Chain (MHC) angefärbt, die Muskelanhaftungsstelle ist durch β PS-Integrin gekennzeichnet. Man erkennt sich ablösende und runde Muskeln (Pfeil in C). D-F: Detailaufnahme der Muskulatur. Die sich ablösenden (untere Pfeil in F) und abgerundeten Muskeln (oberer Pfeil in F) sind deutlich zu erkennen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Innexin3 einen seinem Interaktionspartner Wech identischen Muskelphänotyp aufweist, und somit eventuell auch eine Rolle bei der integrin-vermittelten Zelladhäsion in der Tendonzelle spielt.

Neben der starken Expression von Innexin3 in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle zeigt Innexin3 auch eine erhöhte Expression an den Segmentgrenzen (vgl. Abb. 4.38 D-F). Da die Tendonzelle, die für die Anhaftung der Muskeln an die Epidermis verantwortlich ist, gleichzeitig auch die epidermale Zelle darstellt, die die Segmentgrenze markiert, wurde eine mögliche Funktion von Innexin3 bei der Spezifizierung der Segmentgrenzen näher analysiert.

4.11 Spezifizierung der embryonalen Segmentgrenzen von *Drosophila melanogaster*

Die embryonalen Segmentgrenzen von *Drosophila melanogaster* bilden sich im Verlauf der Embryogenese unter Beteiligung der Faktoren Hedgehog, Wingless und Engrailed.

4.11 Spezifizierung der embryonalen Segmentgrenzen von *Drosophila*

Die Bildung der Segmentgrenzen wird kurz nach Beginn der Keimstreifenrückbildung eingeleitet. Die Grenzen sind durch periodische Einbuchtungen (Furchen) in der Epidermis zu erkennen, die die *engrailed* exprimierenden Zellen posterior von den *rhomboid* exprimierenden Zellen im anterioren Teil trennen. Im ersten Schritt der Segmentgrenzenbildung verringert sich der Zellkontakt auf der apikalen Seite der direkt an der Grenze liegenden Zellen. Diese Zellen werden nun als sogenannte Gründerzellen bezeichnet (Abb. 4.43, B). Die posteriore *engrailed* exprimierende Gründerzelle verengt im Verlauf der Entwicklung apikal ihre Oberfläche und wandert in das Innere des Embryos, wobei sie die benachbarten Zellen zur Seite drückt. In der weiteren Ausbildung der Einbuchtungen wird diese Zelle am Boden der Segmentgrenze positioniert und erhält eine Flaschenform. Die den Gründerzellen benachbarten Zellen folgen ebenfalls dieser Einwanderung und weisen partielle apikale Konstriktion auf (Abb. 4.43, C). Die Bildung der segmentalen Einbuchtungen ist in Stadium 13 abgeschlossen. Dann beginnen sich die in der Epidermis sichtbaren Einbuchtungen von ventral über lateral wieder zurückzubilden, bis sie in Stadium 15 fast nicht mehr zu erkennen sind. Interessanterweise stellt die *engrailed* exprimierende Gründerzelle die Bildung von Engrailed ein, wenn die Einbuchtung in Stadium 13 am tiefsten ist (Larsen et al., 2003).

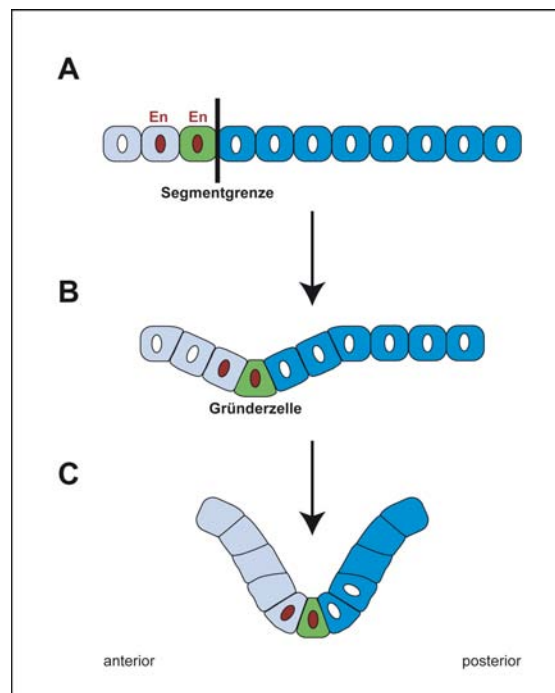


Abb. 4.43: Schematische Darstellung der Segmentgrenzenbildung. Die anterior zur sich entwickelnden Segmentgrenze liegende *engrailed* exprimierende Zelle (**grün**) (A) beginnt sich im Verlauf der Keimstreifenrückbildung apikal zu verjüngen und in das Innere des Embryos zu wandern. Sie wird als Gründerzelle bezeichnet (B). In der weiteren Entwicklung der segmentalen Einbuchtung wird die Gründerzelle am Boden der Segmentgrenze positioniert und erhält eine Flaschenform (C) (nach Larsen et al., 2003).

Um die Expression von *engrailed* in der Segmentgrenze aufrecht zu erhalten, wird das Zusammenspiel der Transkriptionsfaktoren *hedgehog* und *wingless* benötigt. Von Experimenten an Flügelimaginalscheiben von *Drosophila* ist bekannt, dass sowohl Engrailed als auch Hedgehog an der Aufrechterhaltung der Kompartimentgrenzen beteiligt sind (Rodriguez und Basler, 1997; Blair und Ralston, 1997). Ein ähnlicher Mechanismus ist auch für die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Segmentgrenzen verantwortlich. Abbildung 4.44 zeigt schematisch die daran beteiligten Faktoren und ihre Funktion.

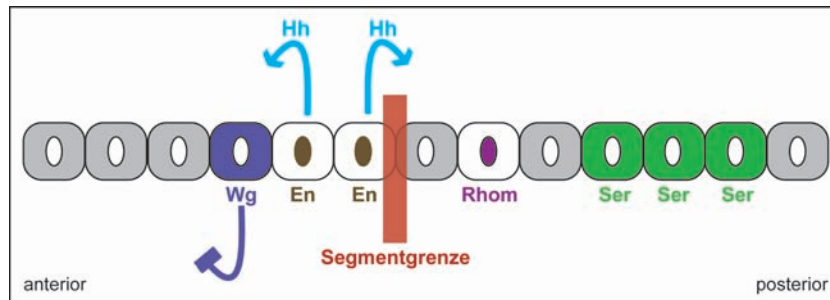


Abb. 4.44: Schematische Darstellung der bei der Ausbildung der Segmentgrenze beteiligten Genexpressionen. (modifiziert nach Larsen et al., 2003).

Die Expression von Engrailed aktiviert *hedgehog*, das wiederum für die Expression von *wingless* verantwortlich ist. Im Gegenzug wird Wingless benötigt, um eine kontinuierliche Expression von *engrailed* zu gewährleisten. Somit sind die Expressionen von *engrailed* und *hedgehog* im Verlauf der Embryogenese voneinander abhängig (diNardo et al., 1988; Ingham et al., 1988). Experimente an *hedgehog* Mutanten haben gezeigt, dass die Signalkaskade von Hedgehog für die Bildung der Segmentgrenzen und Aufrechterhaltung der segmentalen Organisation essentiell ist. Die Hedgehog-Signalkaskade selbst wird durch den Transkriptionsfaktor *cubitus interruptus* (*ci*) vermittelt. Mutantenanalysen bestätigen, dass eines der Zielgene von Ci für die Bildung der Segmentgrenzen verantwortlich ist (Larsen et al., 2003). Hedgehog sendet Signale an die Zellen, die sowohl posterior als auch anterior von dem *engrailed* exprimierenden Kompartiment liegen. Die Segmentgrenze bildet sich jedoch nur an der posterioren Zelle, da anterior Wingless aktiv ist und die durch Hedgehog vermittelte Segmentgrenzenbildung verhindert. Gleichzeitig sorgt dieser regulatorische Mechanismus dafür, dass die Expression von *rhomboid* nur posterior zur *hedgehog*-Expression erfolgt, denn die durch Hedgehog aktivierte *rhomboid*-Expression wird durch Wingless reprimiert (Alexandre et al., 1997). Somit ist Wingless dafür verantwortlich, dass anterior des *engrailed* exprimierenden Streifens durch Hedgehog keine Segmentgrenze gebildet wird. Des Weiteren muss sichergestellt werden, dass in den *engrailed* exprimierenden Zellen die Hedgehog-Signalkaskade nicht aktiviert wird. Dies geschieht durch die Reprimierung von *ci* durch Engrailed (Eaton und Kornberg, 1990).

Nicht nur die Bildung, sondern auch die Aufrechterhaltung der Segmentgrenzen erfordert eine kontinuierliche Expression von Engrailed und Hedgehog. Da eine starke Innexin3-Expression ab Stadium 12/13 an den Segmentgrenzen beobachtet werden kann, sollte im Folgenden die Funktion von Innexin3 im Hinblick auf die Ausbildung der Segmentgrenzen näher untersucht werden.

4.11.1 Die Funktion von Innexin3 in Bildung und Aufrechterhaltung der Segmentgrenzen

Innexin3 wird an der Segmentgrenze in *Drosophila* Embryonen exprimiert

Die Proteinexpression von Innexin3 in wildtypischen *Drosophila* Embryonen zeigt eine punktartige Verteilung an der Plasmamembran, sowie eine Anreicherung in den Segmentgrenzen (Abb. 4.45, A-C). Als Membranmarker wurde Spectrin verwendet. Um die Lokalisation an der Segmentgrenze genauer zu charakterisieren, wurden Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen die Proteine Wingless und Engrailed durchgeführt, die, wie oben erwähnt, in speziellen Regionen innerhalb eines Segments exprimiert werden (Abb. 4.45, D-I). Die Kofärbung mit Wingless, dass in der Mitte jedes Segments exprimiert wird, zeigt, dass Innexin3 an den Segmentgrenzen angereichert ist, und etwa ein bis zwei Zellreihen posterior von Wingless zu finden ist. Die Vermutung, dass es sich bei dieser Zellreihe um die Engrailed exprimierenden Zellen handelt, konnte mit der nachfolgenden Engrailed-Innexin3 Doppelfärbung bestätigt werden. Man erkennt deutlich, dass Innexin3 angrenzend zu den Engrailed exprimierenden Zellen lokalisiert ist, und teilweise mit der posterioren Engrailed exprimierenden Zelle kolokalisiert (Abb. 4.45, Pfeil in I).

Aufgrund der Tatsache, dass die beiden Proteine Innexin2 und Innexin3 in der Lage sind heteromere Gap Junction Kanäle zu bilden und in den meisten Geweben koexprimiert werden (Lehmann et al., 2006), wurde anhand einer Doppelfärbung der beiden Proteine analysiert, ob Innexin2 ebenfalls in den Segmentgrenzen eine erhöhte Expression aufweist. Abbildung 4.45 J zeigt, dass die Innexine 2 und 3 in der Epidermis kolokalisieren und an den Segmentgrenzen eine verstärkte Expression auftritt.

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass Innexin3 mit der posterioren Engrailed exprimierenden Zelle teilweise Kolokalisation aufweist, und zusammen mit Innexin2 in den Segmentgrenzen vermehrt exprimiert wird.

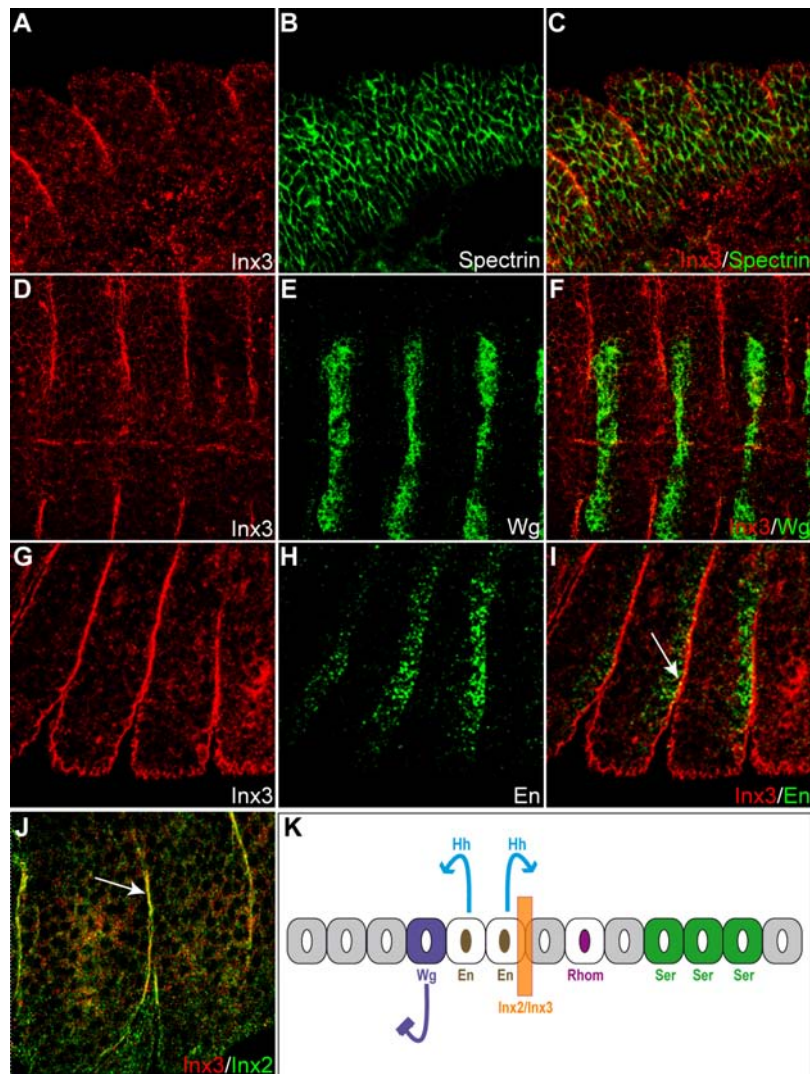


Abb. 4.45: Innexin3-Proteinexpression an der Segmentgrenze in *Drosophila* Embryonen. A-C: Doppelfärbung mit dem Membranmarker Spectrin zeigt eine Anreicherung von Innexin3 in den Segmentgrenzen. D-I: Doppelfärbungen mit den an der Ausbildung der Segmentgrenzen beteiligten Proteine Wingless (D-F) und Engrailed (G-I) zeigen, dass die Innexin3 Expression in den Segmentgrenzen lokalisiert ist, und teilweise mit der posterioren Engrailed Expression überlappt (Pfeil in I). J: Koexpression der Innexine 2 und 3 in der Segmentgrenze (Pfeil). K: Schema der Innexin-Proteinexpression in einem Segment.

Um die Funktion der beiden Innexine bezüglich der Segmentgrenzenbildung näher zu charakterisieren, wurde die Innexin3-Proteinexpression in *hedgehog*-, *wingless*- und *engrailed*-Mutanten untersucht.

Innexin3 Proteinexpression in *hedgehog* und *wingless* Mutanten

Hedgehog Mutanten sind nicht in der Lage Einbuchtungen für die späteren Segmentgrenzen zu bilden. Untersucht man in diesen Mutanten die Innexin2 und 3 Proteinexpression

4.11 Spezifizierung der embryonalen Segmentgrenzen von *Drosophila*

ist festzustellen, dass beide Innexine keine vermehrte Expression in der Epidermis in der Region aufweisen, aus denen später die Segmentgrenzen hervorgehen würden (Abb. 4.46, A-C). Bei Überexpression von Hedgehog mit der *wingless*-Gal4 Treiberlinie ist dagegen die wildtypische Expression von Innexin2 und 3 an den Segmentgrenzen vorhanden (Abb. 4.46, D-F). Des Weiteren kann man in diesen Embryonen keine Veränderung bezüglich der Innexin-Proteinexpression, sowie der Bildung der Einbuchtungen für die Segmentgrenzen beobachten, da *wingless* in diesen Embryonen noch aktiv ist und die Bildung von zusätzlichen Segmentgrenzen verhindert.

In *wingless* Mutanten zeigen die Innexine ebenfalls keine vermehrte Expression in den Segmentgrenzen, sind aber weiterhin normal in der Epidermis exprimiert (Abb. 4.46, G-I).

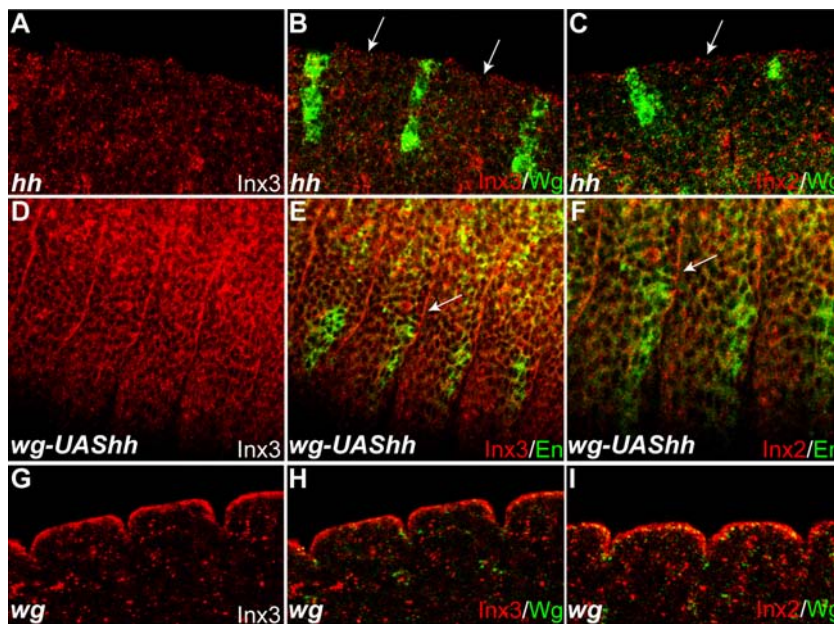


Abb. 4.46: Innexin2 und 3 Proteinexpression in *hedgehog* und *wingless* Mutanten. A-C: Die Innexine 2 und 3 zeigen in *hedgehog* Mutanten die wildtypische punktartige Expression in der Epidermis. Im Vergleich zum Wildtyp fehlt aber die vermehrte Expression in den Segmentgrenzen (siehe Pfeile). D-F: Überexpression von Hedgehog mit der *wingless*-Gal4 Treiberlinie führt zu keiner erkennbaren morphologischen Veränderung oder einer Veränderung der Innexinexpression (Pfeile weisen auf Expression in den Segmentgrenzen). G-I: Die Verteilung der Innexine in *wingless* Mutanten entspricht der von *hedgehog* Mutanten.

Da das Wingless Signal in den *wingless* mutanten Embryonen nicht mehr vorhanden ist, kann es nicht mehr seine reprimierende Funktion auf Hedgehog ausüben, so dass sich anterior von den *engrailed* exprimierenden Zellen keine Segmentgrenze bildet. In chemischen Färbungen an *wingless* Mutanten, bei denen das Hedgehog Signal anterior nicht reprimiert wird, erkennt man im Vergleich zu wildtypischen Embryonen eine zusätzliche Einbuchtung des Segments in dem Bereich der *wingless* Expression, in dem nun auch Innexin-Expression auftritt (Abb. 4.47, Pfeil in B). Abbildung 4.47 C zeigt schematisch,

dass Wingless in den *wingless* Mutanten keine reprimierende Wirkung mehr auf das Hedgehog Signal ausüben kann, und so Hedgehog anterior zu den *engrailed* exprimierenden Zellen die Bildung einer Segmentgrenze und damit verbunden, die Expression von Innexin3 induziert.

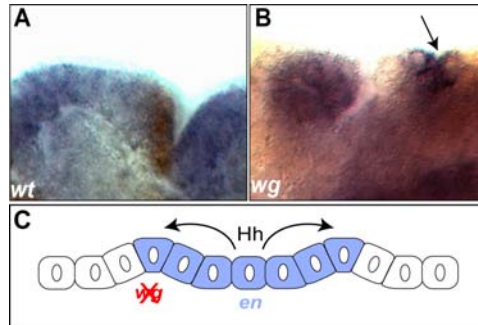


Abb. 4.47: In *wingless* Mutanten entstehen zusätzliche Einbuchtungen im Segment. **A:** Ein Segment eines wildtypischen Embryos in Stadium 13. Die chemische Färbung zeigt die Expression von Engrailed (**braun**) und *innexin3* (**blau**) **B:** In *wingless* Mutanten bildet sich eine zusätzliche Einbuchtung im Segment (Pfeil). Die chemische Färbung zeigt die Expression von *innexin3* (**blau**) und Engrailed (**braun**). **C:** Schematische Darstellung der Genexpressionen in *wingless* Mutanten. (modifiziert nach Larsen et al., 2003).

Innexin3 Proteinexpression in *engrailed* Mutanten

Neben *hedgehog* und *wingless* ist *engrailed* die dritte zentrale Komponente, die an der Ausbildung der Einbuchtungen für die Segmentgrenzen verantwortlich ist. Aus diesem Grund wurde die Expression von Innexin3 in einer *engrailed* Defizienz untersucht. Der *engrailed* mutante Phänotyp wurde anhand eines für diese Mutanten charakteristischen Hinterdarmdefektes identifiziert (Abb. 4.48 C, Pfeil). Die Mutanten weisen, genauso wie die zuvor beschriebenen *hedgehog* und *wingless* Mutanten, keine Ausbildung von Einbuchtungen zur Segmentgrenzenbildung (Abb. 4.48, Pfeile in D und F), und somit auch keine vermehrte Innexin3-Expression in diesen Geweben auf.

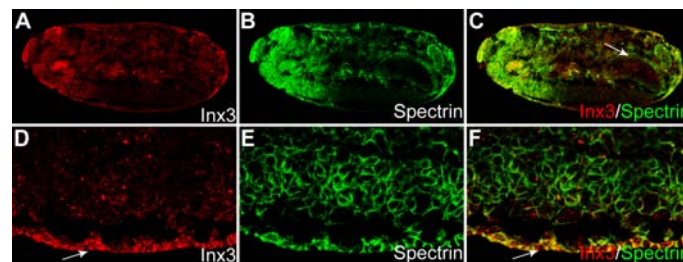


Abb. 4.48: Innexin3-Lokalisation in *engrailed* Mutanten. **A-C:** Übersicht einer *engrailed* Mutante, die mit dem Membranmarker Spectrin gefärbt wurde. Anhand dieser Färbung lässt sich der für *engrailed* defiziente Embryonen typische Hinterdarmdefekt identifizieren (Pfeil in **C**). **D-F:** Detail der ventralen Epidermis. Es ist keine Ausbildung von Segmentgrenzen oder Anreicherung der Innexin3-Expression in dieser Region zu erkennen (Pfeile in **D** und **F**).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Proteinexpression von Innexin3 in der Segmentgrenze von den Faktoren Hedgehog und Engrailed abhängig ist, die wiederum für die Spezifizierung der Segmentgrenze und die Aufrechterhaltung der Wingless Expression benötigt werden. Aus diesem Grund kann in keiner der drei analysierten Mutanten eine segmentale Expression von Innexin3 beobachtet werden.

Veränderungen in der *innexin*-Expression führen zu segmentalen morphologischen Änderungen

Um eine mögliche Abhängigkeit zwischen der *engrailed* und *innexin*-Expression darzustellen, wurde *engrailed* mit Hilfe der *paired*-Gal4 Treiberlinie in *Drosophila* Embryonen überexprimiert. Zur Auswertung wurden Embryonen des Stadiums 13 verwendet, bei denen die Einbuchtung zur Segmentgrenzenbildung am größten ist, und mit wildtypischen Embryonen verglichen (Abb. 4.49). Untersucht wurde die *innexin2* Expression mit Hilfe des Markers Engrailed. In wildtypischen Embryonen hat jedes Segment eine Größe von 13 Zellen, und die *innexin*-Expression ist auf die posteriore Engrailed exprimierende, sowie die drei posterior angrenzenden Zellen beschränkt. Im Vergleich löst die Überexpression von *engrailed* mit Hilfe der *paired*-Gal4 Treiberlinie in jedem zweiten embryonalen Segment eine anteriore Verbreiterung der Engrailed Expression, sowie eine kleinere segmentale Einbuchtung aus. Darüber hinaus werden diese Segmente um 8 Zellen verbreitert, und die *innexin*-Expression nach posterior ausgedehnt.

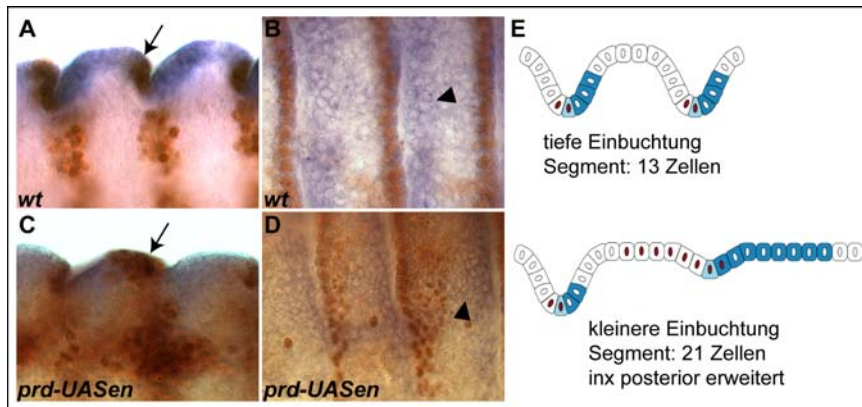


Abb. 4.49: Veränderung der *innexin*-Expression durch Überexpression von *engrailed*. **A,B:** Wildtypische Embryonen, die *innexin2* (**blau**) und Engrailed Expression (**braun**) zeigen. **C, D:** Überexpression von *engrailed* führt zu einer anterioren Expansion von Engrailed (Pfeil in **C** im Vergleich zu Pfeil in **A**), und einer posterioren Verbreiterung der *innexin2* Expression (vergleiche Pfeilspitze in **D** mit **B**). Des Weiteren ist die Einbuchtung zur Segmentgrenzenbildung verkleinert. **E:** Schematische Darstellung der Genexpressionen und morphologischen Eigenschaften. **Braun:** Engrailed-Expression; **blau:** *innexin2*-Expression. (Aufnahmen von C. Lehmann zur Verfügung gestellt).

Um festzustellen wie sich die Überexpression von Innexin3 auf die Spezifizierung und Morphologie einer Segmentgrenze auswirkt, wurde im folgenden Experiment Innexin3 mit Hilfe der *paired*-Gal4 und *wingless*-Gal4 Treiberline in den entsprechenden Domänen exprimiert. Diese zusätzliche Expression führt zur Ausbildung von ektopischen Einbuchtungen, die im Verlauf der Embryogenese für die Entwicklung weiterer Segmentgrenzen verantwortlich sind (Abb. 4.50). Anhand des Membranmarkers Cadherin kann man deutlich die Flaschenform der ektopisch induzierten Gründerzelle der neuen Segmentgrenze erkennen (Abb. 4.50, Pfeile in C und F).

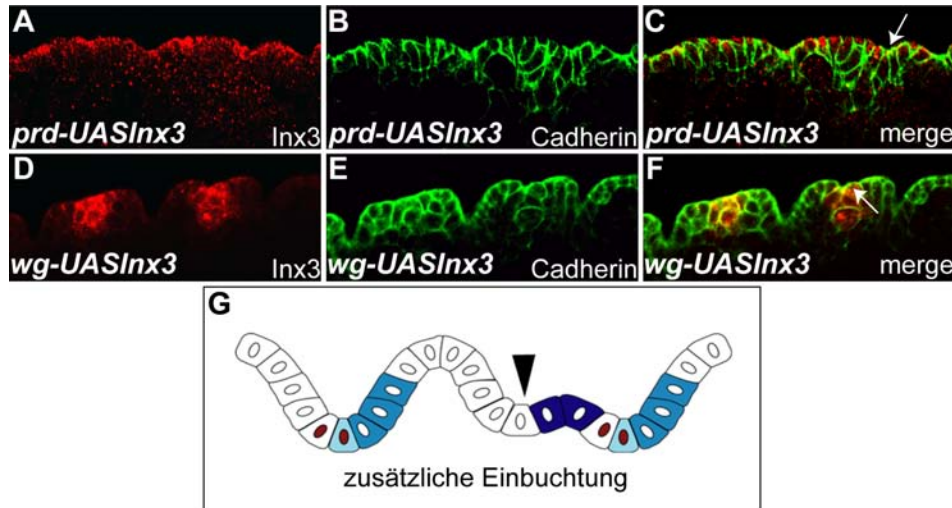


Abb. 4.50: Segmentale Überexpression von Innexin3. **A-C:** Überexpression von Innexin3 mit *paired*-Gal4 führt in jedem zweiten Segment zur Ausbildung einer zusätzlichen segmentalen Einbuchtung (Pfeil in **C**). **D-F:** Überexpression von Innexin3 in der *wingless*-Domäne führt ebenfalls zur Entstehung einer Segmentgrenze in diesem Bereich (Pfeil in **F**). **G:** Schematische Darstellung der morphologischen Veränderungen innerhalb eines Segments. Die Pfeilspitze kennzeichnet die ektopische Einbuchtung. **Braun:** Engrailed-Expression; **blau:** Innexin-Expression.

Aufgrund der Tatsache, dass eine Überexpression der Innexine zur Ausbildung von ektopischen Einbuchtungen führt, stellte sich die Frage, wie sich die Morphologie des Segments bei einem Verlust der Innexin-Expression verändert. Hierzu wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit verschiedene *innexin3*-RNAi-Konstrukte generiert und durch Expression mittels des *paired*-Gal4-Treibers auf ihre Funktionalität untersucht (siehe Abb. 7.8). Die funktionalen *innexin3*-RNAi-Linien zeigen bei Expression mit den Treiberlinien *paired*-Gal4 und *wingless*-Gal4 morphologische Veränderungen bezüglich der Ausbildung der Segmentgrenzen. Diese stellen sich als verringerte Einbuchtungen zur Ausbildung der Segmentgrenzen beziehungsweise durch einen teilweise vollständigen Verlust der Einbuchtungen dar (Abb. 4.51, Pfeile in C und F). In den Mutanten erkennt man weiterhin eine leichte Innexin3-Proteinexpression, die darauf zurückzuführen ist, dass die Expression durch die RNAi-Linie nicht vollständig unterdrückt wird. Allerdings ist die

in wildtypischen Embryonen an der Plasmamembran punktartig vorhandene Expression in diesen Embryonen nicht mehr zu erkennen.

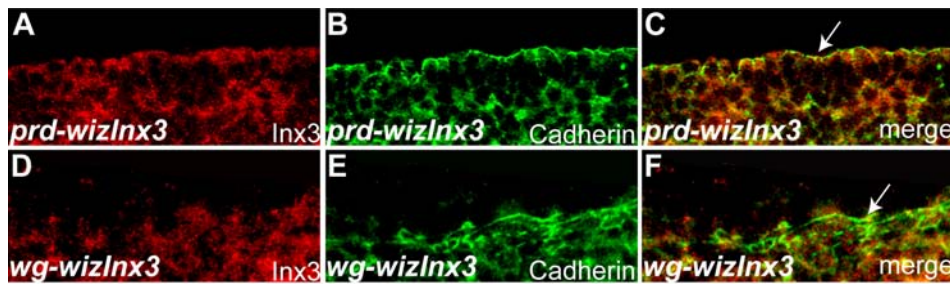


Abb. 4.51: Herunterregulierung der Innexin3-Expression in der Epidermis. A-F: Die Herunterregulierung von Innexin3 mit den *paired*-Gal4 und *wingless*-Gal4 Treiberlinien führt zu einem Verlust der membranständigen Innexin-Expression, sowie zu einem Wegfall der Einbuchtungen zur Ausbildung der Segmentgrenzen (Pfeile in C und F).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Innexine, und speziell das Innexin3, eine entscheidende Funktion bei der Ausbildung und Spezifizierung der Segmentgrenzen in *Drosophila* spielen. Die Expression von Innexin3, und auch Innexin2, ist in der posterioren *engrailed* exprimierenden Zelle zu finden. Diese Zelle bildet die sogenannte Gründerzelle der Segmentgrenze, die im Verlauf der Embryogenese eine weitere Funktion erfüllt, da sie die epidermale Tendonzelle darstellt, an der die Muskeln eine Verbindung mit dem Exoskelett eingehen. Die Struktur zwischen Muskeln und Tendonzelle wird als epidermale Muskelanhaftungsstelle bezeichnet und ist für die Übertragung der Muskelkontraktion auf das chitinöse Exoskelett von *Drosophila* essentiell. Die Adhäsion der beiden Zellschichten wird durch Integrine und den mit ihnen verbundenen zytoplasmatischen Multiproteinkomplexen vermittelt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden das Wech und sein Interaktionspartner Innexin3 Teil eines solchen zytoplasmatischen Multiproteinkomplexes sind. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sie eine wichtige Funktion bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung der integrin-vermittelten Zelladhäsion erfüllen, da eine Herabsetzung der Expression einer der beiden Komponenten zu einem mit Integrinmutanten vergleichbaren Muskelphänotyp, resultierend aus einer verminderten Zelladhäsion, führt.

Kapitel 5

Diskussion

5.1 Die Klasse der RBCC-Proteine

Wech wird aufgrund der mittels Datenbanken (NCBI) und Software-Programmen (Ex-pasy, SMART) vorhergesagten Domänenstruktur zur Klasse der RBCC-Proteine gezählt. Gene, die für Mitglieder dieser Proteinfamilie kodieren, finden sich in allen Metazoa. In Vertebraten konnten bis heute 65 Mitglieder der Proteinfamilie identifiziert werden, bei Invertebraten wie *D. melanogaster* und *C. elegans* sind es weniger als 20 (Meroni und Diez-Roux, 2005). Der Name RBCC bezieht sich auf das dreiteilige N-terminale Motiv, das sich aus einer **R**ingfingerdomäne, ein oder zwei **B**Box-Domänen und einer **c**oiled-coil-Domäne zusammensetzt. In der Regel weisen sämtliche Mitglieder dieses dreiteilige Motiv auf, das vom N-Terminus zum C-Terminus immer gleich angeordnet ist (Abbildung 5.1). Es existieren wenige Ausnahmen, die keine Ringfingerdomäne oder eine zweite BBox-Domäne besitzen, aber immer noch dieser Proteinfamilie zugeordnet werden, da sie die übrigen Domänen aufweisen, die in Anordnung und Abstand zueinander konserviert sind (Torok et al., 2001; Reymond et al. 2001). Die Mitglieder der RBCC-Proteinfamilie zeichnen sich durch eine geringe primäre Sequenzhomologie aus; nur die Cysteine und Histidine der Ringfinger- und BBox-Domäne, sowie die hydrophoben Aminosäuren der coiled-coil Domäne sind stark konserviert und erhalten die Anordnung der einzelnen Domänen zueinander (Meroni und Diez-Roux, 2005). Die RBCC Proteinfamilie ist an der zeitlichen Steuerung der Entwicklung, der Tumorgenese, viralen Prozessen, der Zellteilung und der Entwicklung von Extremitäten beteiligt (Arama et al., 2000; Slack et al., 2000; Horn et al., 2004; Betschinger et al., 2006; Sakuma et al., 2007). Zu den RBCC-Proteinen werden unter anderem die Wech („Lin-41“) Proteine gezählt, die in *C. elegans* (Slack et al., 2000), *Mus musculus* (Schulman et al., 2005), *Gallus gallus* (Lancman et al., 2005) und *Drosophila melanogaster* identifiziert wurden (Rodriguez et al., 1996). Das *Drosophila* Wech Protein wurde im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert.

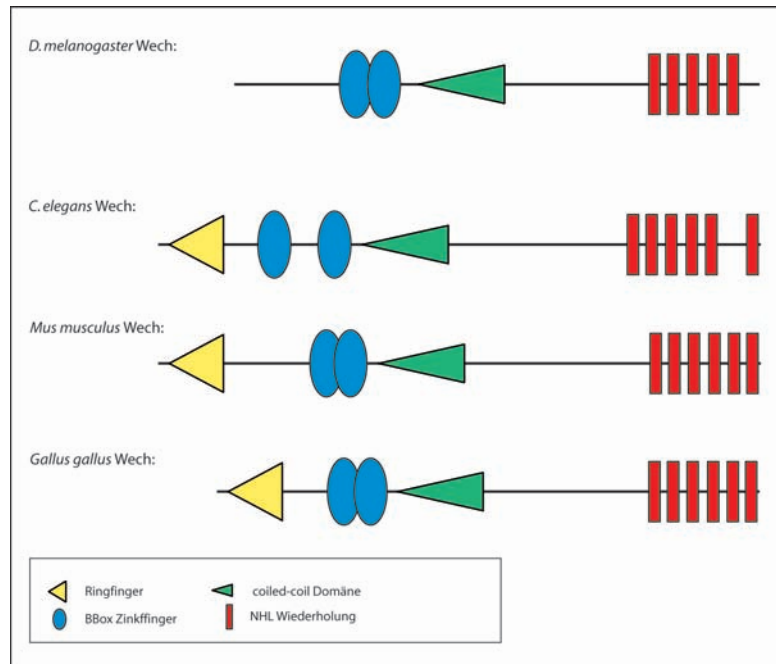


Abb. 5.1: Schematische Darstellung der Domänen der Wech-RBCC-Proteine. Die Wech-Proteine von Vertebraten und *C. elegans* (Lin-41) weisen die klassische Domänenstruktur aus Ringfinger, BBox-1, BBox-2 und coiled-coil Domäne auf. Im Vergleich dazu fehlt dem *Drosophila* Wech-Protein die N-terminale Ringfingerdomäne. Alle gezeigten Proteine weisen als gemeinsames Strukturmerkmal C-terminale NHL-Wiederholungen auf.

5.1.1 Die Funktion der RBCC-Domänen

Die unterschiedlichen Domänen des dreiteiligen RBCC-Motivs erfüllen verschiedene Aufgaben. Die N-terminale Ringfingerdomäne ist durch eine charakteristische Anordnung von Histidinen und Cysteinen gekennzeichnet. Darüber hinaus ist sie am Transfer von Ubiquitin zu einem heterologen Substrat oder zu anderen Ringfingerproteinen beteiligt und ein charakteristisches Merkmal für viele E3-Ubiquitinligasen (Meroni und Diez-Roux, 2005). Die Beteiligung dieser Domäne an Ubiquitinierungsprozessen lässt vermuten, dass RBCC-Proteine eine Rolle bei der Ubiquitinierung und somit bei Regulation und eventuell auch Degradation potentieller Interaktionspartner spielen. Im Vergleich zu vielen anderen RBCC-Proteinen besitzt das *Drosophila* Wech, das ebenfalls dieser Familie zugeordnet wird, keine Ringfingerdomäne. Eine detaillierte Sequenzanalyse von Wech konnte keinen Hinweis auf eine mögliche Homologie zu einer Ringfingerdomäne aufdecken (O'Farrell et al., 2008). Daher ist davon auszugehen, dass Wech, im Vergleich zu seinen Orthologen in Vertebraten und *C. elegans*, keine Funktion bei Ubiquitinierungsprozessen erfüllt, und die Regulation möglicher homologer Interaktionspartner auf andere Weise erfolgt.

Die BBox-Domänen lassen sich in die BBox-1 und BBox-2 Domäne unterteilen. Hierbei ist zu beachten, dass die BBox-1 Domäne immer vor der BBox-2 Domäne liegt. Sollte nur

eine der beiden BBox-Domänen vorhanden sein, so ist dies immer die BBox-2 Domäne, die für die nachfolgende coiled-coil Domäne essentiell ist (Meroni und Diez-Roux, 2005). Bei allen bis heute untersuchten Mitgliedern der RBCC-Proteinfamilie sind die BBox-Domänen an Substratbindungen und Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen beteiligt (Meroni und Diez-Roux, 2005).

Das der BBox-2 Domäne nachfolgende coiled-coil Motiv ist für homomere Interaktionen zwischen RBCC-Proteinen verantwortlich (Reymond et al., 2001). Allerdings ist dieses Motiv wahrscheinlich nicht alleine für die homomeren Interaktionen zuständig, da in einigen Studien gezeigt wurde, dass die BBox-Region in Kombination mit der coiled-coil-Domäne eine effizientere und spezifischere Interaktion vermittelt (Reymond et al., 2001; Cao et al., 1997). Allgemein wird angenommen, dass das RBCC-Motiv für die Interaktion mit anderen Proteinen essentiell ist, und auf diese Weise zur Ausbildung von Multi-Proteinkomplexen beiträgt. Diese Multi-Proteinkomplexe kommen sowohl im Zytoplasma als auch im Kern vor (Meroni und Diez-Roux, 2005). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das *Drosophila* RBCC-Protein Wech bei der Bildung eines solchen Multi-Proteinkomplexes beteiligt ist (siehe 4.7.3). Wech, dass speziell in den epidermalen Muskelanhaftungsstellen exprimiert wird, vermittelt die Interaktion zwischen Talin und ILK, zwei Komponenten des integrin-assoziierten Proteinkomplexes. Biochemisch war es möglich die Interaktionsdomäne von Wech mit den beiden Proteinen zu bestimmen: Wech interagiert mittels der BCC-Domäne mit ILK, und ebenso mit Talin, und erzeugt dabei einen zytoplasmatischen Multi-Proteinkomplex. Aufgrund dieser Ergebnisse ist festzuhalten, dass das *Drosophila* RBCC-Protein Wech durch die Ausbildung von Komplexen mittels der BCC-Domäne die für Mitglieder dieser Proteinfamilie postulierte Funktion bei der Bildung von Multi-Proteinkomplexen erfüllt, und die Ausbildung der Komplexe durch die BCC-Domäne vermittelt wird.

Die C-terminalen Domänen der RBCC-Proteine

Der C-Terminus ist innerhalb der RBCC-Proteinfamilie sehr variabel und kann neben RFP-ähnlichen Domänen auch ARF-Domänen, MATH-Domänen und NHL-Domänen beinhalten, die alle eine Funktion bei der Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen übernehmen (Abb. 5.2).

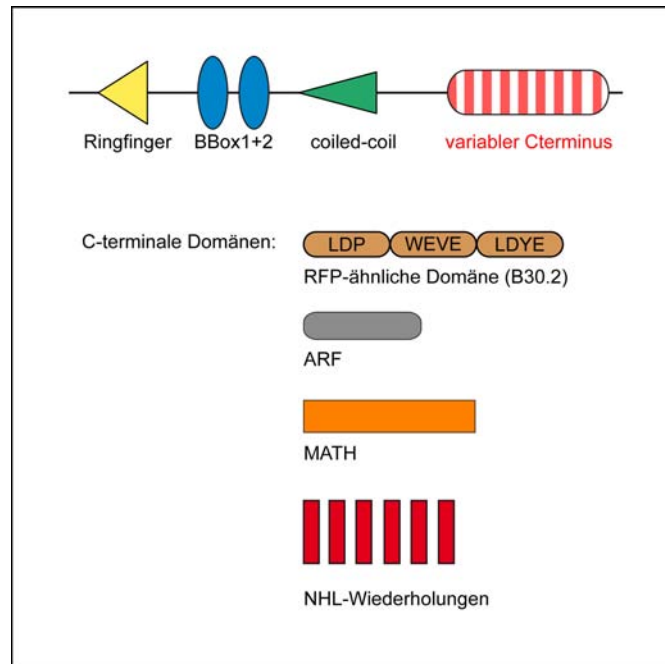


Abb. 5.2: Schematische Darstellung der variablen C-terminalen Domänen der RBCC-Proteine. Dargestellt sind die am häufigsten vorkommende RFP-ähnliche Domäne mit ihren charakteristischen Aminosäureabfolgen, die ARF- und MATH-Domäne, sowie die für Wech-Proteine charakteristischen NHL-Wiederholungen.

Das am Häufigsten vorkommende C-terminale Motiv ist die RFP-ähnliche B30.2 Domäne, die man in etwa zwei Drittel der RBCC-Proteine antrifft. Nicht ganz so verbreitet ist die für die Wech-Proteine charakteristische C-terminale NHL-Domäne. Die Bezeichnung NHL bezieht ihren Namen von den Proteinen, bei denen erstmals diese spezifische Domäne identifiziert wurde, **NCL-1** (Frank und Roth, 1998), **HT2A** (Fridell et al., 1995), und **Lin-41** (Slack und Ruvkun, 1998). Die NHL-Domäne der Wech-Proteine besteht aus 5 - 6 Kopien einer jeweils 44 Aminosäure langen Wiederholung und spiegelt somit die bekannten WD40-Wiederholungen wieder (Springer, 1998), die in der Lage sind sich zu einer β -Propellerstruktur zusammenzulagern und so Protein-Protein-Interaktionen zu vermitteln (Slack und Ruvkun, 1998). Der Sequenzvergleich der verschiedenen Wech-Proteine aus Vertebraten und Invertebraten zeigt, dass speziell die C-terminalen NHL-Domänen hoch konserviert sind (vgl. Anhang Abb 7.5). Daher ist anzunehmen, dass die NHL-Wiederholungen für die Funktion von Wech essentiell sind (Slack et al., 2000).

5.1.2 Ein Vergleich von Wech mit den *Drosophila* NHL-Domänen Proteinen

Neben Wech weisen noch zwei weitere *Drosophila*-Proteine C-terminale NHL-Domänen auf. Dies sind Brat und MeiP-26, die ebenfalls beide zur Klasse der RBCC-Proteinfamilie gezählt werden. MeiP-26 weist das typische dreiteilige Motiv dieser Proteinfamilie auf,

das aus einer Ringfingerdomäne, zwei BBoxen und einer coiled-coil Domäne besteht. Im Vergleich dazu haben Brat und Wech keine N-terminale Ringfingerdomäne. Das Protein MeiP-26 ist in die meiotische Zellzykluskontrolle involviert, und *meiP-26* Mutanten weisen Tumore in den Ovarien auf (Page et al., 2000). Außerdem konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Herunterregulierung von *meiP-26* mittels RNAi zu einem zerstörten peripheren und zentralen Nervensystem führt (Ivanov et al., 2004). Brat ist ebenfalls in dem zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert, zeigt aber zusätzlich eine Expression in den Speicheldrüsen und dem Proventrikulus (Arama et al., 2000). Genauso wie *meiP-26* bilden die *brat* Mutanten Tumore, die stark proliferieren und hoch invasiv sind. Diese und weitere Analysen bestätigen, dass Brat eine direkte Rolle bei der Tumorsuppression spielt (Arama et al., 2000; Loop et al., 2004; Betschinger et al., 2006). Der mutante tumorgene Phänotyp von *meiP-26* und *brat* kann in beiden Fällen durch Punktmutationen in den C-terminalen NHL-Wiederholungen erzeugt werden (Arama et al., 2000; Glasscock et al., 2005). Dies deutet zum einen darauf hin, dass die NHL-Domäne für die Funktion dieser beiden Proteine essentiell ist, und zum anderen zeigt es, dass beide Proteine ähnliche Funktionen haben und eventuell in den gleichen Signalwegen aktiv sind, da sie beide eine Expression im Nervensystem aufweisen und zytoplasmatisch lokalisiert sind.

Wech zeigt ebenfalls eine Expression im Nervensystem. Allerdings konnte diese bis jetzt nur auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.3). Neben dieser Gemeinsamkeit zeigt auch *wech* einen *brat*-ähnlichen Tumorphänotyp. So führt eine Überexpression von *wech* im Vergleich zum Wildtyp zu kleineren Gehirnen, während RNAi-Experimente mit *wech* vergrößerte Gehirne zeigen. Warum die in dieser Arbeit charakterisierte *wech*⁶⁶ Mutante keine Tumorbildung wie bei *meiP-26* und *brat* aufweist ist unklar. Eventuell würden schwächere *wech* Allele, die keine embryonale Letalität besitzen, ebenfalls Tumorbildung im larvalen Gehirn zeigen. Ob der mutante Phänotyp, wie für die anderen beiden Proteine beschrieben, auf einen Defekt in der NHL-Domäne zurückzuführen ist, und somit bestimmte Protein-Interaktionen unterbunden werden, bleibt zu zeigen. Das die NHL-Domäne eine entscheidende Rolle bei der Ausübung der Wech-Funktion *in vivo* spielt zeigt sich daran, dass die Überexpression eines Deletionskonstruktes, das keine NHL-Domäne besitzt, einen zu *wech*⁶⁶ Mutanten vergleichbaren Phänotyp mit abgerundeten und von der Epidermis abgelösten Muskeln verursacht (siehe Abb. 4.31). Dieser Phänotyp tritt auch bei einer Deletion der BCC-Domäne von Wech auf, so dass in diesem Fall anscheinend beide Domänen für die Funktion von Wech essentiell sind.

Interessanterweise ist Wech in der Lage über seine NHL-Domäne Homomere zu bilden (siehe 4.9.6). Aufgrund der hoch konservierten NHL-Domänen der *Drosophila*-Proteine besteht daher die Möglichkeit einer Interaktion von Wech mit Brat und MeiP-26 über diese Domäne. Erste biochemische Untersuchungen deuten darauf hin, dass Wech direkt

mit Brat interagieren kann (Abb. 5.3). Hierzu wurden HeLa-Zellen mit dem Wech- Δ BCC Deletionskonstrukt und dem volle-Länge-Protein Wech mit jeweils der NHL-Domäne von Brat kotransfiziert. Es zeigt sich, dass Wech in der Lage ist, an die NHL-Domäne von Brat zu binden, und dass diese Interaktion sowohl von der NHL-Domäne als auch von der BCC-Domäne von Wech abhängig ist; denn bei Deletion der N-terminalen BCC-Domäne kann weiterhin eine schwache Interaktion mit Brat nachgewiesen werden (Abb. 5.3).

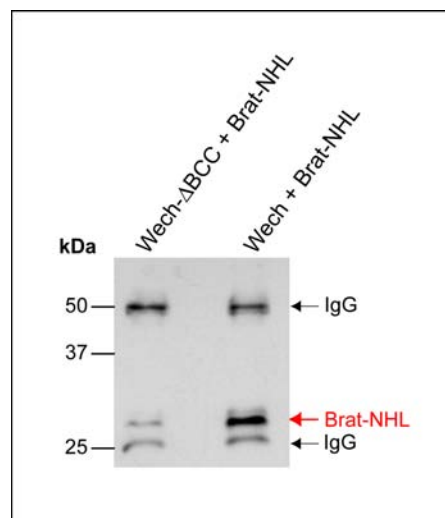


Abb. 5.3: Wech interagiert mit der NHL-Domäne von Brat. Ko-Immunpräzipitationen von Wech und dem Deletionskonstrukt Wech- Δ BCC mit der NHL-Domäne von Brat zeigen, dass Wech *in vitro* mit Brat über die NHL- und BCC-Domäne interagiert.

Ob diese Interaktion auch *in vivo* auftritt, und wenn ja, in welchem Gewebe, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

5.2 Vergleich der Expressionsmuster von *wech* während der Entwicklung

Die Expressionmuster von *wech* sind bei den Vertebraten für *Mus musculus* und *Gallus gallus*, sowie bei den Invertebraten für *C. elegans* und *D. melanogaster* beschrieben. Sowohl bei *Mus musculus* als auch bei *Gallus gallus* ist *wech* in den sich entwickelnden Vorder- und Hinterextremitäten exprimiert. Darüber hinaus kann eine Expression in den sich entwickelnden Lungen, den Somiten, den Ganglien, dem sich entwickelnden Auge, dem Gehirn, sowie schwach in den Muskeln nachgewiesen werden (Schulman et al., 2005; Lancman et al., 2005; Kanamoto et al., 2006).

Ein ähnliches gewebespezifisches Expressionmuster weist *wech* („*lin-41*“) in *C. elegans* auf. Auch hier ist es in dem sich entwickelnden Nervensystem, speziell in den Neuronen,

der Körpermuskulatur, der Muskulatur des Pharynx, sowie den lateralen hypodermalen „Seam“-Zellen exprimiert. Wech zeigt in allen Geweben eine zytoplasmatische Lokalisation. Dies trifft auch für das *Drosophila* Orthologe Wech zu, das zytoplasmatisch lokalisiert ist, und dessen Expression ebenfalls in dem sich entwickelnden Nervensystem, sowohl dem Zentralen als auch dem Peripheren, und den epidermalen Muskelanhaftungsstellen nachgewiesen wurde (siehe Abb. 4.3 und Abb. 4.6). Aufgrund dieses zum Teil deutlich identischen Expressionsmuster auf RNA und Proteinebene zwischen den verschiedenen Spezies ist anzunehmen, dass diese Proteinen in den jeweiligen Organismen eine vergleichbare Funktion bei der Entwicklung wahrnehmen. Mutantanalysen speziell bei *C. elegans* und weiteren NHL-Proteinen von *Drosophila* deuten darauf hin, dass die Funktion der Wech-Proteine durch die hoch konservierten NHL-Domänen vermittelt wird (Slack et al., 2000; Arama et al., 2000; Rio-Albrechtsen et al., 2006). Um die für die NHL-Domäne postulierte essentielle Funktion für das *Drosophila* Wech Protein zu bestätigen, ist es nötig neue Mutanten zu erzeugen, die nicht nur die NHL-Domäne deletiert haben, sondern auch an den hoch konservierten Stellen innerhalb dieser Domäne, die für die Ausbildung der β -Propellerstruktur verantwortlich sind, Punktmutationen einzufügen, so dass sich diese charakteristische Struktur nicht mehr bilden kann und die durch sie vermittelten Protein-Protein-Interaktionen gestört sind.

5.3 *wech* Mutanten von *Drosophila* weisen Defekte bei der Muskelanhaftung an die Epidermis auf

Die phänotypische Analyse der im Rahmen dieser Arbeit erzeugten *Drosophila wech*-Mutante führte zur Identifizierung von Defekten in der somatischen Muskulatur zum Ende der Embryogenese. Diese Defekte äußern sich in abgelösten und abgerundeten Muskeln (vgl. 4.6.4), die ab Stadium 15 der Embryonalentwicklung beobachtet werden können. Abgelöste und abgerundete Muskeln sind ein Charakteristikum für eine durch Integrine fehlerhaft vermittelte Adhäsion zwischen der Epidermis und den anhaftenden Muskeln (Brown et al., 2000). Neben den für Integrinmutanten so typischen Adhäsionsdefekten, treten abgelöste Muskeln aber auch bei Mutanten auf, die Defekte bei der Verschmelzung der fusionskompetenten Myoblasten mit den Muskelgründerzellen aufweisen, wie zum Beispiel *kette*, *blown fuse*, *wip* und *wasp* (Schröter et al., 2004, 2006; Massarwa et al., 2007; Schäfer et al., 2007). Die Fusion der Myoblasten mit den Muskelgründerzellen erfolgt in einem zweistufigen Prozess. In der ersten Phase dieses Prozesses bilden sich die fusionskompetenten Myoblasten und Muskelgründerzellen durch asymmetrische Zellteilung von mesodermalen Zellen (Baylies et al., 1998). Nachfolgend fusioniert eine Muskelgründerzelle mit einer oder zwei fusionskompetenten Myoblasten und bildet so den Muskelvorläuferkomplex, aus dem in der zweiten Phase des Fusionsprozesses

die entsprechenden Muskeln hervorgehen (Abmayr et al., 2005). Die zweite Phase des Fusionsprozesses ist durch eine für jeden Muskel spezifische Anzahl an Fusionszyklen gekennzeichnet, durch die er seine endgültige Größe und somit auch Anzahl an Kernen erhält.

Der in dieser Arbeit charakterisierte Muskelphänotyp von *wech* ist sehr variabel (Abb. 5.4) und gleicht zum Teil dem von Fusionsmutanten wie *kette* oder *wasp* (Schröter et al., 2004; Schäfer et al., 2007). Diese Mutanten weisen neben nicht korrekt mit der Epidermis verbundenen Muskeln auch mononukleäre und nicht vollständig fusionierte Muskeln, sowie fusionskompetente Myoblasten auf. Daher wurde untersucht, ob bei *wech*-Mutanten ein Fusionsdefekt vorliegt (vgl. Abb. 4.14).

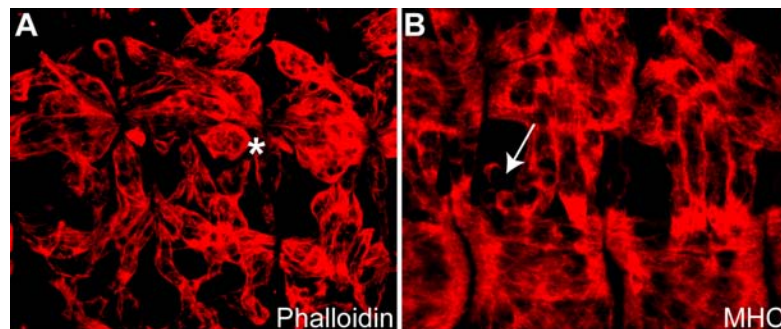


Abb. 5.4: Variabilität des *wech*⁶⁶ mutanten Phänotyps. Der Phänotyp der *wech*⁶⁶ Mutante variiert zwischen einem deutlich zerstörten Muskelaufbau mit von der Epidermis abgelösten multinukleären Muskeln (A), und einem relativ intakten Muskelaufbau mit nur vereinzelt abgelösten, wahrscheinlich mononukleären Muskeln (B). Stern in A kennzeichnet multinukleäre Muskeln, Pfeil in B kennzeichnet potentielle mononukleäre Muskel.

Hierzu wurden *wech* mutante Embryonen mit dem Even-skipped Antikörper gefärbt, der speziell in den Kernen des DA1-Muskels in jedem abdominalen Segment exprimiert ist. In wildtypischen Embryonen weisen die DA1-Muskel zwischen neun und elf Kerne auf, die durch die Even-skipped Expression gekennzeichnet sind. In Mutanten, bei denen die Fusion der Myoblasten gestört ist, besitzen die DA1-Muskel eine reduzierte Anzahl an Even-skipped positiven Kernen. Diese spiegeln die Anzahl der erfolgten Fusionszyklen wieder. So haben Mutanten mit nur drei bis vier DA1 Kernen die erste Runde der Myoblastenfusion abgeschlossen, weisen aber Defekte in den weiteren Fusionsrunden auf (Paululat et al., 1999). In den untersuchten *wech* Mutanten weisen sämtliche DA1-Muskel zwischen neun und zehn Even-skipped positive Zellkerne auf (siehe Abb. 4.14). Dies lässt darauf schließen, dass die primäre Funktion von Wech nicht bei der Fusion von Myoblasten besteht, sondern darin die Struktur der epidermalen Muskelanhaftungsstellen von *Drosophila melanogaster* auszubilden und aufrecht zu erhalten.

Ein Vergleich der Anzahl der Kerne in abgerundeten und von der Epidermis abgelösten Muskeln von *myospheroid* und *wech* Mutanten zeigt keine signifikanten Unterschiede

(siehe Abb. 4.16). Für *mysospheroid* ist eindeutig ein Adhäsionsdefekt nachgewiesen, und in ersten Untersuchungen des Proteins konnte ihm keine Funktion bei Fusionsprozessen zugeordnet werden (Wright, 1960). Trotz dieser Ergebnisse kann aber ein Fusionsdefekt in den *wech* Mutanten nicht ausgeschlossen werden, da der oben beschriebene Phänotyp sehr variabel ist und nicht in jedem Embryo der untersuchte DA1-Muskel betroffen ist. Sollte Wech eine Funktion bei der Myoblastenfusion erfüllen, so wird diese erst in den letzten Zyklen der Fusion mit den Muskelgründerzellen benötigt, da der *wech* mutante Phänotyp erst ab Stadium 15/16 auftritt. Zu diesem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster* ist die Myoblastenfusion und damit die Bildung der ausgereiften Muskeln fast abgeschlossen.

5.4 Wech Proteinexpression

Durch Färbungen an wildtypischen Embryonen wurde das Protein-Expressionsmuster von Wech dargestellt. Es weicht deutlich von dem des *wech* mRNA-Expressionsmusters ab. Zu Beginn der Embryogenese zeigen Protein und mRNA noch eine identische ubiquitäre Verteilung im Embryo, die wahrscheinlich auf die starke maternale Komponente von Wech zurückzuführen ist. Im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung beschränkt sich die Expression der *wech* mRNA ausschließlich auf das zentrale und periphere Nervensystem (siehe Abbildung 4.3), wogegen die Proteinexpression mit Beginn der Gastrulation in den invaginierenden Zellen speziell des anterioren und posterioren Mitteldarmprimordiums auftritt und zum Ende der Embryogenese nur noch in den epidermalen Muskelanhaftungsstellen zu finden ist (siehe Abbildung 4.6). Zu keinem Zeitpunkt kann eine Wech Proteinexpression in den Zellen des sich entwickelnden Nervensystems beobachtet werden, wie man es aufgrund der mRNA-Verteilung erwartet hätte. In Übereinstimmung mit der nicht nachweisbaren Proteinexpression im Nervensystem, weisen zygotische *wech* Mutanten keine Defekte in der Struktur des Nervensystems auf, was mit Hilfe von Glia- und neuronalen Markern bestätigt wurde.

Die Unterschiede zwischen mRNA und Proteinexpression könnten darauf zurückzuführen sein, dass der Grad an *wech* mRNA in den sich entwickelnden epidermalen Muskelanhaftungsstellen unterhalb der mittels *in-situ* Hybridisierung nachweisbaren Grenze liegt. Gleiches könnte für die Proteinexpression im Nervensystem gelten. Um die Sensitivität der Färbungen zum Nachweis von mRNA und Protein zu erhöhen, wurden die Färbungen mittels TSA verstärkt. Doch auch dadurch konnte keine Übereinstimmung der mRNA und Proteinexpression in den späteren Embryonalstadien bezüglich Nervensystem und epidermalen Muskelanhaftungsstelle gefunden werden.

Ob bei den Vertebraten und *C. elegans* im Hinblick auf die Verteilung der *wech* mRNA

und des Proteins eine ähnliche Diskrepanz vorliegt ist nicht bekannt, da bis heute nur die mRNA Expressionen der *wech* Orthologen in diesen Organismen näher charakterisiert wurde (Slack et al., 2000; Schulman et al., 2005; Lancman et al., 2005).

Die für Wech beobachteten Unterschiede bezüglich der mRNA und Proteinexpression finden sich noch bei einem weiteren Gen von *Drosophila melanogaster*. Die Expression des integrin-assoziierten Proteins Talin stimmt nicht mit dem mRNA-Expressionsmuster überein (Brown et al., 2002). Es gibt eine ähnliche Diskrepanz zwischen der hohen mRNA-Expression im Nervensystem und der Proteinexpression in den Muskelanhaftungsstellen. Ähnlich wie *wech*-Mutanten weisen zygotische *talin*-Mutanten keine Defekte in dem sich entwickelnden Nervensystem auf. Darüber hinaus ist Talin, genauso wie Wech, zu Beginn der Embryogenese ubiquitär, und später in den invaginierenden Zellen des anterioren und posterioren Mitteldarmprimordiums exprimiert, bevor sich die Expression auf die epidermalen Muskelanhaftungsstellen konzentriert (Brown et al., 2002). Auch für Talin gibt es noch keine Erklärung im Hinblick auf die unterschiedliche mRNA- und Protein-Verteilung. Jedoch ist seine Funktion bei der integrin-vermittelten Zelladhäsion in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle seit langem bekannt und gut untersucht. Die Ähnlichkeit zwischen Wech und Talin bezüglich der mRNA- und Proteinexpression lässt die Vermutung zu, dass sie sowohl im Nervensystem als auch in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle in gleiche Signalwege involviert, und eventuell auch an identischen Entwicklungsprozessen während der Embryogenese beteiligt sind.

Mit Hilfe von Markerproteinen für die Muskeln (α PS2) und die epidermale Tendonzelle (Short Stop), die an der Ausbildung epidermaler Muskelanhaftungsstellen bei *Drosophila* beteiligt sind, sollte die subzelluläre Lokalisation von Wech in diesen Geweben charakterisiert werden. Hierbei zeigte sich, dass Wech nicht nur in der Tendonzelle, sondern auch in den daran anhaftenden Muskeln exprimiert ist (siehe Abb. 4.8). In beiden Zelltypen ist die Wech-Expression basal lokalisiert und stimmt mit der für β PS-Integrin in diesen Geweben beschriebenen Lokalisation überein (Brown, 1994). Aufgrund der identischen Expression von Wech und β PS-Integrin in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle ist anzunehmen, dass Wech eine den Integrinen ähnliche Funktion bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung von Adhäsionsprozessen erfüllt, und somit einen den PS-Integrinen vergleichbaren mutanten Phänotyp aufweist. Darüber hinaus ist davon auszugehen dass Wech eine Funktion in dem integrin-assoziierten Proteinkomplex wahrnimmt, da eine ähnliche Diskrepanz bei der mRNA- und Protein-Verteilung im Vergleich zu Talin auftritt, dass eine essentielle Funktion bei der Ausbildung des integrin-assoziierten Proteinkomplexes erfüllt.

5.5 Vergleich der Phänotypen von *wech* und PS-Integrinen

Die in dieser Arbeit generierte *wech* Mutante von *Drosophila* weist einen den Integrinmutanten vergleichbaren Phänotyp mit von der Epidermis abgelösten und abgerundeten Muskeln auf (siehe 4.6.4). Aufgrund der Tatsache, dass Wech mit den PS-Integrinen in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle kolokalisiert (siehe 4.8) ist anzunehmen, dass dieser Muskelphänotyp ebenfalls, wie bei den Integrinen, auf eine verminderte bzw. defekte Zelladhäsion zurückzuführen ist. Um dies näher zu charakterisieren wurden die *wech* und *integrin* Mutanten auf weitere phänotypische Gemeinsamkeiten untersucht. Dabei war zu beachten, dass aufgrund ihrer unterschiedlichen Integrinuntereinheiten speziell die für die α PS-Integrine beschriebenen mutanten Phänotypen leicht voneinander abweichen. Eine Ausnahme stellt die β PS-Integrinmutante *myospheroid* dar, die alle für Integrine beschriebenen Phänotypen aufweist, da das β PS-Integrin in sämtlichen Geweben an der Ausbildung eines funktionalen Integrinrezeptors beteiligt ist (Brown, 1993; Brown et al., 2000). Aufgrund dieser Tatsache wurden die *wech* mutanten Phänotypen mit denen der *myospheroid* Mutante verglichen.

Die Phänotypen der zygotischen *myospheroid* Mutante sind, genauso wie die der *wech* Mutante, erstmals im Embryonalstadium 16 zu beobachten und lassen sich in fünf charakteristische Merkmale unterteilen: einem Defekt in der Kondensation des ventralen Nervenstrangs, einem Loch in der dorsalen Epidermis, einem Defekt in der Morphologie des Mitteldarms, abgelösten und abgerundeten somatischen Muskeln, sowie einem Defekt in der Augenentwicklung (Brown 1994, Brower et al., 1995).

Bei dem Vergleich dieser Phänotypen mit denen der *wech* Mutante stellte sich heraus, dass *wech* weder einen Defekt in der Kondensation des ventralen Nervenstrangs aufweist, noch ein Loch in der Epidermis besitzt. Des Weiteren konnte bei der detaillierten morphologischen Charakterisierung des Proventrikulus und des Mitteldarms keiner der für *myospheroid* beschriebenen Defekte, die sich in einem missgebildeten Proventrikulus und der Ausbildung von nur zwei gastrischen Caeca anstelle von vier im Wildtyp äußern (Brown, 1994), beobachtet werden. Die Unterschiede bei den Phänotypen von *wech* und *myospheroid* lassen sich darauf zurückführen, dass Wech in keinem der Gewebe eine Expression aufweist. So kann Wech zu keinem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung zum Beispiel in dem sich entwickelnden Proventrikulus nachgewiesen werden, und auch die Expression von Wech in dem anterioren und posterioren Mitteldarmprimordium ist nur kurz (Stadium 12) im Verlauf der Embryogenese vorhanden. Zusätzlich zu der nicht vorhandenen Expression von Wech im Proventrikulus findet sich auch keine Proteinexpression in den Flügelimaginalscheiben. In Übereinstimmung mit der fehlenden Expression in den Imaginalscheiben weisen die *wech* Mutanten auch nicht den für Integrinmutanten typischen Phänotyp der Blasenbildung innerhalb des Flügels auf. Um

auszuschließen, dass die nicht nachweisbare Detektion der Wech Expression im Flügel eventuell auf einer zu geringen Expression, die unterhalb der Nachweisgrenze liegt, zurückzuführen ist, wurden *wech*-RNAi-Experimente mit verschiedenen Gal4-Treiberlinien durchgeführt, die entweder ubiquitär in den Flügelimaginalscheiben exprimiert sind, oder nur in bestimmten Zellen vorkommen (Daten nicht gezeigt). Aber auch bei diesen Experimenten konnte der für Integrine typische Zelladhäsionsdefekt zwischen den beiden Flügelepithelien nicht nachgewiesen werden. Daher ist anzunehmen, dass Wech in diesem Gewebe und dem Darmepithel keine integrin-assoziierte Funktion bei der Entwicklung dieser Organe erfüllt.

Im Vergleich dazu besitzt die *wech* Mutante den für Integrine beschriebenen Phänotyp bezüglich der somatischen Muskulatur, der sich in abgerundeten und von der Epidermis abgelösten Muskeln äußert. Vergleichbar mit den *myspheroid* Mutanten tritt dieser Phänotyp erst zu Beginn von Stadium 16 in der Embryonalentwicklung auf, wenn die somatische Muskulatur vollständig ausgebildet ist und kurze Zeit später die Muskelkontraktion einsetzt (Brown, 1994). Aufgrund der Ähnlichkeiten zwischen der Expression von Wech und β PS, sowie den mutanten Phänotypen von *wech* und *myspheroid* im Hinblick auf die somatische Muskulatur, ist anzunehmen, dass Wech speziell bei der Ausbildung dieser Struktur eine entscheidende Funktion erfüllt, die wiederum mit der von Integrinen assoziiert ist. Möglicherweise dient Wech dazu, die durch Integrine vermittelte Zelladhäsion zwischen den Muskeln und der epidermalen Tendonzelle aufrecht zu erhalten und zu verstärken, indem Wech über seine Protein-Protein-Interaktionsdomänen weitere Proteine zu den Stellen der integrin-vermittelten Zelladhäsion rekrutiert. Aufgrund der Vielzahl von integrin-assoziierten Proteinen ist anzunehmen, dass in den Geweben, in denen Wech nicht exprimiert ist und auch keinen integrin-typischen mutanten Phänotyp aufweist, andere Proteine die Funktion von Wech übernehmen. Möglicherweise sind dies Proteine, die zur Klasse der RBCC-Proteinfamilie gezählt werden, oder Proteine, die eine NHL-Domäne aufweisen, da die Homologie zwischen diesen Domänen innerhalb einer Spezies relativ hoch ist (vgl. Abb. 7.5), und sie daher redundante Aufgaben wahrnehmen könnten.

Kürzlich konnten O'Farrell et al. (2008) zeigen, dass *wech* anterior und posterior von der morphogenetischen Furche, sowie in den neuronalen Photorezeptorzellen der Augenimaginalscheibe exprimiert ist. Die ektopische Expression von Wech in den Augenimaginalscheiben mit Hilfe des GMR-Gal4 Treibers führt zu einem deutlichen Defekt in den Augen der adulten Fliege. Dieser äußert sich in vergrößerten und zum Teil überlappenden Ommatidien, vergrößerten neuronalen Photorezeptorzellen, sowie einer Reduktion der Pigmentierung, was darauf hindeutet, dass ebenfalls Pigmentzellen zerstört sind (O'Farrell et al., 2008). Analysen von *myspheroid* Mutanten haben gezeigt, dass β PS-Integrine bei der Augenentwicklung speziell bei der Organisation der Photorezeptorzellen

beteiligt sind (Zusman et al., 1990, 1993). Die für *myspheroid* Mutanten beschriebenen Phänotypen stimmen teilweise mit denen der ektopischen Wech Expression in den sich entwickelnden Augen von *Drosophila* überein. Dies könnte ein erster Hinweis darauf sein, dass Wech neben seiner integrinabhängigen Funktion in den epidermalen Muskelanhaftungsstellen auch eine Funktion bei der Augenentwicklung hat, und diese eventuell ebenfalls durch die Expression von PS-Integrinen beeinflusst wird. Um die Funktion von Wech bei der Augenentwicklung näher zu charakterisieren ist es nötig, die wildtypische Proteinexpression in diesem Gewebe nachzuweisen, und weiterhin den durch Herunterregulierung mittels RNAi erzeugten Phänotyp zu analysieren.

Über die Funktion der Wech Orthologen in Vertebraten ist bis heute wenig bekannt. Erste Untersuchungen von Wech in der Maus zeigen, dass es in den adulten Skelettmuskeln partiell mit β 1-Integrin kolokalisiert (Löer et al., 2008). Vergleichbar mit dem Verlust von Integrinen in Invertebraten wie *Drosophila* finden sich eine Vielzahl der beobachteten Entwicklungsdefekte bestimmter Gewebe auch bei Mensch und Maus wieder (DeArcangelis und Georgess-Labouesse, 2000). So führt der Verlust von bestimmten Integrinen in der Maus zum Beispiel zu mesodermalen und vaskulären Defekten (Yang et al., 1993), Defekten in der Ausbildung der Muskulatur (Muskeldystrophie) (Mayer et al., 1997), sowie zu einer Reihe von epidermalen Defekten, bei der sich die Epidermis ablöst und Blasen wirft (Epidermolysis bullosa) (Georges-Labouesse et al., 1996; van der Neut et al., 1995). Dieser epidermale Defekt ist vergleichbar mit dem Verlust der Integrine im Flügel von *Drosophila*, der ebenfalls in der Bildung von Blasen und verminderter Zelladhäsion zwischen den beiden Flügelschichten resultiert.

Ob die genannten Krankheiten und Defekte nicht nur auf einen Verlust der Integrinfunktion, sondern möglicherweise auch auf eine veränderte Expression von Wech zurückzuführen sind, bleibt zu zeigen. Aufgrund der primären Funktion von Wech bei der Ausbildung der epidermalen Muskelanhaftungsstellen in *Drosophila* und der partiellen Kolokalisation von Wech mit β 1-Integrin in den Skelettmuskeln der adulten Maus ist davon auszugehen, dass die Funktion von Wech bei Vertebraten, vergleichbar mit der bei *Drosophila*, primär auf Muskelgewebe beschränkt ist.

Durch Analysen der PS-Integrinmutanten wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass die Integrinrezeptoren für die Lokalisation von Wech in den epidermalen Muskelanhaftungsstellen verantwortlich sind (siehe 4.7.1 und 4.7.2). Ob der Rezeptor Wech direkt in den Adhäsionskomplex rekrutiert, oder ob daran die mit dem Integrinen assoziierten zytoplasmatischen Proteine beteiligt sind, ließ sich anhand von weiteren Untersuchungen bezüglich dieser Proteine zeigen.

5.6 Wech fungiert als Adapter in dem zytoplasmatischen Integrin-Komplex

Um ihre adhäsive Funktion erfüllen zu können, müssen Integrine eine Verbindung mit dem Aktinzytoskelett eingehen. Diese Verbindung wird in der Regel durch eine Vielzahl von zytoplasmatischen Proteinen vermittelt, die direkt mit dem Aktinzytoskelett interagieren. Die so hergestellte Interaktion zwischen Integrinen und Aktinzytoskelett resultiert wiederum in einer Verstärkung der durch Integrine vermittelten Zelladhäsion (Zamir und Geiger, 2001). Obwohl über 50 integrin-assoziierte Proteine bekannt sind, die die Ausbildung des Komplexes vermitteln, wurden sowohl in Vertebraten als auch Invertebraten die Proteine Talin, ILK und Tensin als Hauptkomponenten identifiziert (Delon und Brown, 2007). Sie zeigen eine integrin-abhängige Expression und finden sich in den epidermalen Muskelanhaftungsstellen, den Flügelimaginalscheiben und dem Proventrikulus (Brown et al., 2002; Zervas et al., 2001; Torgler et al., 2003). Die durch das Fehlen dieser Proteine hervorgerufenen Phänotypen zeigen, dass einige der integrin-assoziierten Proteine für die Bildung und Funktion des Komplexes entscheidender sind als andere. So ähnelt der *talin* mutante Phänotyp dem der *myospheroid* Mutante, wogegen *ilk* und auch *pinch* weitaus schwächere integrin-assoziierte Phänotypen aufweisen (Delon und Brown, 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion von Wech im Hinblick auf mögliche Interaktionen zwischen Talin, ILK und Tensin in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle näher untersucht. Die Analyse der entsprechenden *Drosophila*-Mutanten zeigte, dass Talin bei der Lokalisation von Wech in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle eine Rolle spielt, und Wech wiederum die Rekrutierung von ILK und Tensin, dessen Lokalisation ILK-abhängig ist, in den Komplex vermittelt (vgl. 4.7.3). Mittels dieser Experimente war es nicht möglich eine Aussage darüber zu treffen, ob die Lokalisation von Wech in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle von Talin oder von β PS-Integrin abhängig ist, da erst durch die Interaktion von Talin mit β PS-Integrin die Integrin-Heterodimere in der Membran akkumulieren, und auch diese Anreicherung der Integrin-Heterodimere eine Rekrutierung von Wech in die epidermalen Muskelanhaftungsstellen vermitteln kann. Daher wurde in weiterführenden biochemischen Experimenten die Interaktion zwischen Wech und Talin, sowie Wech und ILK näher analysiert. Es zeigte sich, dass Wech mit Talin über dessen Kopf-Domäne interagiert (siehe Abb. 4.27 und Abb. 4.29). Bei diesen Experimenten konnte weiter festgestellt werden, dass Wech in der Lage ist, sowohl mit der N-terminalen BCC-Domäne als auch der C-terminalen NHL-Domäne eine Interaktion mit Talin einzugehen. Dabei zeigt die NHL-Domäne eine stärkere Bindung an Talin als die BCC-Domäne (siehe Abb. 4.29). Die Tatsache, dass die BCC-Domäne von Wech innerhalb von *Drosophila* stark konserviert ist, lässt die Vermutung zu, dass auch an-

5.6 Wech fungiert als Adapter in dem zytoplasmatischen Integrin-Komplex

dere Proteine der RBCC-Proteinfamilie in der Lage sind mit Talin zu interagieren. Das vor kurzem neu identifizierte muskelspezifische RBCC-Protein ABBA (**A**nother **B**Box **A**ffiliate) beispielsweise verfügt wie Wech über eine C-terminale NHL-Domäne und wird in den embryonalen und larvalen Muskeln exprimiert ist (O'Farrell et al., 2008). Biochemische Interaktionsstudien müssen noch zeigen, ob ABBA oder andere RBCC-Proteine in der Lage sind, mit Talin und anderen Komponenten der integrin-vermittelten Zelladhäsion zu interagieren und, ob RBCC-Proteine eine generelle Funktion bei Zelladhäsionsmechanismen übernehmen können.

Neben der Interaktion mit Talin konnte auch eine Protein-Protein-Interaktion von Wech mit ILK nachgewiesen werden. In diesem Fall erfolgt die Interaktion der beiden Proteine über die N-terminale BCC-Domäne von Wech mit der C-terminalen Proteinkinase-Domäne von ILK (siehe Abb. 4.27). Ebenso wie für Talin beschrieben, besteht auch hier die Möglichkeit, dass ABBA oder andere *Drosophila* RBCC-Proteine eine Interaktion mit ILK über die konservierte BCC-Domäne eingehen.

Durch die in dieser Arbeit gewonnenen neuen Erkenntnisse bezüglich der Funktion von Wech in dem zytoplasmatischen Integrin-assoziierten Komplex in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle kann das in Abb 5.5 dargestellte Modell formuliert werden. Wech fungiert als Adapter zwischen dem an Talin gebundenen Integrinrezeptor und dem zytoplasmatischen ILK-Tensin-Komplex, der wiederum mit dem Aktinzytoskelett verbunden ist. Somit erfüllt Wech eine entscheidende Funktion bei der Ausbildung des zytoplasmatischen Integrin-Komplexes und der integrin-vermittelten Zelladhäsion, indem es die Verbindung zwischen ILK und Talin vermittelt.

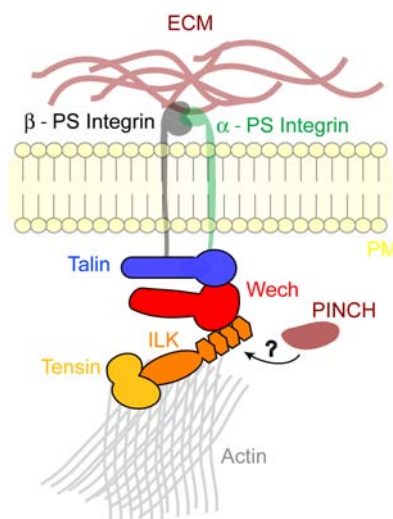


Abb. 5.5: Modell der Adapterfunktion von Wech in der integrin-vermittelten Zelladhäsion. Wech verbindet als Adapterprotein über seine Protein-Protein-Interaktionsdomänen den an Talin gebundenen Integrinrezeptor mit dem zytoplasmatischen ILK-Tensin-Komplex, der mit dem Aktinzytoskelett in Verbindung steht. Welche Funktion PINCH in diesem Zusammenhang erfüllt, ist noch unklar (durch ? gekennzeichnet). Die mit Wech interagierenden Proteine sind hervorgehoben.

Bis heute war nicht bekannt, wie die Verbindung zwischen Talin und den weiteren Komponenten des integrin-assoziierten Proteinkomplexes erfolgt. Man hat angenommen, dass Talin entweder direkt mit dem Aktinzytoskelett interagiert und so weitere Proteine in den Komplex rekrutiert oder, dass ein Adapterprotein an Talin bindet, das wiederum mit weiteren Komponenten des Komplexes in Verbindung steht. Mit der Identifizierung von Wech konnte diese Wissenslücke geschlossen und die Hypothese über die Existenz eines möglichen Adapterproteins bestätigt werden. Wech fungiert, wie oben schon erwähnt, als Adapter zwischen Talin und ILK und bringt so die beiden Komponenten des integrin-assoziierten Proteinkomplexes zusammen. Diese Funktion scheint aber auf die epidermale Muskelanhaftungsstelle von *Drosophila* beschränkt zu sein, da Wech in keinen weiteren Geweben, in denen integrin-vermittelte Zelladhäsion vorkommt, exprimiert ist. Ob in diesen Geweben ein anderes Protein die Adapterfunktion von Wech übernimmt oder ein anderer Mechanismus für die Interaktion zwischen Talin/Integrinrezeptor und dem Aktinzytoskelett greift, bleibt zu zeigen.

Die Rolle von PINCH in diesem Zusammenhang ist unklar. In *wech* Mutanten zeigt PINCH keine veränderte Expression innerhalb der epidermalen Muskelanhaftungsstelle, und ILK ist in *pinch* Mutanten ebenfalls weiterhin in den epidermalen Muskelanhaftungsstellen exprimiert (Clark et al., 2003). Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, dass Wech für die Verbindung zwischen Talin und dem ILK enthaltenden Multiproteinkomplex benötigt wird. Im Gegensatz dazu übernimmt PINCH möglicherweise eine Funktion bei der Zusammenlagerung des ILK enthaltenden Multiproteinkomplexes.

Neben den Daten aus der Zellkultur, die zur Formulierung des oben gezeigten Modells geführt haben (Abb. 5.5), zeigen auch erste Experimente in *Drosophila*, dass die für die Interaktionen von Wech mit Talin und ILK wichtigen Domänen, die BCC- und NHL-Domäne, für die Funktion von Wech in der integrin-vermittelten Zelladhäsion innerhalb der epidermalen Muskelanhaftungsstellen *in vivo* essentiell sind. Die Überexpression der entsprechenden Wech-Deletionskonstrukte mit Hilfe des Gal4-UAS-Systems führt zu einem dominant-negativem Phänotyp, der dem in den *wech* Mutanten beschriebenen Phänotyp von abgerundeten und von der Epidermis abgelösten Muskeln entspricht (siehe Abb. 4.31). Ebenso zeigen die Deletionsproteine nicht mehr die für Wech beschriebene basale Lokalisation in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle, sondern sind diffus im Zytoplasma lokalisiert (siehe Abb. 4.32). Diese zytoplasmatische Lokalisation kann zum einen auf die erhöhte Proteinkonzentration in der Zelle durch die Überexpression mit dem Gal4-UAS-System zurückgeführt werden, deutet aber auch darauf hin, dass die für die Lokalisation von Wech benötigten Interaktionen nicht mehr vermittelt werden können sobald eine der Domänen deletiert ist.

Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass die für Wech *in vitro* beschriebene Adapterfunktion in dem aus Talin und ILK bestehenden Multiproteinkomplex für die integrin-

vermittelte Zelladhäsion innerhalb der epidermalen Muskelanhaftungsstelle auch *in vivo* bei *Drosophila* essentiell ist.

Erste Untersuchungen bezüglich der Funktion von Wech in Vertebraten haben gezeigt, dass Wech auch hier in den Muskeln der adulten Maus mit Talin und ILK kolokalisiert (Löer et al., 2008). Des Weiteren kann bei siRNA-Experimenten mit Wech in verschiedenen humanen Zellkulturlinien eine verminderte Zelladhäsion nachgewiesen werden (R. Bornheim, persönliche Mitteilung). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Funktion von Wech zwischen Vertebraten und Invertebraten möglicherweise konserviert ist, und Wech auch in diesen Organismen eine Adapterfunktion innerhalb des integrin-assoziierten Multiproteinkomplexes erfüllt. Aufgrund der Tatsache, dass die Lokalisation von Wech mit Talin und ILK auch in der Maus ausschließlich auf die Muskeln beschränkt ist, kann man die Vermutung anstellen, dass die Adapterfunktion von Wech auch in Vertebraten auf die epidermalen Muskelanhaftungsstellen beschränkt ist.

5.7 Interaktionspartner von Wech bestätigen eine Funktion in der Muskulatur

Zur Identifizierung von neuen Interaktionspartnern des *Drosophila* Wech-Proteins wurde das Cytotrap-System der Firma Stratagene verwendet, eine Variante des neu entwickelten „Ras-Recruitment“-Systems (Broder et al., 1998).

Nach der Durchmusterung der cDNA-Bibliothek wurde eine Reihe unterschiedlicher potentieller Interaktionspartner von Wech gefunden (siehe 4.9.6). Eine Vielzahl der identifizierten Interaktionspartner (z.B. eIF4a, eIF5, RpL3 und Calreticulin) sind an grundlegenden Mechanismen der Zelle wie Transkription, Translation, Zellmetabolismus und Transport beteiligt.

Darüber hinaus konnten noch weitere Interaktionspartner identifiziert werden, welche die für Wech postulierte Funktion im Muskel und bei der Zelladhäsion unterstützen. Zu diesen Interaktionspartnern zählen das Muskelprotein 20 (Mp20), die cAMP-abhängige Proteinkinase (Pka-C3), sowie β -Spectrin. So ist bekannt, dass die cAMP-abhängige Proteinkinase neben der Phosphorylierung von bestimmten Aminosäuren auch bei der Muskelkontraktion eine entscheidende Rolle spielt, indem es die für die Kontraktion erforderlichen Nervenimpulse an die Muskulatur weiterleitet (Melendez et al., 1992). Ein weiterer Interaktionspartner, das Muskelprotein 20 (Mp20) weist ebenfalls auf eine Funktion und Lokalisation von Wech im Muskel hin. Mp20 wird in sämtlichen Muskelgeweben, mit Ausnahme der asynchronen Flügelmuskulatur, exprimiert (Ayme-Southgate et al., 1989). Des Weiteren ist es in der Lage mit Aktin eine Verbindung einzugehen und so bei Zelladhäsionsmechanismen mitzuwirken, die mit denen von Wech vergleichbar sind. Aufgrund der Tatsache, dass diese Proteine zwischen Vertebraten und Invertebraten

konserviert sind, und die für *Drosophila* beschriebenen Funktionen auch für Vertebraten bekannt sind, ist davon auszugehen, dass die genannten Interaktionspartner auch in Vertebraten mit den *wech* Orthologen interagieren und an ähnlichen Mechanismen beteiligt sind.

Ein weiterer interessanter potentieller Interaktionspartner von Wech ist β -Spectrin, das als strukturelle Komponente des Zytoskeletts Aktin und Mikrotubuli bindet (Thomas und Kierhart, 1994; Sisson et al., 2000). β -Spectrin ist an einer Vielzahl von Protein-Protein-Interaktionen in verschiedensten Geweben beteiligt, die zur Umstrukturierung und Polarisierung des Aktinzytoskeletts beitragen (Bennett und Gilligan, 1993). Es ist daher wahrscheinlich, dass β -Spectrin bei einem dieser gewebespezifischen Prozesse mit Wech interagiert, und diese Interaktion so unter anderem zur Restrukturierung des Aktinzytoskeletts in den Muskeln oder der epidermalen Tendonzelle beiträgt, die wiederum für die integrin-vermittelte Zelladhäsion essentiell ist.

In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass β -Spectrin apiko-lateral in der Plasmamembran lokalisiert ist (Sisson et al., 2000). Eine vergleichbare apiko-laterale Lokalisation in der Epidermis und dem Hinterdarm ist auch für Innexine, den Gap Junction bildenden Proteinen von *Drosophila melanogaster*, beschrieben (Bauer et al., 2004). Die Innexin-Proteine wiederum spielen eine Rolle bei der Lokalisation des apiko-lateralen Bazooka-Komplexes (Martini, 2007). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Gap Junction Proteine die Etablierung der zellulären Polarität durch die Positionierung von Proteinen wie Bazooka oder auch β -Spectrin beeinflussen können.

Wech interagiert sowohl mit β -Spectrin als auch mit dem Gap Junction Protein Innexin3. Möglicherweise liegen diese Proteine in einem Komplex vor und sind an der Etablierung der zellulären Polarität in den entsprechenden Geweben beteiligt.

5.8 Wech ist für die Funktion von Innexin3 bei der integrin-vermittelten Zelladhäsion verantwortlich

Der Wech-Interaktionspartner Innexin3 zeigt eine Expression im Vorder- und Hinterdarm, im Gehirn und in der Epidermis (Löer, 2003). Weiterhin kann mit dem gegen den C-Terminus gerichteten Innexin3-Antikörper ein verstärktes Signal in den Segmentgrenzen der Epidermis, sowie den epidermalen Muskelanhaftungsstellen beobachtet werden (siehe Abb. 4.38). Innexin3 kolokalisiert mit Wech und den weiteren Komponenten des integrin-assoziierten Proteinkomplexes nur in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle (siehe Abb. 4.39 und Abb. 4.40). In Vorder- und Hinterdarm sowie der Epidermis tritt keine Koexpression auf. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Interaktion von Innexin3 und Wech vermutlich auf die Struktur der epidermalen Muskelanhaftungsstelle beschränkt ist, und die Funktion von Innexin3 bei der integrin-vermittelten Zelladhäsion eventuell

mit der von Wech identisch ist. Die Expression von Innexin3 zeigt in *wech* Mutanten keine veränderte Lokalisation im Proventrikulus, Hinterdarm und den Speicheldrüsen. Dagegen ist in diesen Mutanten kein Innexin3 in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle vorhanden (siehe Abb. 4.41). Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass Wech, welches ausschließlich in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle mit Innexin3 interagiert, möglicherweise für dessen Rekrutierung in den integrin-vermittelten Zelladhäsionskomplex verantwortlich ist. Ob in diesem Zusammenhang die von Wech abhängige Lokalisation von ILK und Tensin eine Rolle bei der Innexin3-Expression in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle spielt, muss durch weitere Mutantenanalysen gezeigt werden.

Dass Innexin3 wie Wech eine Funktion bei der Zelladhäsion in den epidermalen Muskelanhaftungsstellen erfüllt, zeigen RNAi-Experimente in der Tendonzelle. Die beobachteten Muskeldefekte waren mit denen von *wech* Mutanten vergleichbar. Jedoch waren sie nicht so stark ausgeprägt und traten erst ab Stadium 17 auf. Der schwächere und später auftretende Muskelphänotyp, der mit dem von *ilk* Mutanten vergleichbar ist, unterstützt die These, dass Wech für die Lokalisation von Innexin3 benötigt wird.

Ob neben Innexin3 weitere Innexine in die integrin-vermittelte Zelladhäsion involviert sind, ist unbekannt. Ein möglicher Kandidat ist Innexin2, das wie Innexin3 vermehrt in den Segmentgrenzen des sich entwickelnden Embryos exprimiert ist und direkt mit Innexin3 interagiert (Lehmann et al., 2006). Eine Expression von Innexin2 in den epidermalen Muskelanhaftungsstellen konnte allerdings mit den vorhandenen anti-Innexin2-Antikörpern bis jetzt nicht nachgewiesen werden; und erste RNAi-Experimente in der Tendonzelle zeigen keine abgerundeten und abgelösten Muskeln. Da gezeigt wurde, dass die Innexine 2 und 3 von *Drosophila* heteromere Kanäle bilden, und bis jetzt nicht bekannt ist, dass Innexin3 in der Lage ist homomere Kanäle zu bilden, könnten die Ergebnisse darauf hindeuten, dass Innexin3 homomere Kanäle bildet. Darüber hinaus sind die Ergebnisse ein erster Hinweis für die Funktion eines Gap Junction Proteins bei der integrin-vermittelten Zelladhäsion.

5.9 Innexine werden für die Spezifizierung der embryonalen Segmentgrenzen von *Drosophila melanogaster* benötigt

Da die Expression von Innexin3 schon vor der Spezifizierung der Tendonzelle in den Segmentgrenzen von *Drosophila* beobachtet werden konnte, wurde die Funktion von Innexin3 und des kolokalisierten Innexin2 bei der Ausbildung der Segmentgrenzen näher analysiert.

Die Bildung und Aufrechterhaltung der Segmentgrenzen erfordert die kontinuierliche Expression von Engrailed, Hedgehog und Wingless (siehe 4.11), deren Expression einem

„Feedback Loop“ unterliegt (Larsen et al., 2003).

Die Analyse der Proteinexpressionsmuster von Innexin 2 und 3 zeigte, dass diese in den Segmentgrenzen lokalisiert sind, und sich die Expression auf die posteriore *Engrailed* exprimierende Zelle sowie die drei angrenzenden posterioren Zellen beschränkt. (vgl. 4.49 und 4.50). Diese distinkte Expression von Innexin in den Segmentgrenzen zeigt Parallelen zu der kürzlich identifizierten Regulation von Innexin2 und Hedgehog bei der Bildung des Proventrikulus (Lechner et al., 2007). Bei den Untersuchungen bezüglich der Musterbildung des Proventrikulus stellte sich heraus, dass *hedgehog* und *wingless* die Gap-Junction-vermittelte Kommunikation transkriptionell durch Aktivierung von *innexin2* regulieren; *innexin2* wird aber auch gleichzeitig für die Transkription der Gene *hedgehog* und *wingless* benötigt, so dass ein positiver „Feedback-Loop“ zwischen diesen Faktoren besteht (Lechner et al., 2007). Die Charakterisierung der Mutanten von *hedgehog* und *wingless*, bei denen die Ausbildung der Segmentgrenzen gestört ist, zeigen einen Verlust der epidermalen Innexin3-Expression im Bereich der Segmentgrenzen (siehe 4.46). Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass Innexine auch in der Epidermis von *hedgehog* transkriptionell reguliert werden könnten. Diese Ergebnisse stimmten mit denen von *engrailed* Mutanten überein, bei denen ebenfalls keine Segmentgrenzen mehr ausgebildet sind. Der Verlust von Innexin3 in diesem Bereich kann somit eventuell auf die fehlende *hedgehog* Expression in den Mutanten zurückgeführt werden (siehe 4.48). Einen weiteren Hinweis, dass ähnlich wie im Proventrikulus gezeigt, ein „Feedback-Loop“ zwischen Innexinen und *hedgehog* an den Segmentgrenzen existiert, liefert die Analyse der *wingless* Mutanten. In diesen Mutanten wird die Expression von *hedgehog* anterior nicht reprimiert, so dass in diesem Bereich eine zusätzliche Segmenteinbuchtung auftritt. Diese durch *hedgehog* induzierte Segmenteinbuchtung weist *innexin3* Expression auf (siehe 4.47) und ist ein Indiz für die transkriptionelle Regulation von Innexinen durch *hedgehog*. Allerdings konnte bis jetzt noch nicht gezeigt werden, dass in dieser ektopischen Segmenteinbuchtung auch *hedgehog* Expression vorliegt.

Neben der Charakterisierung der *engrailed*, *hedgehog* und *wingless* Mutanten wurden auch die durch *innexin3*-RNAi-Expression bzw. die durch Überexpression von Innexin3 im Bereich der Segmentgrenzen hervorgerufenen epidermalen Phänotypen analysiert. Hierbei zeigte sich, dass der Verlust von *innexin3* ebenfalls einen Wegfall der Segmentgrenzen zur Folge hat. Im Vergleich dazu führt die ektopische Expression von Innexin3 in der Epidermis in diesem Bereich zu zusätzlichen Einbuchtungen. Ob in diesen Mutanten auch die Expression von *hedgehog*, *wingless* oder *engrailed* verändert ist, müssen weitere Analysen zeigen. Sollte dies der Fall sein, würde sich der für den Proventrikulus postulierte Mechanismus der transkriptionellen Regulation von Innexinen durch *hedgehog*, die wiederum über einen „Feedback-Loop“ gekoppelt ist, auch für die Epidermis und damit der Segmentgrenzenbildung bestätigen.

Kapitel 6

Zusammenfassung

Die Verbindung der Muskeln mit dem Exoskelett wird in *Drosophila* durch die Tendonzelle vermittelt. Die dabei entstehende Struktur bezeichnet man als epidermale Muskelanhaftungsstelle. Für die endgültige und dauerhafte Anheftung der Muskeln an die Tendonzelle werden Zelladhäsionsmoleküle benötigt. In diesem Fall wird die Zelladhäsion durch Integrinrezeptoren vermittelt, die sich als Heterodimer aus einer α - und einer β -Untereinheit zusammensetzen. Damit die Muskelkraft optimal auf das Exoskelett übertragen werden kann, ist neben der Verbindung der Integrinrezeptoren mit der Extrazellulären Matrix auch eine Verbindung mit dem Aktinzytoskelett entscheidend. Diese Verbindung wird über den sogenannten integrin-assoziierten Proteinkomplex vermittelt, deren Hauptkomponenten die zytoplasmatischen Proteine Talin, ILK und Tensin sind. Über die genaue Rekrutierung und Zusammenlagerung der integrin-assoziierten Proteine ist bisher wenig bekannt.

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der molekularen und funktionalen Charakterisierung einer durch P-Element Mobilisierung erzeugten Mutante des *Drosophila wech* Gens. Der Phänotyp der homozygot letalen Individuen zeichnete sich durch abgerundete und von der Epidermis abgelöste Muskeln aus, und entspricht damit dem für Integrinmutanten beschriebenen Phänotyp (Brown, 1994). Antikörperfärbungen zeigten, dass Wech in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle exprimiert ist. Aufgrund der Expression und des mutanten Phänotyps, der mit dem von Integrinmutanten vergleichbar ist, wurde die Funktion von Wech bei der integrin-vermittelten Zelladhäsion untersucht. Durch Funktionsverlustexperimente, die *wech*, βPS -integrin, sowie die Hauptkomponenten des integrin-assoziierten Proteinkomplexes betrafen, konnte gezeigt werden, dass Wech als Adapter in dem integrin-assoziierten Proteinkomplex fungiert und über direkte Interaktionen zwischen Talin und ILK/Tensin an dem Aufbau des Multiproteinkomplexes beteiligt ist. Damit konnte in dieser Arbeit erstmals ein Modell entwickelt werden, in

dem ein Adapterprotein (Wech) für die Rekrutierung von ILK/Tensin an das an den Integrinrezeptor gebundene Talin benötigt wird.

Zur weiteren Charakterisierung des Wech Proteins wurde die C-terminale NHL-Domäne des Wech Proteins in das „Ras-Recruitment“-System als Köderprotein eingesetzt. Die identifizierten Interaktionspartner bestätigen die für Wech postulierte Funktion als Adapterprotein in den Muskeln und seine Rolle bei Zelladhäsionsmechanismen.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit, neben der funktionalen Analyse des neu identifizierten *wech* Genlokus, die Funktion seines Interaktionspartners Innexin3 in der Epidermis gezeigt werden. Es bestätigte sich, dass Innexin3-Expression in der epidermalen Tendonzelle vorhanden ist und RNAi-Experimente in dieser Zelle zu einem mit der *wech* Mutante vergleichbaren Adhäsionsdefekt führen. Des Weiteren war eine frühere Innexin3-Expression in den Segmentgrenzen zu beobachten. Durch Funktionsverlust- und Überexpressionsexperimente konnte gezeigt werden, dass Innexine für die Ausbildung der Segmentgrenzen essentiell sind, und ihre transkriptionelle Regulation wahrscheinlich von *hedgehog* abhängig, und über einen positiven „Feedback-Loop“ gekoppelt ist.

Kapitel 7

Anhang

7.1 Die somatische Muskulatur von *Drosophila melanogaster*

Die Nomenklatur der Muskeln beruht auf deren individueller Lage und Ausrichtung im Embryo (Bate, 1993). Darüber hinaus unterscheidet man weiter in dorsale, laterale und ventrale Muskeln und je nach Ausrichtung in „oblique“ Muskeln (von anterior-dorsal nach posterior-ventral) und in „acute“ Muskeln (von anterior-ventral nach posterior-dorsal). Des Weiteren unterscheidet man in longitudinale Muskeln, die von anterior nach posterior verlaufen, während die transversalen Muskeln von dorsal nach ventral verlaufen.

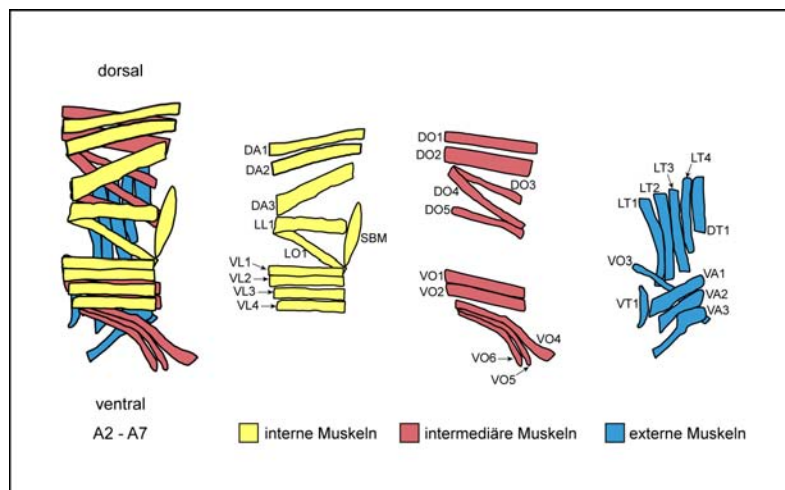


Abb. 7.1: Schematische Darstellung der somatischen Muskulatur von *Drosophila melanogaster*. Dargestellt sind die verschiedenen Muskellagen der somatischen Muskulatur der Abdominalsegmente A2 bis A7. **DO** = dorsal-oblique; **LO** = lateral-oblique; **VO** = ventral-oblique; **DA** = dorsal-acute; **VA** = ventral-acute; **LL** = lateral-longitudinal; **VL** = ventral-longitudinal; **DT** = dorsal-transversal; **LT** = lateral-transversal; **SBM** = Segmentgrenzen-Muskel.

7.2 Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster*

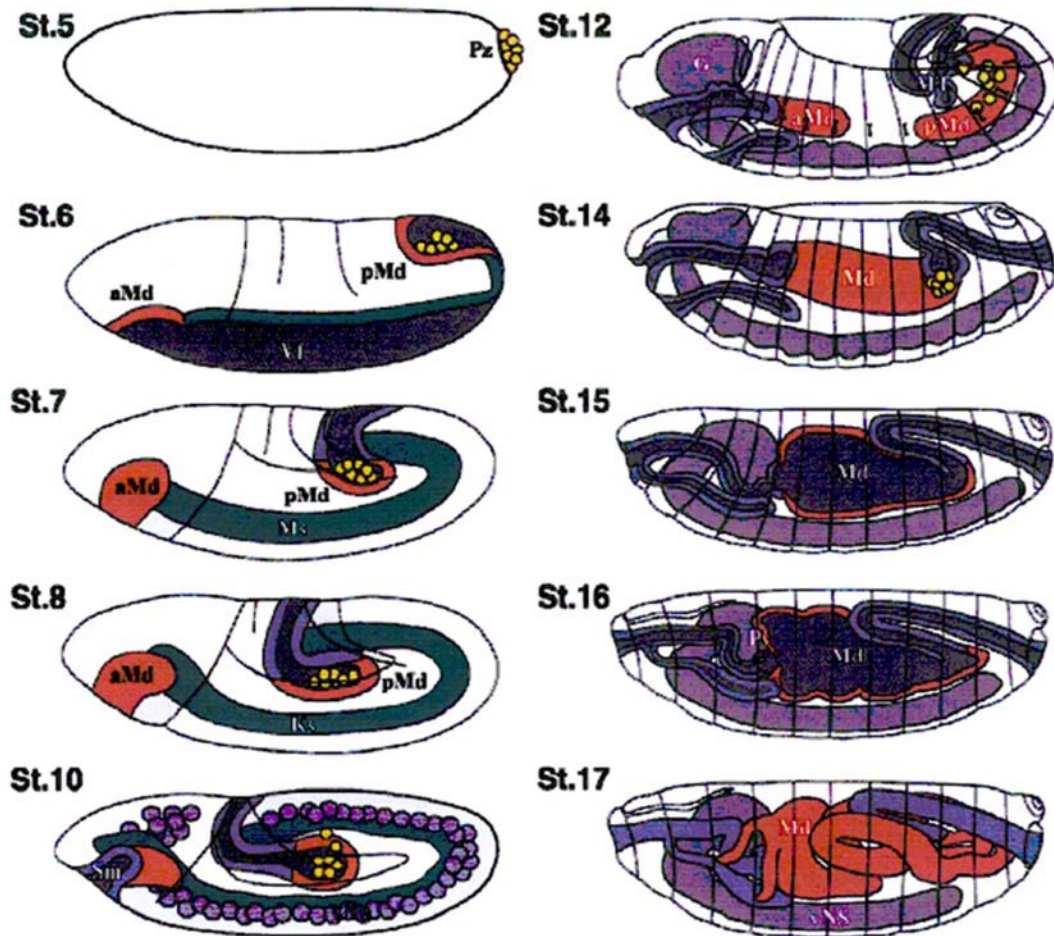


Abb. 7.2: Schematische Darstellung der Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster* (nach "Atlas of Drosophila development", Cold Spring Harbour Press, 1993). **Stadium 5:** Zelluläres Blastoderm. **Stadium 6:** Invagination der Ventralfurche zu Beginn der Gastrulation. **Stadium 7:** Vollendung der Gastrulation. Invagination von anterioren und posterioren Primordien des Intestinaltraktes. **Stadium 8:** Ausdehnung des Keimstreifens. **Stadium 10:** Invagination des Stomodäums. **Stadium 11:** Die epidermale Segmentierung wird sichtbar. Die Darmprimordien vergrößern sich. **Stadium 12:** Verkürzung des Keimstreifens. Anteriore und posteriore Mitteldarmprimordien wandern entlang des angrenzenden viszeralen Mesoderms und fusionieren. Vergrößerung der Anlagen für die Malphigischen Gefäße. **Stadium 14:** Beginnende Kopfinvolution. **Stadium 15:** Mitteldarm und Epidermis schließen sich dorsal. **Stadium 16:** Die drei Mitteldarmkonstriktionen werden angelegt. Beginnende Einfaltung der Proventrikulus-Epithelien. **Stadium 17:** Vollendung der Konstriktionen und der Proventrikulus-Morphogenese. **St.** = Stadium; **G** = Gehirn; **Ks** = Keimstreifen; **Md** = Mitteldarm; **Ms** = Mesoderm; **MT** = Malphigische Gefäße; **pMd** = posteriorer Mitteldarm; **Pv** = Proventrikulus; **Pz** = Polzellen; **Sd** = Speicheldrüsen; **Sm** = Stomodäum; **Vd** = Vorderdarm; **Vf** = Ventralfurche; **vNb** = ventrale Neuroblasten; **vNS** = ventrales Nervensystem.

7.3 Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz von *wech*

```

1  AAGGTTGGAGTGAAGATTTTGGAGCCGAATTCGAATCCTAGTCCCCGCCGCAATAAGTGGGTGAGAAATGGAGCCGCTCGAT
82  TGGGCCAAACAAAAGCTGGGCGCCACCGCAGACTGCAGCTAAAACACGCCGCAAAAGTAATTGGAAGAAGAACGAGGCGC
163  ACAATAGGAATAATTTGTCATGGATTTTTCGATTTCTCGTTCCGTTGCAGAGGAAAAGTGCACGAGGGTGGAAACCAAGG
244  GTAATAAGATTCCGCCGAAAACGCTTGGAAAATGTAACAATCTGTAAGCACACGCGACGATAAGCGATTTTCAAAGAGTT
325  TGCCAGCTTTTACATCGATCAAACTCGCATATAAACAAGTAAGAAGTACGATTAATCGAATGGAAGTGGAGTGAC
406  GACTATGGGATACCCCTAGGACCGCGTAGTGAATGAATTTGACAACGGAAAAGGCCACTCCATTGACTGCTCTGTTG
      M E L L S N N S V P Q Q M A S S N 18
487  CTATAGAACGTTGATTCACCACCTGATGGAACTTTGTCAAACAATTCGGTCCGCAACAATGGCCAGCAGCAAT
      A P S A N N V A H S S T A N G S G G G S V S S N A S N 45
568  GCGCCGAGCCCAACAATGTGGCCACTCCTCAACGGCAACGGAAGTGGAGGCGGAGTGTGAGCAGCAATGCCAGCAAC
      S E R L L A G I L E S F P A W D L N V G L L P N V G 72
649  TCCTCCGAGGACTGTGGCGGGATCTGGAGAGCTTTCCCGCTGGGACCTCAACGTGGGACTACTGCCAACGTTGGGC
      Q S S P P R A D F F I N N F L G G L D H G D F S I G 99
730  CAGAGCTCACCACCAGCGCAGACTTCTTATCAATAAATTCCTGGCGGCTGGACACGCGATGGCGACTTCAGCATTTGGA
      P I G S G A R S N P K M S P E S S N N S S I S C G W C 126
811  CCCATTGGCAGCGTCCCGCAGCAATCCGAAGATGTCCGAGAGTCTAACAACTCGAGCATCAGCTCGCGTTGGTGC
      E V S A S I R C L E C N E F M C N D C L R E H R N S P 153
892  GAGGTTAGTGTCAATACGCTGCGTGGAGTGCACAGGATTCATGTGCAACGACTGCCTAAGGAGCATCCCAACAGCTCCG
      L S S N H S I V S L P T P I G A S P T G G S S V N A Q 180
973  CTGTCTCCAACCTCGATCGTGTCTTGGCCACGCCATGGAGCCTCGCCACGGGTGGCAGCTCGGTAATGCACAG
      T P P S G N F I C D I H N E M L R Y V C D Y C R K L V 207
1054  ACTCGCCGAGCCGCAACTTTATCTGCGACATACACAACGAGATGTCGTACTGATGTGACTACTGCCGAAAATTTGGTGT
      C Q C C T L H E H K E H S Y A S I Q S F M V G S K E K 234
1135  GTCAGGTCTGCACACTGCACGAGCACAAGGACACAGCTACGCGTCCATCCAAGCTTTATGGTGGGCTCGAAGGAGAG
      L E G A I E S S Q V G T R C I K S S I D K A L A F I R 261
1216  CTGGAGGGCCCATTTAGAGCAGCCAGGTGGCCAGCGCTGCATTAAGAGCAGCATTGACAAAGCGTTGGCCTTCATCCGG
      L I E R N C S E L S D N I R K A F R Q F I I A I E D R 288
1297  CTTATCGAGCGCAATTCAGCGAGCTGAGCGATAATATACGCAAGGCATTCCGTCAGTTTATCATTGCCATCGAGGACCGC
      E R F L L D F V E K L R Q R R L A I L H D Q M A G L K 315
1378  GAGCGTTTCTCTGGACTTTGTGAAAAGCTCCGCGAGCGTCTGCGCCATCCTACAGCATCAGATGGCAGGCTTAAG
      S A L A G L S E T S D M L S K V A D N A C N M D Q I E 342
1459  TCTGCTTCGCGGACTCTCGAAACGTCGATATGCTTAGCAAGGTGGCGGACAATGCCTGCAACATGGACCAGATTGAA
      I A M K L T N G Q R Q M E Q F A G I Y K D L Q P K Q E 369
1540  ATTGCCATGAAGTTGACCAATGGCCAGAGCAGATGGAGCAGTTTGGCGGCATATATAAGGACCTCGAGCCAAAACAGGAA
      V F A F A P P D Y S L L Q D I R N Q G G V I L V D D K 396
1621  GTCTTGGCCTTCGACCACAGATTACAGCTGTACAGGATATCCGCAACAGGTTGGCCTTATCCTGGTGGACGACAA
      N L P I V S S S N L P I V P S V S S V N A V A A A S V G 423
1702  AACTTGCCCATCGTCTTAGCAGCAACGGAATTTGCGGAGCGTCTCCAGTGTAAATGCCGTGGCCGCGCCTCCGTGGGA
      V V G G V A G V V G G V G V S N G L D L A F G M N M P 450
1783  GTTGTGGGAGCGCTTGTGGAGTAGTCGGAGCGTGGCGGTGCAACGGCCTGGACTTGGCCTTCGGCATGAACATGCC
      N N P L S V A S S V R R P L L R D N S F R I P S P I 477
1864  AACAACTCCGCTGAGTGTGCTTCCCTCAAGTGTGCGAGCTCCCTGTTGCGAGACAATAGCTTCCGGATCCATGCCCA
      M Q P R G G S A C G M S S G M S S A A L D W E L N G L 504
1945  ATGCAACACGGGAGGAAGTGCCTGTGGATGTCCAGTGGATGTCAGCGTCTTGGATTGGAACTCAATGGACTG
      R S S P G L H F S A P R T Q A I P G C M D L V K V R 531
2026  CGCAGCTCGCCAGGATTACACTTCAGTGCAGCGCAACACGAGGCTCCGGGATGCATGGATCTGGTCAAGGTGGCT
      N S N A L S L S F A T E G H E D G Q V S R P W G L C V 558
2107  AACTCGAATGCTCTCTCGCTATCTTCCGACCCGAGGCGCACGAGGACGAGTGTGAGCCGCGCATGGGCTCTATCGCTT
      D K M G H V L V S D R R N N R V Q V F N P D G S L K F 585
2188  GATAAAATGGCCAGCTTCTCGATCGGATCGCGCAACAATCGCGTCCAGGCTTCAATCCGATGGCTCCCTAAAGTTC
      K F G R K G V G N G E F D L P A G I C V D V D N R I I 612
2269  AAATTCGGCGTAAAGCGTGGGCAATGGAGAGTTCGATCTGCCTGCTGGAATCTGTGTTGACGTTGATAATCGCAATT
      V V D K D N H R V Q I F T A S G V F L L K F G S Y G K 639
2350  GTGGTCGACAAGGACAATCACCGGTGTGCAAACTTTACCGCCAGCGCGCTTCTCGTCAAGTTCCGACGCTACGGCAAG
      E Y G C Q F Q Y P W D V A V N S R R Q I V V T D S R N H 666
2431  GAGTAGCGCCAGTTCAGTATCCGTGGATGTGGCGTGAACCTCGCCGCAAAATTTGGTGTACCGACTCGCCGCAATCAT
      R I Q Q F D S E G R F I R Q I V F D N H G Q T K G I A 693
2512  CGCATCCAGCAGTTCGACTCTGAGGTCGCTTCATCCGCGAGATAGTGTTCGACAACCATGGGCAACCAAGGAATCGCC
      S P R G V C Y T P T G N I I V S D F D N H C L Y L I D 720
2593  TCGCCACGAGGCGTTTGTACACGCCGAGGGCAACATCATAGTGTCTGACTTTGACAACCACTGCCTTACCTGATTGAT
      P D I N D I L S V K G H E G S G F H E F N R P S G L C 747
2674  CCGACATCAACGACATTCTTCCGTGAAGGACATGAGGCTCGGGCTCCATGAATTAATCGACCTCCGGCCTGTGC
      C D A E G R I I V A D S K N Q R I L V F N Q N L D F M 774
2755  TGTGACGACGAGGCGCCATTATAGTGGCCGATTCAAGAATCAACGCATCCTGGTCTTCAATCAGAACCTGGACTTTATG
      W D I E V R P S I N P L M P P L D E K D R T C D V A 801
2836  TGGGATATCGAGGTGCGACCTCCATCAATCCCTTGATGCCGCCACGCTGGACGAGAAGATCGCACTTGCATGTGGCC
      I M P D G R I V F L I E L S P D S K E G S N P Y K R F 828
2917  ATAATGCCAGACGCTCGCATTTGTCTTCCATTGAAGTGTGCGCCAGACTCCAAGGAAGGTCAAACCCCTTCAAGCGGTT
      V H V F 832
2998  GTGCACGTTATTCATAAGGCCACGAGTGGCAGTCTTTTTTTAGACCAATTTACAAGAGCGAAACCTTAGCGTAGAGTT
3079  TCACTGACGATTATGAGGAGGTGCCGAAACCGATTGAAAAAATCTGAATCATGAAAGTTAGCGAAAAT
3160  TTTTAGCTTAAGTGCTACAACGATTACCTCGATATTGCTTAAGAGTTATGGTACGATTGGTAATTTACAAATACAATACG
3241  AATTACACATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Abb. 7.3: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz von *wech*. Die Konsensussequenz für den Translationsstart ist grün markiert. Start- und Stopcodon sind fettgedruckt und rot. N-Glykosylierungen und Phosphorylierungen sind in türkis bzw. gelb dargestellt. Die beiden alternativ verwendeten Polyadenylierungsstellen sind blau markiert.

7.4 Sequenzvergleich der Wech Orthologen



Abb. 7.4: Sequenzvergleich der *Drosophila* Wech Orthologen. Dargestellt sind die Sequenzen der Wech Orthologen aus *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *C. elegans* und *D. melanogaster*. Identische Aminosäuren sind in **grau**, konservierte in **pink** dargestellt. Die charakteristischen Domänen sind entsprechend der Legende gekennzeichnet.

7.5 Sequenzvergleich der *Drosophila* NHL-Proteine

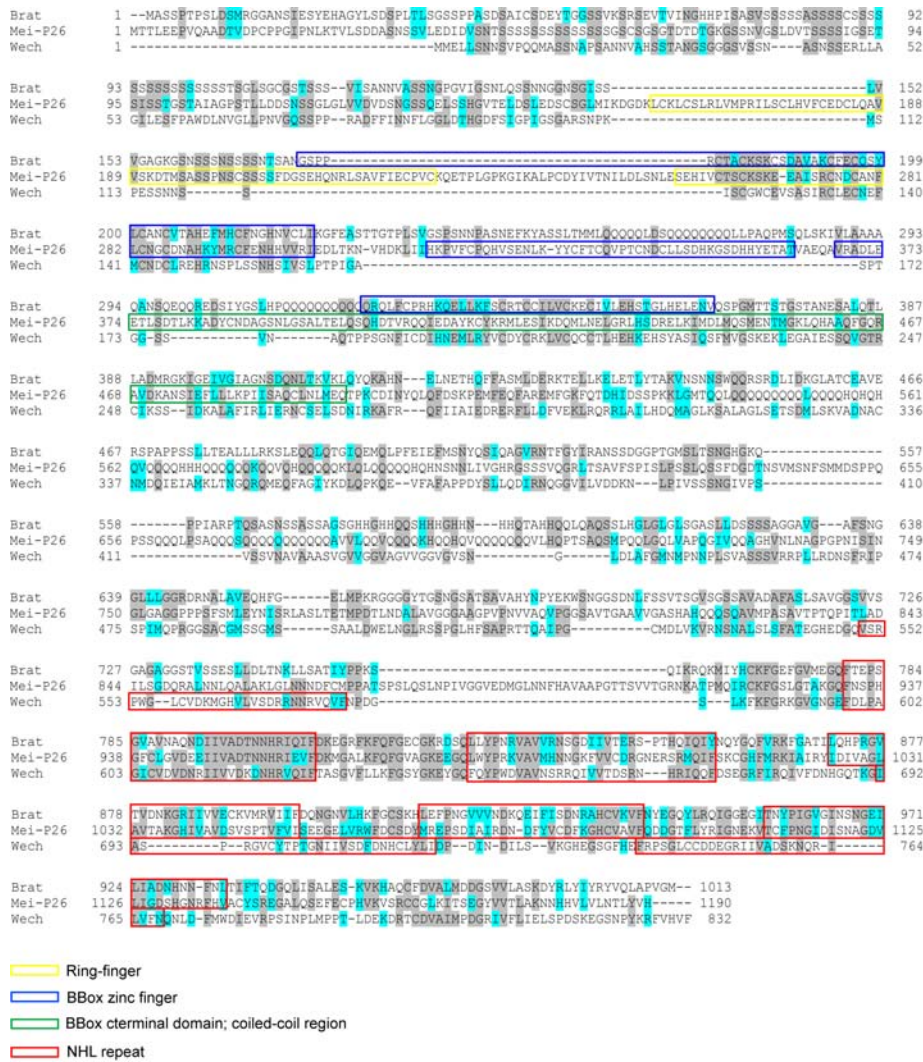


Abb. 7.5: Vergleich der Aminosäuresequenzen der *Drosophila* NHL-Domänen Proteine. Dargestellt sind die Sequenzen der NHL-Domänen Proteine Wech, Brat und Mei-P26 von *Drosophila melanogaster*. Identische Aminosäuren sind in **grau**, konservierte in **türkis** dargestellt. Die charakteristischen Domänen sind entsprechend der Legende gekennzeichnet.

7.6 Kreuzungsschema zur Generierung von *wech*-Mutanten

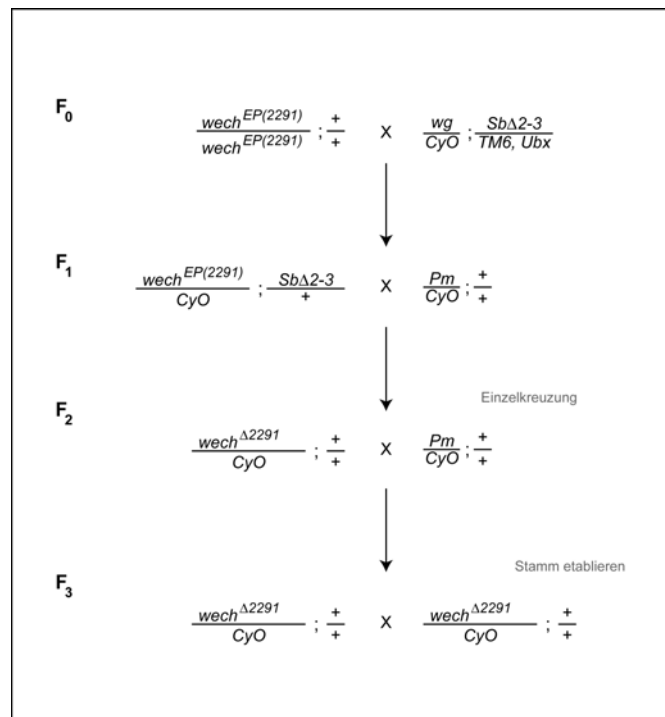


Abb. 7.6: Kreuzungsschema zur Generierung von *wech* Mutanten durch P-Element Mobilisierung. Dargestellt sind jeweils die in jeder Generation zu kreuzenden Genotypen. Links sind die Weibchen, rechts die Männchen abgebildet.

7.7 Spezifitätstest Inx3-CT Antikörper

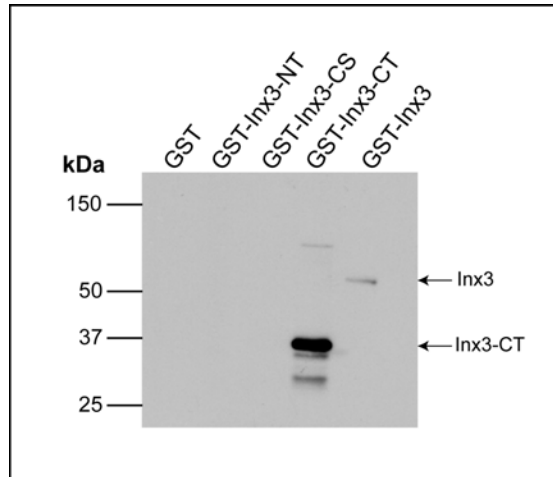


Abb. 7.7: Spezifitätstest des anti-Inx3 C-terminalen-Antikörpers. Der Immunoblot aus Proteinextrakten von Bakterien, in denen unterschiedliche Innexin3-Domänen zur Expression induziert worden waren, wurde mit dem anti-Inx3 Antikörper, der gegen den C-Terminus gerichtet ist, inkubiert. Das Resultat zeigt, dass nur im Fall des kompletten Inx3-Proteins, sowie der C-terminalen Domäne ein Signal nachgewiesen werden kann (durch Pfeile gekennzeichnet). **GST** = GST-Protein; **GST-Inx3-NT** = Expression des N-Terminus des Innexin3 Proteins fusioniert an das GST Protein; **GST-Inx3-CS** = Expression der zytoplasmatischen Schleife des Innexin3 Proteins fusioniert an das GST Protein; **GST-Inx3-CT** = Expression des C-Terminus des Innexin3 Proteins fusioniert an das GST Protein; **GST-Inx3** = Expression des Innexin3 Proteins fusioniert an das GST Protein.

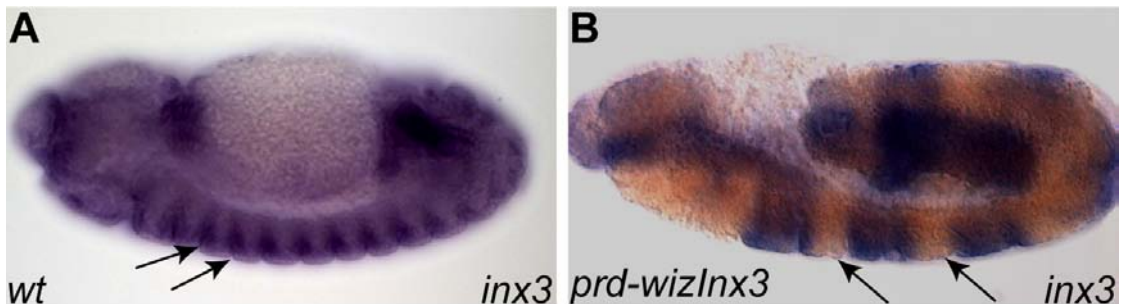
7.8 Funktionalität der RNAi-*inx3*-Konstrukte

Abb. 7.8: Funktionsanalyse der RNAi-*inx3*-Konstrukte. Die induzierbaren RNAi-*inx3* Konstrukte wurden mit dem *paired*-Gal4 Treiber gekreuzt und der Effekt der Herunterregulierung in diesen Funktionsverlustmutanten auf mRNA-Ebene analysiert. Im Vergleich zum Wildtyp (**A**), bei dem jedes Segment *inx3* Expression aufweist (Pfeile), zeigen die Funktionsverlustmutanten (**B**), dass die *inx3* Expression in jedem zweiten Segment herunter reguliert ist (Pfeile).

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung der verschiedenen mesodermalen Anlagen . . .	3
1.2	Schematische Darstellung zur Bildung der somatischen Muskulatur von <i>Drosophila melanogaster</i>	5
1.3	Modell der Myoblastenfusion in <i>Drosophila melanogaster</i>	8
1.4	Struktur der epidermalen Muskelanhaftungsstelle in <i>Drosophila melanogaster</i>	11
1.5	Die Rolle der Zelladhäsion bei multizellulären Prozessen	12
1.6	Schematische Darstellung des Cadherin-Catenin-Komplexes	14
1.7	Der Selektin-Adhäsionskomplex	15
1.8	Die Molekülstruktur der Immunglobulin-Superfamilie	16
1.9	Schematische Darstellung der Integrin-Heterodimere	17
1.10	Schematische Darstellung des integrin-assoziierten Proteinkomplexes . . .	19
1.11	Domänenstruktur von Talin	20
1.12	Domänenstruktur von ILK	21
1.13	Domänenstruktur von Tensin	22
4.1	Genomische Organisation des <i>wech</i> -Lokus	78
4.2	Sequenzidentität des <i>Drosophila</i> Wech-Proteins	79
4.3	mRNA Expression von <i>wech</i> an wildtypischen Embryonen von <i>Drosophila</i>	81
4.4	Spezifitätstest des anti-Wech Antikörpers im Western Blot	82
4.5	Spezifitätstest des anti-Wech Antikörpers in der Immunfluoreszenz	83
4.6	Wech-Proteinexpression in wildtypischen Embryonen von <i>Drosophila</i> . . .	85
4.7	Wech-Expression in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle	86
4.8	Lokalisation von Wech in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle	87
4.9	Schematische Darstellung des für die Mobilisierung verwendeten EP-Elements	88
4.10	PCR zur Bestimmung der genomischen Region nach P-Element Mobilisierung	88
4.11	<i>wech</i> mRNA-Expression in den <i>wech</i> -Mutanten	90

4.12	Real-time PCR Analyse der <i>wech</i> ⁶⁶ -Mutante und <i>wech</i> -RNAi-Linie	91
4.13	Graphische Darstellung der Letalität der für <i>wech</i> mutanten Fliegenlinien	92
4.14	Muskelphänotypen der <i>mysospheroid</i> (β PS-Integrin)- und <i>wech</i> -Mutanten .	93
4.15	Muskelphänotyp der maternalen und zygotischen <i>wech</i> -Mutante	94
4.16	Analyse des Muskelphänotyps der zygotischen <i>wech</i> ⁶⁶ Mutante	95
4.17	Rettung des <i>wech</i> mutanten Phänotyps	96
4.18	Expression von Wech in <i>mysospheroid</i> -Mutanten	97
4.19	Expression der Integrine α PS2- und β PS in <i>wech</i> -Mutanten	98
4.20	Expression des muskel- und tendonzellspezifischen β PS-Integrins in maternalen und zygotischen <i>wech</i> -Nullmutanten	99
4.21	Modell der Interaktionen zwischen dem integrin-assoziierten Proteinkomplex und den Integrinrezeptoren	100
4.22	Koexpression von Wech mit Komponenten des integrin-assoziierten Proteinkomplexes	102
4.23	Expression von Talin in <i>wech</i> -Mutanten	102
4.24	Fehllokalisierung von ILK und Tensin in <i>wech</i> -Mutanten	103
4.25	Expression von Wech in <i>ilk</i> -Mutanten	104
4.26	Interaktion zwischen Wech und der Proteinkinase-Domäne von ILK	105
4.27	Die BCC-Domäne von Wech ist für die Interaktion mit ILK verantwortlich	106
4.28	Interaktion des GST-Wech Fusionsproteins mit Talin	107
4.29	Die Interaktion Wech erfolgt über die Kopf-Domäne von Talin	108
4.30	Schematische Darstellung der Wech-Interaktionen in der integrin-vermittelten Zelladhäsion	109
4.31	Überexpression der Deletionskonstrukte der BCC- und NHL-Domäne führen zu einem dominant-negativen Effekt	110
4.32	Fehllokalisierung der Wech-Deletionsproteine in der Tendonzelle	111
4.33	Schematische Darstellung des „Ras-Recruitment“-Systems	112
4.34	Autoaktivierungstest der Wech-NHL-Domäne	114
4.35	Restriktionsverdau der potentiell positiven Interaktionspartner	115
4.36	Bestätigung der Interaktion zwischen Köder- und Zielplasmiden sowie Autoaktivierungstest der Zielplasmide	116
4.37	Schematische Darstellung eines Innexin Proteins	119
4.38	Innexin3-Proteinexpression in wildtypischen <i>Drosophila</i> Embryonen	120
4.39	Innexin3-Expression in der epidermalen Muskelanhaftungsstelle	121
4.40	Koexpression von Innexin3 mit dem integrin-assoziierten Proteinkomplex	122
4.41	Proteinexpression von Innexin3 in <i>talin</i> und <i>wech</i> Mutanten	123
4.42	Herunterregulierung von Innexin3 in der Tendonzelle	124
4.43	Schematische Darstellung der Segmentgrenzenbildung in <i>Drosophila</i>	125

4.44	Schematische Darstellung der bei der Ausbildung der Segmentgrenze beteiligten Gene	126
4.45	Innexin3-Proteinexpression an der Segmentgrenze in <i>Drosophila</i> Embryonen	128
4.46	Innexin2 und 3 Proteinexpression in <i>hedgehog</i> und <i>wingless</i> Mutanten . .	129
4.47	In <i>wingless</i> Mutanten entstehen zusätzliche Einbuchtungen im Segment .	130
4.48	Innexin3-Lokalisation in <i>engrailed</i> Mutanten	130
4.49	Veränderung in der <i>innexin</i> -Expression durch Überexpression von <i>engrailed</i>	131
4.50	Segmentale Überexpression von Innexin3	132
4.51	Herunterregulierung der Innexin3-Expression in der Epidermis	133
5.1	Schematische Darstellung der Domänenstruktur von den Wech-RBCC-Proteinen	136
5.2	Schematische Darstellung der variablen C-terminalen Domänen der RBCC-Proteine	138
5.3	Interaktion zwischen Wech und Brat aus <i>Drosophila</i>	140
5.4	Variabilität des <i>wech</i> ⁶⁶ mutanten Phänotyps	142
5.5	Modell der Adapterfunktion von Wech in der integrin-vermittelten Zelladhäsion	149
7.1	Schematische Darstellung der somatischen Muskulatur von <i>Drosophila melanogaster</i>	157
7.2	Schematische Darstellung der Embryonalentwicklung von <i>Drosophila melanogaster</i>	158
7.3	Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz von <i>wech</i>	159
7.4	Sequenzvergleich der <i>Drosophila</i> Wech Ortholgen	160
7.5	Sequenzvergleich der <i>Drosophila</i> NHL-Proteine	161
7.6	Kreuzungsschema zur Generierung von <i>wech</i> Mutanten durch P-Element Mobilisierung	162
7.7	Spezifitätstest des anti-Inx3 C-terminalen-Antikörpers	163
7.8	Funktionsanalyse der RNAi- <i>inx3</i> -Konstrukte	163

Literaturverzeichnis

Abmayr, S.M., Balagopalan, L., Galletta, B.J. and Hong, S. (2003) **Cell and molecular biology of myoblast fusion.** *Int Rev Cytol*, 225, 33-89.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J. and Jaenicke, L. (2001) **Molekularbiologie der Zelle.** *VCH Verlagsgesellschaft mBH.*

Alexandre, E., Graba, Y., Fasano, L., Gallet, A., Perrin, L., De Zulueta, P., Pradel, J., Kerridge, S. and Jacq, B. (1996) **The Drosophila teashirt homeotic protein is a DNA-binding protein and modulo, a HOM-C regulated modifier of variegation, is a likely candidate for being a direct target gene.** *Mech Dev*, 59, 191-204.

Aplin, A.E., Howe, A., Alahari, S.K. and Juliano, R.L. (1998) **Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins.** *Pharmacol Rev*, 50, 197-263.

Arama, E., Dickman, D., Kimchie, Z., Shearn, A. and Lev, Z. (2000) **Mutations in the beta-propeller domain of the Drosophila brain tumor (brat) protein induce neoplasm in the larval brain.** *Oncogene*, 19, 3706-16.

Artero, R.D., Castanon, I. and Baylies, M.K. (2001) **The immunoglobulin-like protein Hibris functions as a dose-dependent regulator of myoblast fusion and is differentially controlled by Ras and Notch signaling.** *Development*, 128, 4251-64.

Auger, K.R., Songyang, Z., Lo, S.H., Roberts, T.M. and Chen, L.B. (1996) **Platelet-derived growth factor-induced formation of tensin and phosphoinositide 3-kinase complexes.** *J Biol Chem*, 271, 23452-7.

- Ayme-Southgate, A., Lasko, P., French, C. and Pardue, M.L. (1989) **Characterization of the gene for mp20: a Drosophila muscle protein that is not found in asynchronous oscillatory flight muscle.** *J Cell Biol*, 108, 521-31.
- Azpiazu, N. and Frasch, M. (1993) **tinman and bagpipe: two homeo box genes that determine cell fates in the dorsal mesoderm of Drosophila.** *Genes Dev*, 7, 1325-40.
- Azpiazu, N., Lawrence, P.A., Vincent, J.P. and Frasch, M. (1996) **Segmentation and specification of the Drosophila mesoderm.** *Genes Dev*, 10, 3183-94.
- Bate, M. (1990) **The embryonic development of larval muscles in Drosophila.** *Development*, 110, 791-804.
- Bate, M. and Rushton, E. (1993) **Myogenesis and muscle patterning in Drosophila.** *C R Acad Sci III*, 316, 1047-61.
- Bauer, R., Lehmann, C., Fuss, B., Eckardt, F. and Hoch, M. (2002) **The Drosophila gap junction channel gene innexin 2 controls foregut development in response to Wingless signalling.** *J Cell Sci*, 115, 1859-67.
- Bauer, R., Lehmann, C., Martini, J., Eckardt, F. and Hoch, M. (2004) **Gap junction channel protein innexin 2 is essential for epithelial morphogenesis in the Drosophila embryo.** *Mol Biol Cell*, 15, 2992-3004.
- Bauer, R., Löer, B., Ostrowski, K., Martini, J., Weimbs, A., Lechner, H. and Hoch, M. (2005) **Intercellular communication: the Drosophila innexin multiprotein family of gap junction proteins.** *Chem Biol*, 12, 515-26.
- Baylies, M.K. and Bate, M. (1996) **twist: a myogenic switch in Drosophila.** *Science*, 272, 1481-4.
- Baylies, M.K., Bate, M. and Ruiz Gomez, M. (1998) **Myogenesis: a view from Drosophila.** *Cell*, 93, 921-7.
- Beaucher, M., Goodliffe, J., Hersperger, E., Trunova, S., Frydman, H. and Shearn, A. (2007) **Drosophila brain tumor metastases express both neuronal and glial cell type markers.** *Dev Biol*, 301, 287-97.
- Becam, I.E., Tanentzapf, G., Lepesant, J., Brown, N.H. and Huynh, J. (2005) **Integrin-independent repression of cadherin transcription by talin during axis formation in Drosophila.** *Nat Cell Biol*, 7, 510-6.

-
- Becker, S., Pasca, G., Strumpf, D., Min, L. and Volk, T. (1997) **Reciprocal signaling between *Drosophila* epidermal muscle attachment cells and their corresponding muscles.** *Development*, 124, 2615-22.
- Beckett, K. and Baylies, M.K. (2006) **The development of the *Drosophila* larval body wall muscles.** *Int Rev Neurobiol*, 75, 55-70.
- Bello, B., Reichert, H. and Hirth, F. (2006) **The brain tumor gene negatively regulates neural progenitor cell proliferation in the larval central brain of *Drosophila*.** *Development*, 133, 2639-48.
- Bendig, G., Grimmler, M., Huttner, I.G., Wessels, G., Dahme, T., Just, S., Trano, N., Katus, H.A., Fishman, M.C. and Rottbauer, W. (2006) **Integrin-linked kinase, a novel component of the cardiac mechanical stretch sensor, controls contractility in the zebrafish heart.** *Genes Dev*, 20, 2361-72.
- Bennett, V. and Gilligan, D.M. (1993) **The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organization of the plasma membrane.** *Annu Rev Cell Biol*, 9, 27-66.
- Blair, S.S. and Ralston, A. (1997) **Smoothed-mediated Hedgehog signalling is required for the maintenance of the anterior-posterior lineage restriction in the developing wing of *Drosophila*.** *Development*, 124, 4053-63.
- Bodmer, R. (1993) **The gene tinman is required for specification of the heart and visceral muscles in *Drosophila*.** *Development*, 118, 719-29.
- Bökel, C. and Brown, N.H. (2002) **Integrins in development: moving on, responding to, and sticking to the extracellular matrix.** *Dev Cell*, 3, 311-21.
- Bökel, C., Prokop, A. and Brown, N.H. (2005) **Papillote and Piopio: *Drosophila* ZP-domain proteins required for cell adhesion to the apical extracellular matrix and microtubule organization.** *J Cell Sci*, 118, 633-42.
- 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, 1498-511.
- Brakebusch, C. and Fässler, R. (2003) **The integrin-actin connection, an eternal love affair.** *EMBO J*, 22, 2324-33.

- Brennan, K., Baylies, M. and Arias, A.M. (1999) **Repression by Notch is required before Wingless signalling during muscle progenitor cell development in *Drosophila*.** *Curr Biol*, 9, 707-10.
- Broder, Y.C., Katz, S. and Aronheim, A. (1998) **The ras recruitment system, a novel approach to the study of protein-protein interactions.** *Curr Biol*, 8, 1121-4.
- Brower, D.L., Bunch, T.A., Mukai, L., Adamson, T.E., Wehrli, M., Lam, S., Friedlander, E., Roote, C.E. and Zusman, S. (1995) **Nonequivalent requirements for PS1 and PS2 integrin at cell attachments in *Drosophila*: genetic analysis of the alpha PS1 integrin subunit.** *Development*, 121, 1311-20.
- Brown, N.H. (1993) **Integrins hold *Drosophila* together.** *Bioessays*, 15, 383-90.
- Brown, N.H. (1994) **Null mutations in the alpha PS2 and beta PS integrin subunit genes have distinct phenotypes.** *Development*, 120, 1221-31.
- Brown, N.H. (2000) **Cell-cell adhesion via the ECM: integrin genetics in fly and worm.** *Matrix Biol*, 19, 191-201.
- Brown, N.H., Gregory, S.L. and Martin-Bermudo, M.D. (2000) **Integrins as mediators of morphogenesis in *Drosophila*.** *Dev Biol*, 223, 1-16.
- Brown, N.H., Gregory, S.L., Rickoll, W.L., Fessler, L.I., Prout, M., White, R.A.H. and Fristrom, J.W. (2002) **Talin is essential for integrin function in *Drosophila*.** *Dev Cell*, 3, 569-79.
- Brugnera, E., Haney, L., Grimsley, C., Lu, M., Walk, S.F., Tosello-Tramont, A., Macara, I.G., Madhani, H., Fink, G.R. and Ravichandran, K.S. (2002) **Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex.** *Nat Cell Biol*, 4, 574-82.
- Buff, E., Carmena, A., Gisselbrecht, S., Jimenez, F. and Michelson, A.M. (1998) **Signalling by the *Drosophila* epidermal growth factor receptor is required for the specification and diversification of embryonic muscle progenitors.** *Development*, 125, 2075-86.
- Callahan, C.A., Bonkovsky, J.L., Scully, A.L. and Thomas, J.B. (1996) **derailed is required for muscle attachment site selection in *Drosophila*.** *Development*, 122, 2761-7.
- Campos-Ortega, J. and Hartenstein, V. (1997) **The embryonic development of *Drosophila melanogaster*.** *Springer Verlag*.

-
- Cao, T., Borden, K.L., Freemont, P.S. and Etkin, L.D. (1997) **Involvement of the rfp tripartite motif in protein-protein interactions and subcellular distribution.** *J Cell Sci*, 110 (Pt 14), 1563-71.
- Carmena, A., Bate, M. and Jimenez, F. (1995) **Lethal of scute, a proneural gene, participates in the specification of muscle progenitors during Drosophila embryogenesis.** *Genes Dev*, 9, 2373-83.
- Carmena, A., Murugasu-Oei, B., Menon, D., Jimenez, F. and Chia, W. (1998) **Inscuteable and numb mediate asymmetric muscle progenitor cell divisions during Drosophila myogenesis.** *Genes Dev*, 12, 304-15.
- Cavener, D.R. (1987) **Comparison of the consensus sequence flanking translational start sites in Drosophila and vertebrates.** *Nucleic Acids Res*, 15, 1353-61.
- Chanana, B., Graf, R., Koledachkina, T., Pflanz, R. and Vorbruggen, G. (2007) **alpha(PS2) integrin-mediated muscle attachment in Drosophila requires the ECM protein Thrombospondin.** *Mech Dev*, 124, 463-75.
- Chen, H., Duncan, I.C., Bozorgchami, H. and Lo, S.H. (2002) **Tensin1 and a previously undocumented family member, tensin2, positively regulate cell migration.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 733-8.
- 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, 751-62.
- Chen, E.H. and Olson, E.N. (2004) **Towards a molecular pathway for myoblast fusion in Drosophila.** *Trends Cell Biol*, 14, 452-60.
- Chou, T.B. and Perrimon, N. (1992) **Use of a yeast site-specific recombinase to produce female germline chimeras in Drosophila.** *Genetics*, 131, 643-53.
- Clark, K.A., McGrail, M. and Beckerle, M.C. (2003) **Analysis of PINCH function in Drosophila demonstrates its requirement in integrin-dependent cellular processes.** *Development*, 130, 2611-21.
- Crossin, K.L. and Krushel, L.A. (2000) **Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily.** *Dev Dyn*, 218, 260-79.
- De Arcangelis, A. and Georges-Labouesse, E. (2000) **Integrin and ECM functions: roles in vertebrate development.** *Trends Genet*, 16, 389-95.

- Del Rio-Albrechtsen, T., Kiontke, K., Chiou, S. and Fitch, D.H.A. (2006) **Novel gain-of-function alleles demonstrate a role for the heterochronic gene lin-41 in *C. elegans* male tail tip morphogenesis.** *Dev Biol*, 297, 74-86.
- Delon, I. and Brown, N.H. (2007) **Integrins and the actin cytoskeleton.** *Curr Opin Cell Biol*, 19, 43-50.
- Devenport, D., Bunch, T.A., Bloor, J.W., Brower, D.L. and Brown, N.H. (2007) **Mutations in the *Drosophila* alphaPS2 integrin subunit uncover new features of adhesion site assembly.** *Dev Biol*, 308, 294-308.
- DiNardo, S., Sher, E., Heemskerk-Jongens, J., Kassis, J.A. and O'Farrell, P.H. (1988) **Two-tiered regulation of spatially patterned engrailed gene expression during *Drosophila* embryogenesis.** *Nature*, 332, 604-9.
- 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, 1249-61.
- Dworak, H.A. and Sink, H. (2002) **Myoblast fusion in *Drosophila*.** *Bioessays*, 24, 591-601.
- Eaton, S. and Kornberg, T.B. (1990) **Repression of ci-D in posterior compartments of *Drosophila* by engrailed.** *Genes Dev*, 4, 1068-77.
- Edelman, G.M. (1987) **CAMs and Igs: cell adhesion and the evolutionary origins of immunity.** *Immunol Rev*, 100, 11-45.
- Engqvist-Goldstein, A.E., Kessels, M.M., Chopra, V.S., Hayden, M.R. and Drubin, D.G. (1999) **An actin-binding protein of the Sla2/Huntingtin interacting protein 1 family is a novel component of clathrin-coated pits and vesicles.** *J Cell Biol*, 147, 1503-18.
- 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.
- Evans, E.A. and Calderwood, D.A. (2007) **Forces and bond dynamics in cell adhesion.** *Science*, 316, 1148-53.

-
- Franco, S.J., Rodgers, M.A., Perrin, B.J., Han, J., Bennin, D.A., Critchley, D.R. and Huttenlocher, A. (2004) **Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics.** *Nat Cell Biol*, 6, 977-83.
- Frank, D.J. and Roth, M.B. (1998) **ncl-1 is required for the regulation of cell size and ribosomal RNA synthesis in *Caenorhabditis elegans*.** *J Cell Biol*, 140, 1321-9.
- Frasch, M. (1999) **Controls in patterning and diversification of somatic muscles during *Drosophila* embryogenesis.** *Curr Opin Genet Dev*, 9, 522-9.
- Fridell, R.A., Harding, L.S., Bogerd, H.P. and Cullen, B.R. (1995) **Identification of a novel human zinc finger protein that specifically interacts with the activation domain of lentiviral Tat proteins.** *Virology*, 209, 347-57.
- Frommer, G., Vorbrüggen, G., Pasca, G., Jäckle, H. and Volk, T. (1996) **Epidermal egr-like zinc finger protein of *Drosophila* participates in myotube guidance.** *EMBO J*, 15, 1642-9.
- Furlong, E.E. (2004) **Integrating transcriptional and signalling networks during muscle development.** *Curr Opin Genet Dev*, 14, 343-50.
- 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, 1455-68.
- Garcia-Alvarez, B., de Pereda, J.M., Calderwood, D.A., Ulmer, T.S., Critchley, D., Campbell, I.D., Ginsberg, M.H. and Liddington, R.C. (2003) **Structural determinants of integrin recognition by talin.** *Mol Cell*, 11, 49-58.
- Georges-Labouesse, E., Messaddeq, N., Yehia, G., Cadalbert, L., Dierich, A. and Le Meur, M. (1996) **Absence of integrin alpha 6 leads to epidermolysis bullosa and neonatal death in mice.** *Nat Genet*, 13, 370-3.
- Giancotti, F.G. and Ruoslahti, E. (1999) **Integrin signaling.** *Science*, 285, 1028-32.

Glasscock, E., Singhania, A. and Tanouye, M.A. (2005) **The mei-P26 gene encodes a RING finger B-box coiled-coil-NHL protein that regulates seizure susceptibility in *Drosophila*.** *Genetics*, 170, 1677-89.

Gregory, S.L. and Brown, N.H. (1998) **kakapo, a gene required for adhesion between and within cell layers in *Drosophila*, encodes a large cytoskeletal linker protein related to plectin and dystrophin.** *J Cell Biol*, 143, 1271-82.

Gumbiner, B.M. (1996) **Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis.** *Cell*, 84, 345-57.

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, 438-42.

Hehlhans, S., Haase, M. and Cordes, N. (2007) **Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies.** *Biochim Biophys Acta*, 1775, 163-80.

Horn, E.J., Albor, A., Liu, Y., El-Hizawi, S., Vanderbeek, G.E., Babcock, M., Bowden, G.T., Hennings, H., Lozano, G., Weinberg, W.C. and Kulesz-Martin, M. (2004) **RING protein Trim32 associated with skin carcinogenesis has anti-apoptotic and E3-ubiquitin ligase properties.** *Carcinogenesis*, 25, 157-67.

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

Horwitz, A., Duggan, K., Buck, C., Beckerle, M.C. and Burridge, K. (1986) **Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin—a transmembrane linkage.** *Nature*, 320, 531-3.

Hynes, R.O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110, 673-87. Ingham, P.W., Baker, N.E. and Martinez-Arias, A. (1988) **Regulation of segment polarity genes in the *Drosophila* blastoderm by fushi tarazu and even skipped.** *Nature*, 331, 73-5.

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

Kidd, T., Bland, K.S. and Goodman, C.S. (1999) **Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*.** *Cell*, 96, 785-94.

-
- Kiger, A.A., Baum, B., Jones, S., Jones, M.R., Coulson, A., Echeverri, C. and Perrimon, N. (2003) **A functional genomic analysis of cell morphology using RNA interference.** *J Biol*, 2, 27.
- Koch, P.J. and Franke, W.W. (1994) **Desmosomal cadherins: another growing multigene family of adhesion molecules.** *Curr Opin Cell Biol*, 6, 682-7.
- Labouesse, M. and Georges-Labouesse, E. (2003) **Cell adhesion: parallels between vertebrate and invertebrate focal adhesions.** *Curr Biol*, 13, R528-30.
- Lad, Y., Harburger, D.S. and Calderwood, D.A. (2007) **Integrin cytoskeletal interactions.** *Methods Enzymol*, 426, 69-84.
- Lancman, J.J., Caruccio, N.C., Harfe, B.D., Pasquinelli, A.E., Schageman, J.J., Pertsemliadis, A. and Fallon, J.F. (2005) **Analysis of the regulation of lin-41 during chick and mouse limb development.** *Dev Dyn*, 234, 948-60.
- Larsen, C.W., Hirst, E., Alexandre, C. and Vincent, J. (2003) **Segment boundary formation in Drosophila embryos.** *Development*, 130, 5625-35.
- Lasky, L.A. (1995) **Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response.** *Annu Rev Biochem*, 64, 113-39.
- Lawrence, P.A., Johnston, P. and Vincent, J.P. (1994) **Wingless can bring about a mesoderm-to-ectoderm induction in Drosophila embryos.** *Development*, 120, 3355-9.
- Lechner, H., Josten, F., Fuss, B., Bauer, R. and Hoch, M. (2007) **Cross regulation of intercellular gap junction communication and paracrine signaling pathways during organogenesis in Drosophila.** *Dev Biol*, 310, 23-34.
- Lee, S., Harris, K.L., Whittington, P.M. and Kolodziej, P.A. (2000) **short stop is allelic to kakapo, and encodes rod-like cytoskeletal-associated proteins required for axon extension.** *J Neurosci*, 20, 1096-108.
- Lee, S.B., Cho, K.S., Kim, E. and Chung, J. (2003) **blisery encodes Drosophila tensin protein and interacts with integrin and the JNK signaling pathway during wing development.** *Development*, 130, 4001-10.
- Lee, Y.S. and Carthew, R.W. (2003) **Making a better RNAi vector for Drosophila: use of intron spacers.** *Methods*, 30, 322-9.

- Lee, K.W., Jung, J.W., Kang, K. and Lee, H.J. (2004) **p38 is a key signaling molecule for H-ras-induced inhibition of gap junction intercellular communication in rat liver epithelial cells.** *Ann N Y Acad Sci*, 1030, 258-63.
- Legate, K.R., Montanez, E., Kudlacek, O. and Fassler, R. (2006) **ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling.** *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 20-31.
- Lehmann, C., Lechner, H., Löer, B., Knieps, M., Herrmann, S., Famulok, M., Bauer, R. and Hoch, M. (2006) **Heteromerization of innexin gap junction proteins regulates epithelial tissue organization in Drosophila.** *Mol Biol Cell*, 17, 1676-85.
- Liddington, R.C. and Ginsberg, M.H. (2002) **Integrin activation takes shape.** *J Cell Biol*, 158, 833-9.
- Litjens, S.H.M., de Pereda, J.M. and Sonnenberg, A. (2006) **Current insights into the formation and breakdown of hemidesmosomes.** *Trends Cell Biol*, 16, 376-83.
- Lo, S.H. (2004) **Tensin.** *Int J Biochem Cell Biol*, 36, 31-4.
- Lo, S.H. (2006) **Focal adhesions: what's new inside.** *Dev Biol*, 294, 280-91.
- Löer, B. (2003) **Molekulare und biochemische Untersuchungen zur Funktion des Drosophila Gap Junction Proteins Innexin3.** *Diplomarbeit.*
- Löer, B., Bauer, R., Bornheim, R., Grell, J., Kremmer, E., Kolanus, W. and Hoch, M. (2008) **The NHL-domain protein Wech is crucial for the integrin-cytoskeleton link.** *Nat Cell Biol*, 10, 422-428.
- 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, 1787-802.
- Mackinnon, A.C., Qadota, H., Norman, K.R., Moerman, D.G. and Williams, B.D. (2002) **C. elegans PAT-4/ILK functions as an adaptor protein within integrin adhesion complexes.** *Curr Biol*, 12, 787-97.
- Martin-Bermudo, M.D. and Brown, N.H. (2000) **The localized assembly of extracellular matrix integrin ligands requires cell-cell contact.** *J Cell Sci*, 113 Pt 21, 3715-23.
- Martini, J. (2007) **Die Funktion des Gap Junction Proteins Innexin2 im larvalen Proventrikulus von Drosophila melanogaster.** *Dissertation.*

-
- 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, 557-69.
- Mayer, U., Saher, G., Fässler, R., Bornemann, A., Echtermeyer, F., von der Mark, H., Miosge, N., Poschl, E. and von der Mark, K. (1997) **Absence of integrin alpha 7 causes a novel form of muscular dystrophy.** *Nat Genet*, 17, 318-23.
- Melendez, A., Li, W. and Kalderon, D. (1995) **Activity, expression and function of a second Drosophila protein kinase A catalytic subunit gene.** *Genetics*, 141, 1507-20.
- 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.
- Michelson, A.M. (1996) **A new turn (or two) for twist.** *Science*, 272, 1449-50.
- Nabel-Rosen, H., Dorevitch, N., Reuveny, A. and Volk, T. (1999) **The balance between two isoforms of the Drosophila RNA-binding protein how controls tendon cell differentiation.** *Mol Cell*, 4, 573-84.
- Nayal, A., Webb, D.J. and Horwitz, A.F. (2004) **Talin: an emerging focal point of adhesion dynamics.** *Curr Opin Cell Biol*, 16, 94-8.
- O'Farrell, F., Esfahani, S.S., Engstrom, Y. and Kylsten, P. (2008) **Regulation of the Drosophila lin-41 homologue dappled by let-7 reveals conservation of a regulatory mechanism within the LIN-41 subclade.** *Dev Dyn*, 237, 196-208.
- Page, S.L., McKim, K.S., Deneen, B., Van Hook, T.L. and Hawley, R.S. (2000) **Genetic studies of mei-P26 reveal a link between the processes that control germ cell proliferation in both sexes and those that control meiotic exchange in Drosophila.** *Genetics*, 155, 1757-72.
- Paululat, A., Breuer, S. and Renkawitz-Pohl, R. (1999) **Determination and development of the larval muscle pattern in Drosophila melanogaster.** *Cell Tissue Res*, 296, 151-60.
- Paululat, A., Holz, A. and Renkawitz-Pohl, R. (1999) **Essential genes for myoblast fusion in Drosophila embryogenesis.** *Mech Dev*, 83, 17-26.

- Pavalko, F.M., Walker, D.M., Graham, L., Goheen, M., Doerschuk, C.M. and Kansas, G.S. (1995) **The cytoplasmic domain of L-selectin interacts with cytoskeletal proteins via alpha-actinin: receptor positioning in microvilli does not require interaction with alpha-actinin.** *J Cell Biol*, 129, 1155-64.
- Phelan, P. (2005) **Innexins: members of an evolutionarily conserved family of gap-junction proteins.** *Biochim Biophys Acta*, 1711, 225-45.
- Prokop, A., Uhler, J., Roote, J. and Bate, M. (1998) **The kakapo mutation affects terminal arborization and central dendritic sprouting of Drosophila motor-neurons.** *J Cell Biol*, 143, 1283-94.
- 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, 5061-73.
- Reymond, A., Meroni, G., Fantozzi, A., Merla, G., Cairo, S., Luzi, L., Riganelli, D., Zanaria, E., Messali, S., Cainarca, S., Guffanti, A., Minucci, S., Pelicci, P.G. and Ballabio, A. (2001) **The tripartite motif family identifies cell compartments.** *EMBO J*, 20, 2140-51.
- Riechmann, V., Irion, U., Wilson, R., Grosskortenhaus, R. and Leptin, M. (1997) **Control of cell fates and segmentation in the Drosophila mesoderm.** *Development*, 124, 2915-22.
- Robertson, M. (1988) **The post-RNA world.** *Nature*, 335, 16-8.
- Rodriguez, A., Zhou, Z., Tang, M.L., Meller, S., Chen, J., Bellen, H. and Kimbrell, D.A. (1996) **Identification of immune system and response genes, and novel mutations causing melanotic tumor formation in Drosophila melanogaster.** *Genetics*, 143, 929-40.
- Rodriguez, I. and Basler, K. (1997) **Control of compartmental affinity boundaries by hedgehog.** *Nature*, 389, 614-8.
- Roote, C.E. and Zusman, S. (1995) **Functions for PS integrins in tissue adhesion, migration, and shape changes during early embryonic development in Drosophila.** *Dev Biol*, 169, 322-36.
- Rosen, S.D. and Bertozzi, C.R. (1994) **The selectins and their ligands.** *Curr Opin Cell Biol*, 6, 663-73.

Rubin, G.M. and Spradling, A.C. (1982) **Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors.** *Science*, 218, 348-53.

Ruiz Gomez, M. and Bate, M. (1997) **Segregation of myogenic lineages in *Drosophila* requires numb.** *Development*, 124, 4857-66.

Ruiz-Gomez, M., Coutts, N., Price, A., Taylor, M.V. and Bate, M. (2000) ***Drosophila* dumbfounded: a myoblast attractant essential for fusion.** *Cell*, 102, 189-98.

Ruiz-Gomez, M., Coutts, N., Suster, M.L., Landgraf, M. and Bate, M. (2002) **myoblaster incompetent encodes a zinc finger transcription factor required to specify fusion-competent myoblasts in *Drosophila*.** *Development*, 129, 133-41.

Ruoslahti, E. and Öbrink, B. (1996) **Common principles in cell adhesion.** *Exp Cell Res*, 227, 1-11.

Rusconi, J.C. and Corbin, V. (1998) **Evidence for a novel Notch pathway required for muscle precursor selection in *Drosophila*.** *Mech Dev*, 79, 39-50.

Sakai, T., Li, S., Docheva, D., Grashoff, C., Sakai, K., Kostka, G., Braun, A., Pfeifer, A., Yurchenco, P.D. and Fassler, R. (2003) **Integrin-linked kinase (ILK) is required for polarizing the epiblast, cell adhesion, and controlling actin accumulation.** *Genes Dev*, 17, 926-40.

Sakuma, R., Mael, A.A. and Ikeda, Y. (2007) **Alpha interferon enhances TRIM5alpha-mediated antiviral activities in human and rhesus monkey cells.** *J Virol*, 81, 10201-6.

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, 664-74.

Schnepp, B., Grumblin, G., Donaldson, T. and Simcox, A. (1996) **Vein is a novel component in the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway with similarity to the neuregulins.** *Genes Dev*, 10, 2302-13.

Schnorrer, F. and Dickson, B.J. (2004) **Muscle building; mechanisms of myotube guidance and attachment site selection.** *Dev Cell*, 7, 9-20.

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, 4501-9.

- 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, 608-21.
- Schulman, B.R.M., Esquela-Kerscher, A. and Slack, F.J. (2005) **Reciprocal expression of *lin-41* and the microRNAs *let-7* and *mir-125* during mouse embryogenesis.** *Dev Dyn*, 234, 1046-54.
- Sisson, J.C., Field, C., Ventura, R., Royou, A. and Sullivan, W. (2000) **Lava lamp, a novel peripheral golgi protein, is required for *Drosophila melanogaster* cellularization.** *J Cell Biol*, 151, 905-18.
- Slack, F.J. and Ruvkun, G. (1998) **A novel repeat domain that is often associated with RING finger and B-box motifs.** *Trends Biochem Sci*, 23, 474-5.
- Slack, F.J., Basson, M., Liu, Z., Ambros, V., Horvitz, H.R. and Ruvkun, G. (2000) **The *lin-41* RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the *LIN-29* transcription factor.** *Mol Cell*, 5, 659-69.
- Spradling, A.C. and Rubin, G.M. (1982) **Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes.** *Science*, 218, 341-7.
- Springer, T.A. (1994) **Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm.** *Cell*, 76, 301-14.
- Springer, T.A. (1998) **An extracellular beta-propeller module predicted in lipoprotein and scavenger receptors, tyrosine kinases, epidermal growth factor precursor, and extracellular matrix components.** *J Mol Biol*, 283, 837-62.
- Strumpf, D. and Volk, T. (1998) **Kakapo, a novel cytoskeletal-associated protein is essential for the restricted localization of the neuregulin-like factor, vein, at the muscle-tendon junction site.** *J Cell Biol*, 143, 1259-70.
- Strunkelnberg, 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, 4229-39.
- Takada, Y., Ye, X. and Simon, S. (2007) **The integrins.** *Genome Biol*, 8, 215.
- Takeichi, M. (1995) **Morphogenetic roles of classic cadherins.** *Curr Opin Cell Biol*, 7, 619-27.

Tanentzapf, G. and Brown, N.H. (2006) **An interaction between integrin and the talin FERM domain mediates integrin activation but not linkage to the cytoskeleton.** *Nat Cell Biol.*

Tanentzapf, G., Martin-Bermudo, M.D., Hicks, M.S. and Brown, N.H. (2006) **Multiple factors contribute to integrin-talin interactions in vivo.** *J Cell Sci*, 119, 1632-44.
Taylor, M.V. (1996) **A myogenic switch. Muscle development.** *Curr Biol*, 6, 924-6.

Taylor, M.V. (2002) **Muscle differentiation: how two cells become one.** *Curr Biol*, 12, R224-8.

Tepass, U. and Hartenstein, V. (1994) **The development of cellular junctions in the Drosophila embryo.** *Dev Biol*, 161, 563-96.

Thomas, G.H. and Kiehart, D.P. (1994) **Beta heavy-spectrin has a restricted tissue and subcellular distribution during Drosophila embryogenesis.** *Development*, 120, 2039-50.

Torgler, C.N., Narasimha, M., Knox, A.L., Zervas, C.G., Vernon, M.C. and Brown, N.H. (2004) **Tensin stabilizes integrin adhesive contacts in Drosophila.** *Dev Cell*, 6, 357-69.

Tu, Y., Li, F. and Wu, C. (1998) **Nck-2, a novel Src homology2/3-containing adaptor protein that interacts with the LIM-only protein PINCH and components of growth factor receptor kinase-signaling pathways.** *Mol Biol Cell*, 9, 3367-82.

Tu, Y., Li, F., Goicoechea, S. and Wu, C. (1999) **The LIM-only protein PINCH directly interacts with integrin-linked kinase and is recruited to integrin-rich sites in spreading cells.** *Mol Cell Biol*, 19, 2425-34.

van der Neut, R., Krimpenfort, P., Calafat, J., Niessen, C.M. and Sonnenberg, A. (1996) **Epithelial detachment due to absence of hemidesmosomes in integrin beta 4 null mice.** *Nat Genet*, 13, 366-9.

Vaughn, D.E. and Bjorkman, P.J. (1996) **The (Greek) key to structures of neural adhesion molecules.** *Neuron*, 16, 261-73.

Velyvis, A., Vaynberg, J., Yang, Y., Vinogradova, O., Zhang, Y., Wu, C. and Qin, J. (2003) **Structural and functional insights into PINCH LIM4 domain-mediated integrin signaling.** *Nat Struct Biol*, 10, 558-64.

Volk, T. and VijayRaghavan, K. (1994) **A central role for epidermal segment border cells in the induction of muscle patterning in the *Drosophila* embryo.** *Development*, 120, 59-70.

Volk, T. (1999) **Singling out *Drosophila* tendon cells: a dialogue between two distinct cell types.** *Trends Genet*, 15, 448-53.

Vorbrüggen, G. and Jäckle, H. (1997) **Epidermal muscle attachment site-specific target gene expression and interference with myotube guidance in response to ectopic stripe expression in the developing *Drosophila* epidermis.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 8606-11.

Wiesner, S., Legate, K.R. and Fässler, R. (2005) **Integrin-actin interactions.** *Cell Mol Life Sci*, 62, 1081-99.

bigskip

Wright, T.R. (1960) **The phenogenetics of the embryonic mutant, lethal myospheroid, in *Drosophila melanogaster*.** *J Exp Zool*, 143, 77-99.

Wu, C. (2005) **PINCH, N(i)ck and the ILK: network wiring at cell-matrix adhesions.** *Trends Cell Biol*, 15, 460-6.

Xu, X., Yin, Z., Hudson, J.B., Ferguson, E.L. and Frasch, M. (1998) **Smad proteins act in combination with synergistic and antagonistic regulators to target Dpp responses to the *Drosophila* mesoderm.** *Genes Dev*, 12, 2354-70.

Yang, J.T., Rayburn, H. and Hynes, R.O. (1993) **Embryonic mesodermal defects in alpha 5 integrin-deficient mice.** *Development*, 119, 1093-105.

Yarnitzky, T., Min, L. and Volk, T. (1997) **The *Drosophila* neuregulin homolog Vein mediates inductive interactions between myotubes and their epidermal attachment cells.** *Genes Dev*, 11, 2691-700.

Zamir, E. and Geiger, B. (2001) **Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions.** *J Cell Sci*, 114, 3583-90.

Zervas, C.G., Gregory, S.L. and Brown, N.H. (2001) ***Drosophila* integrin-linked kinase is required at sites of integrin adhesion to link the cytoskeleton to the plasma membrane.** *J Cell Biol*, 152, 1007-18.

Zervas, C.G. and Brown, N.H. (2002) **Integrin adhesion: when is a kinase a kinase?** *Curr Biol*, 12, R350-1.

Zhang, Y., Chen, K., Tu, Y., Velyvis, A., Yang, Y., Qin, J. and Wu, C. (2002) **Assembly of the PINCH-ILK-CH-ILKBP complex precedes and is essential for localization of each component to cell-matrix adhesion sites.** *J Cell Sci*, 115, 4777-86.

Zusman, S., Patel-King, R.S., French-Constant, C. and Hynes, R.O. (1990) **Requirements for integrins during Drosophila development.** *Development*, 108, 391-402.

Zusman, S., Grinblat, Y., Yee, G., Kafatos, F.C. and Hynes, R.O. (1993) **Analyses of PS integrin functions during Drosophila development.** *Development*, 118, 737-50.

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §4 der Promotionsordnung vom 7.1.2004 am LIMES Institut unter Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. M. Hoch angefertigt.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe, die gemäß § 6 der Promotionsordnung vom 7.1.2004 kenntlich gemacht sind. Ferner versichere ich, dass die vorliegende Arbeit bei keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht wurde.

Bonn, im Januar 2008

Birgit Lör