



Analysen zur Kernlokalisierung der *castor* mRNA im sich entwickelnden zentralen Nervensystem von *Drosophila melanogaster*

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität

Antje Jüngling
geboren am 05.11.1985
in Lahnstein

Mainz, Juni 2018

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	6
1.1 Die Bedeutung der RNA	6
1.1.1 mRNA Transport und Lokalisation	7
1.1.2 Die Retention von mRNA im Zellkern	9
1.2 <i>Drosophila melanogaster</i> als Modellsystem	10
1.2.1 Die Entwicklung des Nervensystems	10
1.2.2 Die Kaskade der temporalen Spezifizierungsgene	12
1.3 Der Transkriptionsfaktor Cas	13
1.3.1 Die Retention der <i>cas</i> mRNA im Zellkern	14
1.4 Zielsetzung / Fragestellung	16
2 Material & Methode	17
2.1 Fliegenarbeit	17
2.1.1 Haltung und Lebenszyklus von <i>Drosophila melanogaster</i>	17
2.1.2 Verwendete Fliegenstämme	17
2.1.3 Gewinnung von Jungfrauen	19
2.1.4 Kreuzungen	19
2.1.5 Eiablagen	19
2.1.6 UAS-Gal4 System	19
2.1.7 RNAi System	20
2.2 Molekularbiologische Arbeiten	21
2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Fliegenlarven	21
2.2.2 Primer	21
2.2.3 PCR	23
2.2.4 PCR Aufreinigung	25
2.2.5 Ethanol-fällung	25
2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese	26
2.2.7 Gelextraktion	26
2.2.8 Restriktion	26
2.2.9 Ligation	27
2.2.10 Herstellung chemisch kompetenter DH5 α -Bakterien	27
2.2.11 Transformation kompetenter Bakterien	28
2.2.12 Ansetzen einer Flüssigkultur	29
2.2.13 Plasmidpräparation	29
2.2.14 Konzentrationsbestimmung	29

2.2.15	Sequenzierung.....	29
2.3	Generierung transgener Fliegen mit dem phi31 System.....	29
2.3.1	Chemische Dechorionisierung von Embryonen.....	30
2.3.2	Injektionslösung.....	30
2.3.3	Injektionskapillare.....	31
2.3.4	Mikroinjektion.....	31
2.3.5	Kreuzungen zur Gewinnung homozygot transgener Fliegen.....	32
2.4	Immunhistochemie.....	34
2.4.1	Sondenherstellung.....	34
2.4.2	Fluoreszente In-situ Hybridisierung.....	35
2.4.3	Verwendete Antikörper.....	37
2.4.4	Fluoreszente Antikörperfärbung.....	37
2.4.5	Präparation der Embryonen.....	38
2.4.6	Präparation der Larvengehirne.....	39
2.5	Dokumentation der Färbungen.....	39
2.6	Kits, Geräte, Chemikalien und Lösungen.....	39
3	ERGEBNISSE.....	40
3.1	Die Kernrückhaltung der <i>cas</i> mRNA im Embryo.....	40
3.2	Dokumentation der larvalen <i>cas</i> Expression.....	42
3.2.1	Die Expression von <i>cas</i> im larvalen Stadium 2 (L2).....	42
3.2.2	Die Expression von <i>cas</i> im larvalen Stadium 3.....	43
3.3	Die <i>cas</i> mRNA wird gespleißt im Kern zurückgehalten.....	46
3.3.1	Nachweis der <i>cas</i> mRNA mit einer Exonsonde.....	47
3.3.2	Nachweis der <i>cas</i> mRNA mit einer Intronsonde.....	48
3.4	Die nukleare Retention der <i>cas</i> mRNA ist in <i>D. virilis</i> konserviert.....	49
3.4.1	Die <i>cas</i> mRNA zeigt auch im <i>D. virilis</i> Embryo eine nukleare Retention.....	49
3.4.2	Die <i>cas</i> mRNA zeigt auch in der <i>D. virilis</i> Larve eine nukleare Retention.....	50
3.5	Das Signal zur nuklearen Retention der <i>cas</i> mRNA.....	51
3.5.1	Das Retentionssignal von <i>cas</i> befindet sich innerhalb der ersten 1035 Basen.....	52
3.5.2	Deletionen von 300 Bp können das Retentionssignal nicht eingrenzen.....	54
3.5.3	Deletionen von 207 Bp können das Retentionssignal nicht eingrenzen.....	57
3.6	Weitere Experimente zur Lokalisierung des Kernrückhaltesignals.....	60
3.6.1	Die ersten 1035 Bp sind nicht ausreichend zur Kernrückhaltung von nGFP.....	60
3.6.2	Der Einbau von Spacersequenzen innerhalb des ersten kbs der <i>cas</i> CDS stört die <i>cas</i> mRNA Kernrückhaltung.....	62
3.7	Das dlmp-Bindemotiv ist notwendig für die <i>cas</i> mRNA-Kernrückhaltung.....	65

3.7.1	Übereinstimmungen im <i>cas</i> -Sequenzvergleich zwischen <i>D. melanogaster</i> und <i>D. virilis</i>	67
3.7.2	Die Deletion des dImp-Motives stört die <i>cas</i> mRNA-Kernrückhaltung	69
3.7.3	Die Zerstörung des dImp-Motivs mittels Basenaustausch stört die <i>cas</i> mRNA-Kernrückhaltung.....	71
3.7.4	Eine Kolokalisation der <i>cas</i> mRNA mit dImp ist nicht nachzuweisen.....	72
3.7.5	Der dImp Knock-down mittels RNAi zeigt keinen Phänotyp	75
3.8	Der <i>grk</i> mRNA-Lokalisationskomplex scheint nicht an der <i>cas</i> mRNA-Lokalisation beteiligt zu sein.....	76
3.8.1	Antikörperfärbungen der Komplexbeteiligten.....	77
3.9	Eine Triplet Wiederholung innerhalb der <i>cas</i> mRNA könnte in die Kernretention involviert sein	79
3.9.1	Es besteht eine Kolokalisation zwischen Cas und Mbl.....	79
3.9.2	Mbl Knock-down in L3-Larven.....	81
4	DISKUSSION	85
4.1	Biologische Relevanz nuklearer RNA-Retention.....	85
4.2	Der dImp Zipcode scheint notwendig zur Retention der <i>cas</i> mRNA	88
4.3	Spielt die Sekundärstruktur des Zipcodes eine Rolle in der Kernrückhaltung?.....	91
4.4	Sind die Mitglieder des <i>grk</i> mRNA-Bindekomplex in die Kernrückhaltung der <i>cas</i> mRNA involviert?.....	95
4.5	Muscleblind könnte eine Rolle in der Kernretention von <i>cas</i> mRNA spielen	96
4.6	RNA-bindende Strukturen im Zellkern	99
4.7	Die mögliche Rolle des Spleißvorgangs bei der Kerlokalisierung der <i>cas</i> mRNA....	100
4.8	RNPs und Kernexport.....	102
4.9	Das temporale Spezifizierungsgen <i>svp</i>	103
5	ZUSAMMENFASSUNG/ABSTRACT	106
6	LITERATURVERZEICHNIS	108
7	ANHANG	139
7.1	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	139
7.1.1	Abbildungsverzeichnis.....	139
7.1.2	Tabellenverzeichnis	141
7.2	Sequenzdaten.....	141
7.3	Geräte, Kits und Computersoftware	152
7.4	Chemikalien, Lösungen und Verbrauchsmaterialien	154
7.4.1	Chemikalien und Lösungen.....	154
7.4.2	Verbrauchsmaterialien	156
7.5	Abkürzungsverzeichnis.....	157

7.6 Eidesstattliche Erklärung163

quote and only man is vile quote



as a representative
of the insect world
i have often wondered
on what man bases his claims
to superiority
everything he knows he has had
to learn whereas we insects are born
knowing everything we need to know
and i never saw a city
full of men manage to be as happy
as a congregation of mosquitos
who have discovered a fat man
on a camping trip
man cannot even make war
with the efficiency and generalship
of an army of warrior ants
and he has done little else
but make war for centuries
make war and wonder
how he is going to pay for it
the only invention man ever made
which we insects do not have
is money and he gives up
everything else to get money
and then discovers that it is not worth
what he gave up to get it

archy (Schabe)

Don Marquis: the lives and times of archy and mehitabel

1 Einleitung

Als einer der ersten Evolutionstheoretiker propagierte Jean-Baptiste de Lamarck (1744-1829) in seinen Theorien die durch wiederholte Urzeugung entstandenen Organismen und die Vererbung erworbener Eigenschaften (Lamarck, 1809). Seine Theorie wurde abgelöst durch die Idee der Anpassung von Organismen an ihre Umwelt durch natürliche Selektion. Diese vertrat auch Charles Robert Darwin (1809-1882) in seinem 1859 veröffentlichten Buch „On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life“. Gleichzeitig war er der Überzeugung, dass die heutigen Lebewesen von gemeinsamen Vorfahren abstammen (Darwin, 1859). Anhand verschiedener Kreuzungsversuche an der Erbse konnte Gregor Johann Mendel (1822-1884) seine drei Mendel'schen Regeln formulieren (Mendel, 1866). Wie diese Merkmale vererbt wurden, konnte er jedoch nicht erklären. Dass die DNA (deoxyribonucleic acid) das Trägermolekül des Erbgutes ist zeigte Oswald Theodore Avery (1877-1955) in einem Experiment mit Pneumokokken (Avery *et al.*, 1943). Dies konnte 1952 von Hershey und Chase bestätigt werden (Hershey und Chase, 1952). Das von Alfred Day Hershey und Martha Chase mit unterschiedlich radioaktiv markierten T2 Phagen durchgeführte Experiment legte den Grundstein für das 1953 publizierte Model der DNA-Struktur von James Dewey Watson und Francis Harry Compton Crick. Bereits zu diesem Zeitpunkt verwiesen Watson und Crick auf die Einfachheit der Vervielfältigung der DNA durch die ihr eigene Struktur (Watson und Crick, 1953). Durch die Öffnung der Doppelhelix sind die Basen zur Vervielfältigung der darin enthaltenen Erbinformationen frei zugänglich. Neben der Weitergabe der Erbinformation durch die DNA, wird diese Aufgabe im Falle vieler Viren auch von der RNA (ribonucleic acid) übernommen. Die RNA-Welt-Hypothese besagt, dass die RNA als Informationsspeicher und Katalysator chemischer Reaktionen erst den Grundbaustein für die heutigen Lebensformen auf DNA-Basis legte (Miller, 1953; Miller und Urey, 1959). Heute sind nicht nur die Eigenschaften der DNA Objekt ausgiebiger Forschung, sondern auch die Funktionen und Eigenschaften der messenger RNA (mRNA) und der nichtkodierenden RNAs (non-coding (nc) RNA z.B. rRNA (ribosomale RNA), siRNA (small interfering RNA) usw.).

1.1 Die Bedeutung der RNA

Entsprechend der DNA besteht die RNA aus Nukleotiden, welche durch Phosphordiesterbrücken miteinander verbunden sind. Im Gegensatz zur DNA enthält RNA als Zuckerbestandteil Ribose statt Desoxyribose und die Pyrimidin-Base Uracil anstelle des Thymins. RNA liegt unverzweigt und einzelsträngig in der Zelle vor, mit definiertem 5'- und 3'- Ende und man unterscheidet zwei generelle Gruppen von RNA, die ncRNA und die mRNA (Seyffert, 2003). Die ncRNA gliedert sich in mehrere Unterarten wie zum Beispiel die tRNA (Transfer RNA) oder die siRNA (Hamilton und Baulcombe, 1999). Erstere ist essenziell für die Übersetzung der mRNA in Proteine, während die ca. 25 Basen lange siRNA sich mit komplementären einzelsträngigen Ribonukleinsäuren verbindet und so deren normale Funktion stört (Hamilton und Baulcombe, 1999). Kleine ncRNAs konnten auch in Bakterien nachgewiesen werden, machen hier jedoch nur ca. 5-20 % des genomischen Inhaltes aus (Axmann *et al.*, 2005; Dennis und Omer, 2005). Bei den restlichen 80 – 95 % handelt es sich um Protein-kodierende Sequenzen (Mattick, 2004).

Höher entwickelte Organismen zeichnen sich durch einen höheren Prozentsatz an ncRNA aus (Frith *et al.*, 2005; Mattick, 2001; Mattick, 2003). Faszinierend ist die geringe Variabilität der Anzahl an Protein-kodierenden Genen zwischen höher entwickelten Organismen. So variiert deren Zahl zwischen *Caenorhabditis elegans* und dem Menschen um weniger als 30 % - trotz der viel höheren Zellzahl und physiologischen Komplexität des *Homo sapiens* (Frith *et al.*, 2005). Bezeichnend für die höheren Eukaryoten sind deren weiter entwickelte RNA-Verarbeitung und das RNA-Signalsystem (Mattick und Makunin, 2006). Durch alternatives Spleißen beispielsweise werden verschiedene Proteinisoformen desselben Gens hergestellt (Croft *et al.*, 2000; Graveley, 2001; Lopez, 1998; Mattick, 2001; Mattick und Gagen, 2001). Bei dem Spleißprozess werden Sequenzen, welche nicht für die Translation benötigt werden (Introns), herausgeschnitten und die übrig bleibenden Sequenzen (Exons) zur fertigen mRNA zusammengefügt (Berget und Sharp, 1977; Chow *et al.*, 1977). Beim alternativen Spleißen handelt es sich um einen wichtigen Mechanismus, welcher in 60 % der ca. 13.000 exprimierten Gene von *Drosophila spec.* auftritt. Dabei kommt ein solches Ereignis in jedem Gen mit mehreren Exons im Durchschnitt einmal vor (Graveley *et al.*, 2011). Trotz ihrer Einzelsträngigkeit ist es der RNA möglich, doppelsträngige Strukturen auszubilden (Kim *et al.*, 1974; Robertus *et al.*, 1974). Hierfür müssen in der RNA zueinander komplementäre Sequenzen vorliegen, welche durch eine Faltung des RNA-Stranges in direkten Kontakt miteinander treten. Zwischen den zueinander komplementären Basen entstehen Wasserstoffbrückenbindungen, welche die entstandene Sekundärstruktur stabil halten (Adams *et al.*, 1969; Steitz, 1969). Aufgrund der physiologischen Bedingungen in der Zelle falten sich die RNA-Stränge in einer für sie typischen und einzigartigen Struktur: der zweidimensionalen Sekundär- und der dreidimensionalen Tertiärstruktur (Schellman und Schellman, 1997). Mithilfe von geeigneter Software kann anhand verschiedener Algorithmen die mögliche sekundäre und tertiäre RNA-Struktur einer beliebigen RNA ermittelt werden (Dirks *et al.*, 2004; Do *et al.*, 2006; Hamada *et al.*, 2009; Mathews *et al.*, 2010; Rivas und Eddy, 1999; Xia *et al.*, 1998). Die durch die Faltung der RNA hervorgebrachten Strukturen können wichtige funktionelle Eigenschaften besitzen (Dixon und Hillis, 1993; Erdmann *et al.*, 1984; Noller, 1984; Wheeler und Honeycutt, 1988). Der sogenannte Stem-loop, bestehend aus einem gepaarten Basenstamm und einer nicht gepaarten Basenschleife, ist einer der häufigsten Vertreter der biologisch wichtigen Sekundärstrukturen. Einen solchen Stem-loop mit besonderer funktionaler Bedeutung besitzt das Gen *oskar (osk)* in *Drosophila spec.* (Jambor *et al.*, 2011). *osk* mRNA wird in den frühen Stadien der Oogenese in der Oozyte angereichert und ab dem embryonalen Stadium 9 strikt am posterioren Pol der Oozyte lokalisiert (Ephrussi *et al.*, 1991; Kim-Ha *et al.*, 1991; Lehmann und Nüsslein-Volhard, 1986). Ein in der 3'-UTR lokalisierter Stem-loop in Verbindung mit dem Herausspleißen des ersten Introns vermittelt im Falle der *osk* mRNA die Lokalisierung am posterioren Pol der Oozyte (Hachet und Ephrussi, 2004; Jambor *et al.*, 2011).

1.1.1 mRNA Transport und Lokalisation

Der Mechanismus des gezielten Transports und der Lokalisation von mRNAs innerhalb der Zelle galt vor einigen Jahren noch als spezielle und äußerst seltene Art der Translationskontrolle. Diese Ansicht hat sich jedoch in den letzten 20 Jahren stark gewandelt und es konnte gezeigt werden, dass dieser Prozess in einer Vielzahl von Vertebraten- und Invertebratenzellen von Bedeutung ist (Bashirullah *et al.*, 1998;

Czaplinski und Singer, 2006; Ding und Lipshitz, 1993; Frigerio *et al.*, 1986; Jeffery *et al.*, 1983; Kloc *et al.*, 2002; Rebagliati *et al.*, 1985; Ryder *et al.*, 2018; St Johnston, 2005; Taliaferro *et al.*, 2014). Die Lokalisation von mRNAs hat durch die entstehende Möglichkeit der präzisen zeitlichen und räumlichen Kontrolle der Proteintranslation mehrere Vorteile. Einerseits bedeutet der mRNA- anstelle des Proteintransports reduzierte Energiekosten für die Zelle, da die Proteine nicht einzeln zu ihrem Zielort gebracht werden müssen, sondern viele Kopien des Proteins aus einer einzigen mRNA hergestellt werden können (Jansen, 2001; Johnston, 1995). Andererseits kann durch den während des Transports bestehenden Translationsstopp sichergestellt werden, dass die benötigten Proteine erst an ihrem Zielort aktiv werden (Besse und Ephrussi, 2008; Bullock, 2011).

Generell wird zwischen drei Arten der mRNA-Lokalisation unterschieden (Martin und Ephrussi, 2009; Medioni *et al.*, 2012). Zum einen gibt es den Mechanismus des lokalen Schutzes der mRNA vor Degradierung, auch Degradations/Protektions-Mechanismus genannt (Bashirullah *et al.*, 2001; Ding *et al.*, 1993). Als ein gut untersuchtes Beispiel kann hier das Hitzeschockprotein 83 (hsp83) genannt werden, welches am posterioren Pol in *Drosophila* Embryonen stabilisiert und im restlichen Cytoplasma degradiert wird (Ding *et al.*, 1993). Der zweite Mechanismus (Diffusion/Ansammlung) unterscheidet sich durch die diffusionsabhängige Verteilung der zu lokalisierenden mRNA von ersterem Mechanismus. So wird z.B. *nanos* mRNA durch starke cytoplasmatische Strömungen zum posterioren Pol der Oocyte transportiert und dort Aktin-abhängig verankert (Forrest und Gavis, 2003). Anschließend wird die diffus verteilte mRNA in den restlichen Bereichen abgebaut. Der dritte Mechanismus zur mRNA-Lokalisation ist der gerichtete Transport entlang des polarisierten Cytoskeletts (Martin und Ephrussi, 2009; Medioni *et al.*, 2012). Er kann in vielen unterschiedlichen Zelltypen und Organismen beobachtet werden: z.B. in *Drosophila* Oozyten und Embryonen, *Xenopus* Oocyten, migrierenden Säugetierzellen und Vertebratenneuronen (Gagnon und Mowry, 2012; Holt und Bullock, 2009; Martin und Ephrussi, 2009). Der gerichtete Transport der mRNA erfolgt innerhalb sogenannter Ribonucleoproteine (RNPs). RNPs sind Proteinkomplexe, die RNA enthalten (Ainger *et al.*, 1993; Besse und Ephrussi, 2008; Knowles *et al.*, 1996; Wilhelm und Vale, 1993). Die Formation derselben wird initiiert durch die Erkennung cis-regulatorischer Elemente oder Zipcodes. Bei diesen handelt es sich um hoch spezifische Sequenzmotive oder Sekundärstrukturen innerhalb der Ziel-mRNA. Meist befinden sich diese Signale in mRNA-Bereichen, welche nicht translatiert werden (Hamilton und Davis, 2011; Lewis und Mowry, 2007; Van de Bor und Davis, 2004). Nach Initiierung der RNP-Formation folgt die Zusammensetzung der zu transportierenden Ziel-mRNA mit anderen Motor- und Transportproteinen (Kiebler und Bassell, 2006; Knowles *et al.*, 1996; Lange *et al.*, 2008). Anschließend erfolgt der gezielte Transport des Proteinkomplexes entlang des Cytoskeletts bis zu seinem vorherbestimmten Ziel. In folgender Abbildung sind die beschriebenen Mechanismen noch einmal zusammengefasst (Jansen, 2001).

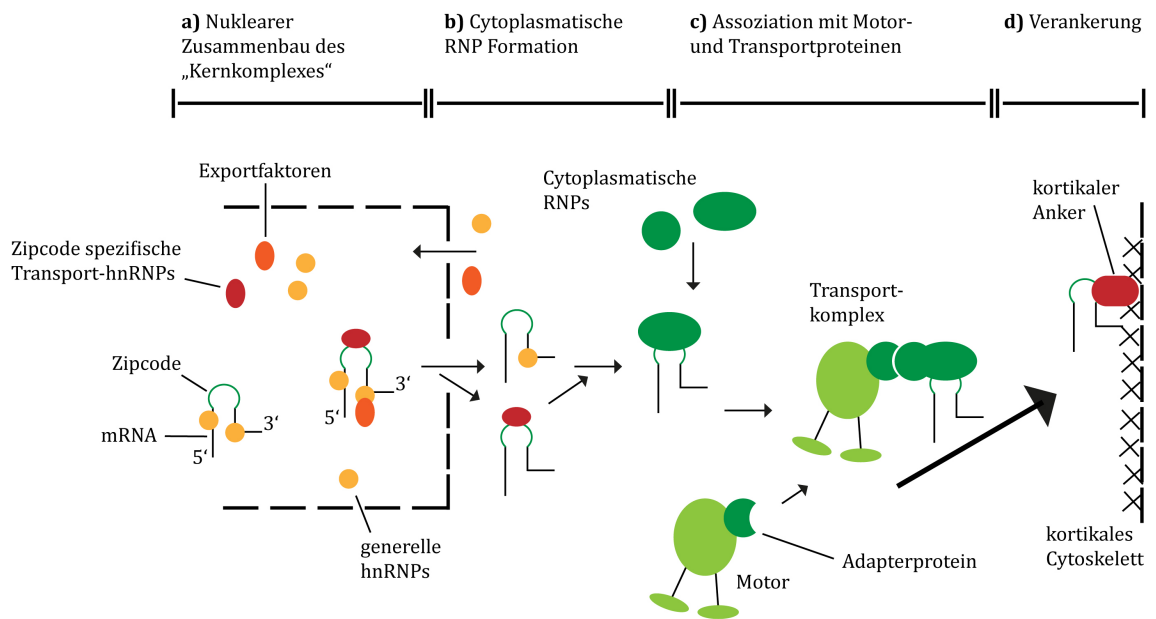


Abb. 1.1: Mechanismen der mRNA-Lokalisation a) Zusammensetzung des Kernkomplexes: Die hnRNPs (heterogeneous nuclear RNPs) binden im Nukleus an die zu transportierende mRNA. Neben den generellen hnRNPs gibt es auch spezifische hnRNPs. Diese erkennen die spezifischen Lokalisationssignale der mRNAs, die Zipcodes. Anschließend assoziiert die mRNA mit Proteinen, welche in den mRNA-Export involviert sind und der mRNA-RNP-Komplex wird ins Cytoplasma geschleust. b) Cytoplasmatische RNP-Formation: Die generellen hnRNPs und Export-assoziierten Proteine wandern zurück in den Nukleus, während die spezifischen hnRNPs entweder mit der mRNA verbunden bleiben oder sich ebenfalls von der mRNA lösen und durch cytoplasmatische Zipcode-spezifische RNP ersetzt werden. c) Transport: Der RNP-Komplex assoziiert mit Motor- und Transportproteinen und wird an den Zielort gebracht. Die Assoziation der Proteine mit dem RNP-Komplex erfolgt vermutlich über Adapterproteine. d) Verankerung: Hat der RNP-Motor-Komplex seinen Zielort erreicht, löst sich der Protein-Komplex von dem Motor und wird am Zielort durch spezifische Proteine verankert. Die Translation der mRNA ist nur am Zielort gestattet. Die Unterbindung derselben während des Transports wird durch Proteine bewerkstelligt (verändert nach Jansen, 2001).

1.1.2 Die Retention von mRNA im Zellkern

Wie bereits dargelegt ist die Lokalisation von mRNA ein weitverbreiteter Mechanismus zur Genregulation. In-situ Hybridisierungsexperimente in *Drosophila* zeigten stark voneinander abweichende Ergebnisse im prozentualen Auftreten der mRNA-Lokalisation. So ermittelten Tomancak *et al.* eine 1%ige, Lecuyer *et al.* jedoch eine 71%ige subzelluläre Lokalisation der untersuchten Gene (Lécuyer *et al.*, 2007; Tomancak *et al.*, 2002). Der von Lecuyer *et al.* an frühen *Drosophila* Embryonen durchgeführte Screen ermittelte mehrere im Zellkern lokalisierte mRNAs. Die mRNAs der Gene *castor* (*cas*), *Early boundary activity 3* (*Elba3*), *Phosphatidic Acid Phospholipase A* (*PAPLA1*), *Ecdysone-induced protein 28/29kD* (*Eip71CD*), *hunchback* (*hb*), *Jun-related antigen* (*Jra*), *kugelnkern* (*kuk*), *midline fasciclin* (*mfas*) und *screw* (*scw*) wurden uniform im Nukleus verteilt gefunden. Cas Protein konnte hierbei in Zellen mit cytoplasmatischer *cas* mRNA gefunden werden, jedoch nicht bzw. nur in sehr geringen Mengen in Zellen mit kernlokalisierter *cas* mRNA (Lécuyer *et al.*, 2007). Es ist zu vermuten, dass durch die nukleare Retention der *cas* mRNA eine präzise zeitlich und räumlich koordinierte Proteinexpression bezweckt wird (Grosskortenhaas *et al.*, 2006; Kambadur *et al.*, 1998).

Es zeigt sich, wie wichtig räumliche Beschränkungen von Genprodukten innerhalb der zeitlichen Entwicklung eines Organismus sein können. Je komplexer hierbei der Organismus, desto schwieriger ist die Aufgabe die vorliegenden Sachverhalte

wissenschaftlich zu untersuchen. Deshalb wird auf einfach aufgebaute Lebewesen zurückgegriffen und die hier gewonnenen Erkenntnisse auf komplexere Organismen übertragen. Im folgenden Abschnitt wird der in der vorliegenden Arbeit genutzte Modellorganismus *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) vorgestellt.

1.2 *Drosophila melanogaster* als Modellsystem

Der Zoologe und Genetiker Thomas Hunt Morgan (1866-1945) nutzte als einer der Ersten die Taufliege *Drosophila spec.* (griech. *drosos* „Tau“ und *philos* „liebend“) als Modellorganismus. Mit seinen Kreuzungsversuchen bewies er, dass Gene aufeinanderfolgend auf den Chromosomen liegen (Morgan, 1910; Morgan, 1911; Morgan, 1911; Morgan, 1911). Sturtevant, ein Mitarbeiter Morgans, erstellte anhand der ermittelten Genabfolgen und deren Abständen zueinander die erste genetische Karte des X-Chromosoms (Sturtevant, 1917; Sturtevant *et al.*, 1919). In den folgenden Jahren etablierte sich vor allem die Art *D. melanogaster* als Modellorganismus. Hierfür sind unter anderem die einfache Haltung und die kurze Generationszeit verantwortlich. Zusätzlich wurde eine Vielzahl an molekularen und genetischen Werkzeugen entwickelt. Über eine Kombination der Entwicklungsbiologie und Genetik wird *D. melanogaster* vermehrt in der Erforschung der Neurogenese eingesetzt und anhand der Einfachheit der Neurogenese lassen sich komplexe Systeme wie die neuronale Grundlage des Lernens oder die axonale Wegfindung erforschen und auf höher entwickelte Organismen übertragen.

1.2.1 Die Entwicklung des Nervensystems

Die embryonale Entwicklung von *D. melanogaster* umfasst 17 Stadien, für welche der Embryo insgesamt 22 Stunden benötigt (Bownes, 1975; Campos-Ortega und Hartenstein, 1985). Circa drei Stunden nach der Befruchtung beginnt die Entwicklung des Nervensystems (Stadium 8). Es besteht aus dem zentralen Nervensystem (ZNS) (Gehirn und ventrales Nervensystem (vNS)) und dem peripheren Nervensystem (PNS). Hierbei gehen das Gehirn aus der procephalen neurogenen Region (pNR) und das ventrale Nervensystem aus der ventralen neurogenen Region (vNR) hervor (Campos-Ortega, 1993; Campos-Ortega und Hartenstein, 1997; Hartenstein und Campos-Ortega, 1984; Poulson, 1950). Das vNS besteht aus 14 segmental angeordneten Einheiten, den Neuromeren. Ein Neuomer unterteilt sich wiederum in zwei Hemineuomere. Das vNS wird von jeweils 30 Neuroblasten (NB) pro Hemineuomer gebildet, welche aus dem Ektoderm in den Embryo delaminieren (Broadus *et al.*, 1995; Doe, 1992). Ausnahmen hierfür bestehen im Gehirn, den gnathalen Segmenten und den am posteriorsten gelegenen Segmenten (Birkholz *et al.*, 2013; Urbach *et al.*, 2003; Urbach *et al.*, 2016). Bei Neuroblasten handelt es sich um neurale Stammzellen (Poulson, 1950; Wheeler, 1891; Wheeler, 1893). Sie können einzeln identifiziert werden und ihr Muster ist in jedem Segment unveränderlich (Bastiani und Goodman, 1986; Bate, 1976; Bate und Grunewald, 1981; Doe und Goodman 1985; Goodman *et al.*, 1984; Taghert und Goodman, 1984). In *D. melanogaster* delaminieren sie in einem stereotypen räumlichen und zeitlichen Muster (Hartenstein *et al.*, 1987; Hartenstein und Campos-Ortega, 1984). Die unveränderliche örtliche und zeitliche Delamination der Neuroblasten, in Verbindung mit individuellen molekularen Markern, erlaubt die Identifizierung jedes einzelnen Neuroblasten (Bossing *et al.*, 1996; Broadus *et al.*, 1995; Doe, 1992). Sie entwickeln sich aus einem Cluster von neuroektodermalen

Zellen, dem proneuralen Cluster (pNC) (Jimenez und Campos-Ortega, 1979). In diesem Cluster besitzen anfänglich alle Zellen die Fähigkeit zu Neuroblasten zu werden, jedoch schlägt nur eine Zelle dieses Schicksal ein, während die anderen ein epidermales Schicksal annehmen (Bhat, 1999; Cubas *et al.*, 1991; Romani *et al.*, 1987; Skeath, 1999; Skeath und Carroll, 1991). Der *achaete-scute* (*ac-sc*) Komplex und der Prozess der lateralen Inhibition spielen hierbei die entscheidenden Rollen (Cabrera *et al.*, 1987; Cubas *et al.*, 1991; Ghysen und Dambly-Chaudiere, 1989; Wigglesworth, 1940). Die Zelle mit der höchsten Expression an Genen des *achaete-scute* Komplexes wird zum Neuroblasten und inhibiert die Expression der Gene dieses Komplexes in den umliegenden Zellen des pNCs durch den *Delta-Notch*-Signalweg (Cabrera, 1990; Richelle und Ghysen, 1979; Simpson, 1990). Durch diese Zell-Zell-Interaktion wird sichergestellt, dass sich nur eine Zelle des proneuralen Clusters zum Neuroblasten entwickelt. Die Neuroblastendelamination aus der ventralen neurogenen Region verläuft in fünf aufeinanderfolgenden Segregationswellen innerhalb von ca. drei Stunden (Doe, 1992; Hartenstein und Campos-Ortega, 1984). Hierbei ist entscheidend, dass jeder Neuroblast aus einer bestimmten Region zu einem festgelegten Zeitpunkt delaminiert und seinen spezifischen Platz innerhalb der subektodermalen Neuroblastenschicht einnimmt. Die notwendige Information der Neuroblastenidentität wird im Neuroektoderm über ein kartesisches Koordinatensystem von Segmentpolaritäts- und Kolumnargenen vermittelt. Die Segmentpolaritätsgene *wingless* (*wg*), *hedgehog* (*hh*), *gooseberry* (*gsb*) und *engrailed* (*en*) werden in neuroektodermalen Streifen exprimiert und unterteilen die anterior-posteriore Achse (Akam, 1987; Bhat, 1996; Bhat, 1999; Chu-LaGriff und Doe, 1993; Matsuzaki und Saigo, 1996; McDonald und Doe, 1997; Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980; Patel *et al.*, 1989; Skeath und Thor, 2003; Technau *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 1994). Die Kolumnargene *muscle segment homeobox* (*msh*), *intermediate neuroblast defective* (*ind*) und *ventral nervous system defected* (*vnd*) werden in dorso-ventraler Richtung exprimiert (Bhat, 1999; Chu *et al.*, 1998; D'Alession und Frasch, 1996; Isshiki *et al.*, 1997; Jimenez *et al.*, 1995; McDonald *et al.*, 1998; Skeath *et al.*, 1994; Skeath und Thor, 2003; Technau *et al.*, 2006; Weiss *et al.*, 1998; White, 1980; White *et al.*, 1983). Neben dieser Positionsinformation benötigt der delaminierende NB zusätzlich eine zeitliche Information. Wechselnde induktive Signale des Neuroektoderms zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Delamination des Neuroblasten beeinflussen zusätzlich dessen Identität (Berger *et al.*, 2001). Anhand der zeitlichen und räumlichen Informationen entsteht ein Netz aus Neuroblasten, welche sich durch ein spezifisches Set an molekularen Markern identifizieren lassen und so einen invarianten, einzigartigen Zellstammbaum hervorbringen (Bossing *et al.*, 1996; Broadus *et al.*, 1995; Doe, 1992). Nach seiner Delamination teilt sich der Neuroblast stammzellartig in einen neuen NB und eine kleinere Ganglionmutterzelle (GMZ) (Bauer, 1904; Fuerstenberg *et al.*, 1998; Poulson, 1950; Reichert, 2011). Diese wiederum teilt sich in der Regel noch ein einziges Mal und produziert ein Paar postmitotischer Zellen. Abhängig vom jeweiligen Neuroblastenstammbaum handelt es sich hierbei um Neurone und/oder Gliazellen. Bei Abschluss der embryonalen Entwicklung sind aus den 30 Neuroblasten ca. 320 Neurone und 30 Gliazellen entstanden (Bossing *et al.*, 1996; Doe, 1992; Fuerstenberg *et al.*, 1998; Hosoya *et al.*, 1995; Ito *et al.*, 1995; Landgraf *et al.*, 1997; Schmid *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 1997; Udolph *et al.*, 1993).

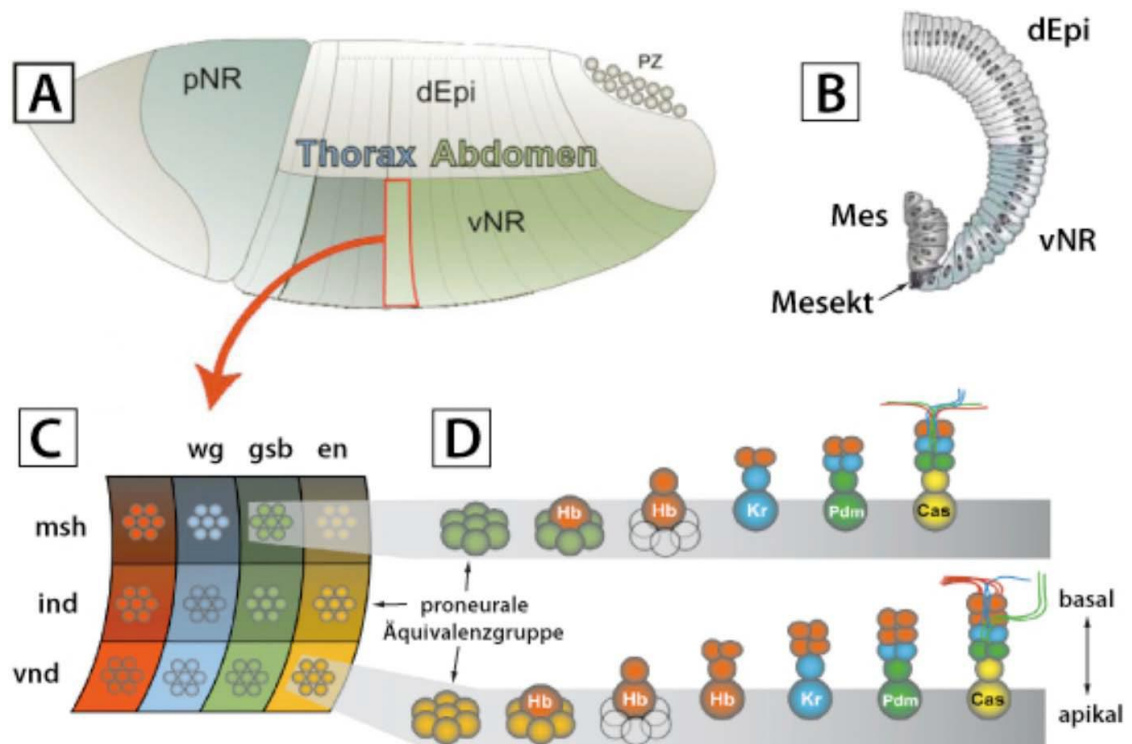


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der frühen Stadien der embryonalen Neurogenese bei *D. melanogaster*. (A) Anlagenkarte eines Embryos im frühen Gastrulastadium (Stadium 7) aus lateraler Sicht. Der neurogene Bereich des Ektoderms teilt sich in zwei Bereiche. Aus der ventralen neurogenen Region (vNR) entsteht das ventrale Nervensystem, die prozephale neurogene Region (pNR) bringt das Gehirn hervor. PZ: Polzellen; dEpi: dorsale Epidermisanlage. (B) Vertikaler halbseitiger Querschnitt durch A. Abgebildet sind die Mesodermanlage (Mes) und die mesektodermalen Zellen (Mesekt). (C) Vergrößerung eines abdominalen Hemisegments (HS). Die Segmentpolaritätsgene *wg*, *gsb* und *en* teilen das HS in vier transversale Spalten, während die Kolumnargene *msh*, *ind* und *vnd* das HS in dorso-ventraler Richtung unterteilen. Durch die differentielle Genaktivität innerhalb des HS werden den proneuralen Äquivalenzgruppen unterschiedliche Identitäten vermittelt. (D) Ab dem späten St. 8 beginnt eine Zelle des proneuralen Clusters als Neuroblast zu delaminieren. Die restlichen Zellen des Clusters schlagen ein ektodermales Schicksal ein. Im Laufe der Neurogenese bringt jeder Neuroblast einen spezifischen Zellstammbaum hervor, dessen Zellidentitäten durch die sequentielle Aktivität der temporalen Identitätsgene *hb*, *Krüppel (Kr)*, *POU-domain-protein (Pdm)* und *cas* festgelegt werden (Abb. mit freundlicher Genehmigung von Joachim Urban).

1.2.2 Die Kaskade der temporalen Spezifizierungsgene

Wie bereits erwähnt benötigt der NB zur Ausbildung des ihm eigenen invarianten Zellstammbaums neben der positionellen auch eine zeitliche Spezifizierung. Diese temporalen Spezifizierungsfaktoren, auch temporale Identitätsgene genannt, vermitteln dem NB die Information, zu welchem Zeitpunkt er welche Ganglionmutterzelle erzeugen muss. Hierbei ist eine präzise zeitliche Abstimmung der Genexpression essenziell für die Generierung der Neuroblasten-spezifischen Zelllinien (Bhat und Schedl, 1994; Yang *et al.*, 1993). Bei den temporalen Identitätsgenen handelt es sich um Transkriptionsfaktoren (TF) welche in den Neuroblasten in immer gleicher Abfolge exprimiert werden (Cui und Doe, 1992; Gaul *et al.*, 1987; Mellerick *et al.*, 1992; Romani *et al.*, 1996). Die konservierte Expression der Gene *hb*, *Kr*, *Pdm1*, *cas* und *grainyhead (grh)* verläuft sequenziell im Neuroblasten (Brody und Odenwald, 2000; Brody und Odenwald, 2002; Grosskortenhaus *et al.*, 2005; Isshiki *et al.*, 2001; Kambadur *et al.*, 1998; Novotny *et al.*, 2002). Mit der Teilung des Neuroblasten wird die Expression des TFs und dadurch auch die zeitliche Identität des Neuroblasten an die entstandene Nachkommenzelle, die GMZ, weitergegeben

(Brody und Odenwald, 2000; Isshiki *et al.*, 2001; Weigmann und Lehner, 1995; Yang *et al.*, 1993). Demnach exprimieren die zuerst entstandenen Neurone im ZNS *hb*, die danach entstandenen *Kr* und die wieder später entstandenen Neurone *pdm*. Jeder dieser temporalen Identitätsgene wird in einem beschränkten Zeitfenster exprimiert und ist verantwortlich für die Aktivierung des nachfolgenden Gens in der Kaskade. Gleichzeitig reprimiert die Expression des einen Transkriptionsfaktors die Expression des übernächsten TFs in der Kaskade (Baumgardt *et al.*, 2009; Brody und Odenwald, 2002; Isshiki *et al.*, 2001; Kambadur *et al.*, 1998; Kanai *et al.*, 2005). Mit jeder Teilung des Neuroblasten wird die entstandene GMZ weiter in den Embryo hineingeschoben. Hierdurch ergibt sich eine Schichtung der Neurone, wobei die ältesten Neurone sich in den innersten Schichten finden, während jüngere weiter außen, in der Nähe des Neuroblasten, liegen. Die Position der Neurone innerhalb des ZNS zeigt also an, ob das jeweilige Neuron früh oder spät in der Entwicklung des Nervensystems gebildet wurde (Bossing *et al.*, 1996; Harris, 2001; Isshiki *et al.*, 2001; Kambadur *et al.*, 1998). Welche postmitotischen Zellen - Motoneurone, Interneurone oder Gliazellen - von den GMZ gebildet werden, ist abhängig vom jeweiligen Neuroblasten. Die temporalen Identitätsgene legen die zeitliche Identität innerhalb des Zellstammbaumes fest, nicht einzelne Zelltypen. Im folgenden Abschnitt wird das temporale Identitätsgen *cas* näher vorgestellt.

1.3 Der Transkriptionsfaktor Cas

Der Transkriptionsfaktor Cas oder auch Ming (chinesisch: Schicksal) spezifiziert die Expression wichtiger Schlüsselgene in der Entwicklung des ZNS, im Speziellen der Entwicklung der Neuroblastenstammbäume (Cui und Doe, 1992). *cas* wird als viertes Gen in der Kaskade der temporalen Transkriptionsfaktoren aktiviert. Es folgt auf die Gene *hb*, *Kr* und *Pdm1*. *cas* wird also durch *Kr* reprimiert und von *Pdm1* aktiviert. Cas wiederum aktiviert innerhalb der Kaskade der temporalen Spezifizierungsgene die Expression von *grh* und beschränkt die Expression von *Pdm1* (Kambadur *et al.*, 1998). Die Repression der *Pdm1* Genexpression durch Cas wird vermittelt durch eine DNA-Bindesequenz (5'-(CG)C(CT)(CT)AAAAA(AT)-3'), welche auch in *hb* zu finden ist. Während Hb *Pdm1* innerhalb eines frühen Zeitfensters der Neuroblastenentwicklung reprimiert, übernimmt zu einem späteren Zeitfenster Cas diese Aufgabe (Kambadur *et al.*, 1998). *cas* befindet sich auf dem rechten Arm des dritten Chromosoms und kodiert für einen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor. Auf der cytogenetischen Karte ist *cas* an Position 83C1-83C2 lokalisiert (Cui und Doe, 1992; Kambadur *et al.*, 1998; Mellerick *et al.*, 1992; Spradling *et al.*, 1999). Es sind zwei Transkripte und zwei dazu gehörige Polypeptide beschrieben worden. Transkript *cas*-RA besteht aus 3151, Transkript *cas*-RC aus 2845 Basen (Adams *et al.*, 2000). Aufgrund geringer Hinweise auf die Existenz von *cas*-RC und deren späten Annotation wurde in dieser Arbeit nur mit Transkript *cas*-RA gearbeitet, welches im folgenden Text nur noch mit *cas* bezeichnet wird. Neben einem vollständigen C₂H₂-Zinkfinger besitzt das Protein eine weitere C₂H₂-Zinkfinger ähnliche Struktur und ein weiteres DNA-Bindemotiv, einen AT-Hook (Cui und Doe, 1992; Kambadur *et al.*, 1998; Mellerick *et al.*, 1992). Die kodierende Sequenz (CDS: coding sequence) von *cas* wird von drei Introns unterbrochen. Ein größeres mit einer Länge von 539 Basen und zwei kleineren mit jeweils 70 bzw. 71 Basen.

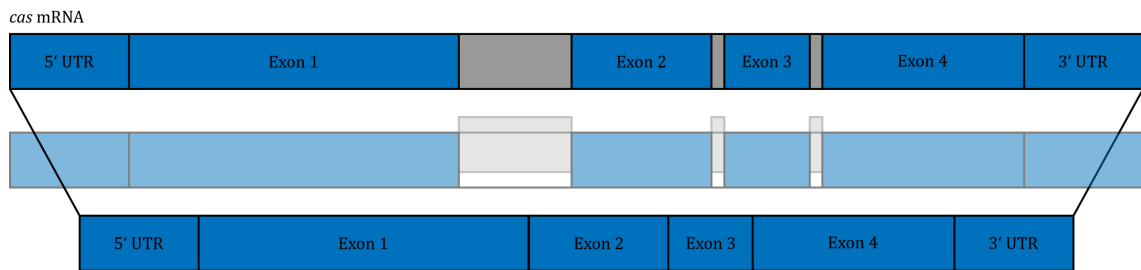


Abb. 1.3: Genstruktur von *cas-RA*. *cas* besteht aus vier Exons (blau), welche von einem großen und zwei kleineren Introns (grau) unterbrochen werden. Mittlerer Teil der Abbildung: Die drei Introns werden während des Spleißvorgangs entfernt (angedeutet durch die nach oben verschobenen grauen Intronbereiche). 5'- und 3'-UTRs sind Teil der *cas* CDS.

Die *cas* Expression beginnt in einigen Mittellinienzellen im embryonalen St. 8/9 (Mellerick *et al.*, 1992) und kurze Zeit später ist der erste *cas* exprimierende NB in jedem Hemisegment der NB 6-1 (Cui und Doe, 1992). Im späten embryonalen St. 11 findet die *cas* Expression in 17 Neuroblasten eines jeden Hemisegments des sich entwickelnden Nervensystems statt. In den Embryonalstadien 11 und 12 erreicht die *cas*-Expression ihr Maximum. Auffallend ist, dass in Neuronen und Glia keine *cas*-Expression zu finden ist, sondern sich diese auf die Neuroblasten und GMZs beschränkt. Hierbei exprimieren bestimmte Neuroblasten *cas* bereits bei ihrer Entstehung, andere Neuroblasten erst nach der Generierung einer gewissen Anzahl von GMZs. Ab dem embryonalen Stadium 14 verringert sich das Level der *cas* Expression und ist in Stadium 16 bis auf einzelne Ausnahmen im thorakalen und terminal-abdominalen ZNS nicht mehr zu detektieren (Cui und Doe, 1992; Mellerick *et al.*, 1992).

Der Verlust der *cas* Expression führt in Embryonen zu einer reduzierten posterioren Kommissur. Außerdem ist bekannt, dass es im ventralen Nervensystem die Expression von *en* beeinflusst. So sorgt der Verlust von *cas* für einen Verlust der *en*-Expression in einigen Neuronen und Glia. Gleichzeitig treten in anderen Bereichen des ZNS zusätzliche *en* positive Zellen auf (Cui und Doe, 1992; Mellerick *et al.*, 1992). Postembryonal wird *cas* in moderatem Level im zentralen Nervensystem der Larve und der Puppe exprimiert. Die *cas* positiven Zellen befinden sich im ventralen Nervensystem und dorsalen Ebenen des Gehirns (Almeida und Bray, 2005; Maurange *et al.*, 2008). Während des Pupalstadiums verschwindet die *cas* Expression aus dem ZNS und im adulten Gehirn findet sich keinerlei Expression mehr (Hitier *et al.*, 2001). Orthologe Gene wurden unter anderem in Mensch (CASZ1), Maus (Casz1), Frosch (*casz1*), Zebrafisch (*casz1*) und Nematoden (K05F 1.5) gefunden (Christine und Conlon, 2008; Liu *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2011; Meissner *et al.*, 2009; Shaye und Greenwald, 2011; Thisse und Thisse, 2005; Vacalla und Theil, 2002).

1.3.1 Die Retention der *cas* mRNA im Zellkern

Die nukleare Retention der *cas* mRNA in ventral gelegenen Zellkernen früher Embryonen wurde bereits 2007 beschrieben, jedoch wurde nicht näher auf die möglichen Ursachen eingegangen (Lécuyer *et al.*, 2007). Eine erste tiefere Untersuchung dieser Fragestellung erfolgte durch Kathrin Fischer in ihrer Diplomarbeit „Analysen zur nukleären Lokalisation der *cas* mRNA im zentralen Nervensystem von *Drosophila melanogaster*“ (Fischer, 2009). Sie konnte beobachten, dass mit der ersten Expression von *cas* im NB 6-1 die Transkripte in der Kernregion lokalisieren. Zu diesem Zeitpunkt ist noch kein Cas zu detektieren. Daraus wurde geschlossen, dass keine *cas* mRNA den Zellkern verlässt. Wird die

Kernmembran des Neuroblasten für die Cytokinese degradiert, verbleibt die mRNA zentral in der Zelle zwischen den auseinanderdriftenden Chromosomen. Im weiteren Verlauf der Neuroblastenteilung wird die *cas* mRNA dann asymmetrisch auf die Tochterzellen verteilt. Um herauszufinden, welche Sequenzen innerhalb des *cas* Gens als Signalgeber zur Kernrückhaltung fungieren, wurde ein Fusionskonstrukt aus der 5'UTR von *cas* und einer eGFP (enhanced green fluorescent protein)-Sequenz generiert. Dieses wurde in das Genom einer Fliege integriert und ektopisch in der Epidermis exprimiert. Hierdurch konnte getestet werden, ob die 5'UTR ausreichend zur Kernrückhaltung des eGFP ist. Da sich die nachgewiesenen GFP-Signale jedoch mehrheitlich im Cytoplasma befanden, konnte die 5'UTR als alleiniger Signalgeber zur nuklearen Retention der *cas* mRNA ausgeschlossen werden. In der thematisch anschließenden Diplomarbeit von Melanie Homberg „Kartierung kernexportinhibierender Sequenzen der *cas* mRNA von *Drosophila melanogaster*“, wurde untersucht, in welchem Bereich der *cas* mRNA die kernexportinhibierende Sequenz lokalisiert ist (Homberg, 2011).

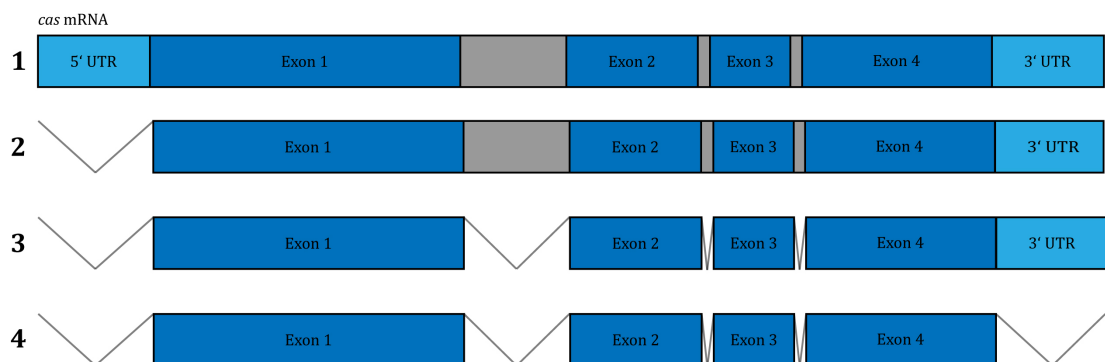


Abb. 1.4: Konstrukte UAS*cas*¹⁻⁴. Die 4 verschiedenen UAS-Konstrukte werden mit engrailedGal4 (enGal4) in der Epidermis ektopisch exprimiert und die Notwendigkeit der UTR's und Introns für die nukleare Retention der *cas* mRNA untersucht. Die Konstrukte wurden in der aufgeführten Reihenfolge 1-4 hergestellt (Konstrukte hergestellt und Experimente durchgeführt von Melanie Homberg. Konstrukt *cas*⁴ freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Ward Odenwald).

Mithilfe der ektopischen Expression vier verschiedener *cas*-Konstrukte (*cas*¹⁻⁴) (Abb. 1.4) in der Epidermis junger Embryonen, konnte Melanie Homberg darlegen, dass das Signal zur Kernlokalisierung der *cas* mRNA wahrscheinlich in der kodierenden Sequenz zu finden ist. Sie konnte zeigen, dass sich die Transkripte der vier exprimierten Konstrukte zumeist im Zellkern befanden. Eine cytoplasmatische Lokalisierung der *cas* mRNA war nur selten zu beobachten.

1.4 Zielsetzung / Fragestellung

Das embryonale zentrale Nervensystem von *Drosophila melanogaster* entwickelt sich aus individuell identifizierbaren stammzellartigen Zellen, den Neuroblasten. Die unveränderliche örtliche und zeitliche Delamination der Neuroblasten, in Verbindung mit individuellen molekularen Markern, erlaubt die Identifizierung jedes einzelnen Neuroblasten und deren spezifischer Zellstammbäume. Mit jeder Teilung bringt der NB eine Ganglionmutterzelle hervor, deren Identität abhängig von der sequenziellen Expression temporaler Spezifizierungsgene ist. Diese werden im NB exprimiert und an die GMZ weitergegeben. Hierbei wird *castor*, eines dieser temporalen Spezifizierungsgene, einer besonderen posttranskriptionellen Regulation unterworfen. Die im NB transkribierte *cas* mRNA wird im Nukleus zurückgehalten und erst mit der nächsten mitotischen Teilung des Neuroblasten ins Cytoplasma entlassen. Diese nukleare Lokalisation könnte ein neuer Mechanismus zur zeitlichen Kontrolle der Proteinsynthese darstellen. Um das verantwortliche Sequenzmotiv zu ermitteln, wurden verschiedene UAS-kontrollierte *cas*-Konstrukte in der embryonalen Epidermis ektopisch exprimiert und deren *cas* mRNA-Lokalisation in der Zelle analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Kernrückhaltung der *cas* mRNA NB-unabhängig erfolgt und dass sich das Sequenzmotiv mit hoher Wahrscheinlichkeit in der kodierenden Sequenz der *cas* mRNA befindet.

Ob es sich bei diesem Signal um einen spezifischen Zipcode oder um eine Sekundärstruktur handelt, welche von RNA-Bindeproteinen erkannt und gebunden wird, galt es in dieser Arbeit zu untersuchen. Hierfür wurde versucht, das verantwortliche Motiv durch weitere Deletionen innerhalb der kodierenden Sequenz einzuengen. Im Anschluss an die Identifikation der verantwortlichen Retentionssequenz soll diese auf ihre Hinlänglichkeit zur Rückhaltung einer beliebigen RNA-Sequenz getestet werden. Hierfür wurde der verantwortliche Sequenzabschnitt von *cas* an GFP gekoppelt und dessen zelluläre Lokalisation analysiert. Ist die verantwortliche Sequenz innerhalb der *cas* mRNA identifiziert, soll ein UAS-Konstrukt generiert werden, welches nicht mehr im Kern reteniert wird, dessen Aminosäuresequenz jedoch der endogenen Cas-Sequenz entspricht.

Des Weiteren wurden bereits bekannte mRNA-lokalisierende RNA-Bindeproteine auf ihre Involvierung in die Kernrückhaltung der *cas* mRNA überprüft. Hierfür wurde anhand von Antikörperfärbungen und In-situ Hybridisierungen eine mögliche Koexpression der Kandidaten und der kernretenierten *cas* mRNA überprüft. Außerdem wurde durch RNAi-Experimente der mögliche Einfluss der RNA-Bindeproteine auf die Kernrückhaltung der *cas* mRNA untersucht.

2 Material & Methode

2.1 Fliegenarbeit

2.1.1 Haltung und Lebenszyklus von *Drosophila melanogaster*

In diese Arbeit wurden die Fliegenstämme *D. melanogaster* und *D. virilis* verwendet. Die Haltung der beiden Fliegenstämme ist identisch.

Haltung

Die Haltung bzw. Zucht von *D. melanogaster* und *D. virilis* erfolgte auf Futterbrei, welcher mehrmals pro Woche institutsintern zubereitet wurde. Für die Herstellung des Futterbreis siehe 7.4.1. Die Fliegen wurden in klimatisierten Räumen bei 25 °C bzw. 18 °C im Institut für Genetik gehalten. Gezüchtet wurden die Fliegen in Aufzuchtgefäßen unterschiedlicher Größe. Die Stammsammlung wurde auf Röhrchen der Größe 25 mm gehalten. Wurden viele Fliegen von einem Stamm benötigt, erfolgte die Verbreiterung auf Röhrchen mit 50 mm Durchmesser. Für Einzelkreuzungen wurden 10 mm Gefäße verwendet.

Lebenszyklus

D. melanogaster besitzt eine Lebensspanne von ca. 30 Tagen (29 °C). Bei einer Haltung auf 25 °C dauert die Entwicklung vom Embryo zur adulten Fliege ca. 9 Tage. Diese Zeitspanne ist temperaturabhängig und kann durch die Haltung der Fliege bei 18 °C verdoppelt werden. Legt das Weibchen befruchtete 0,5 mm große Eier auf dem Futterbrei ab, dauert es ca. 22-24 h bei 25 °C, bis die L1 Larve schlüpft. Das L1 Stadium dauert einen Tag. Dann häutet sich die Larve und das L2-Larvenstadium beginnt. Nach weiteren 24 h häutet sich die Larve abermals und das letzte Larvenstadium (L3) beginnt. Nach ca. 2-3 Tagen besitzt die Larve eine Größe von ca. 5 mm und kriecht aus dem Futterbrei heraus um sich am Rand des Röhrchens zu verpuppen. Die Metamorphose der Larve zur Imago dauert drei Tage. Hierbei erfolgt eine komplette Umwandlung der vorhandenen larvalen zu adulten Strukturen. Schlüpfen an Tag 9 die adulten Fliegen sind die Weibchen noch nicht geschlechtsreif (siehe 2.1.3). Die Dauer der Entwicklung von Embryo zur Imago ist neben der Aufzuchttemperatur noch von anderen Parametern beeinflussbar. So sind außerdem die Wahl und Feuchtigkeit des Futters, die Populationsdichte im Gefäß und der Genotyp der Fliegen von großer Wichtigkeit und sollten bei der Aufzucht berücksichtigt werden.

Geschlechtsbestimmung

Männchen und Weibchen können anhand mehrerer Merkmale unterschieden werden. So sind die Weibchen meist etwas größer als die Männchen. Eine exaktere Unterscheidung der beiden Geschlechter kann jedoch über den Geschlechtsapparat des Männchens erfolgen. Dieser ist stark chitinisiert. Ein weiteres Merkmal zur Unterscheidung ist die starke Pigmentierung des männlichen Abdomens. Außerdem besitzt das Männchen am Basitarsus des ersten Beines den sogenannten Geschlechtskamm. Hiermit wird das Weibchen während der Kopulation festgehalten.

2.1.2 Verwendete Fliegenstämme

Alle verwendeten Fliegenstämme wurden im Institut für Genetik der Universität Mainz gehalten. Verbreiterte und viel genutzte Stämme wurden bei 25 °C, die Stammsammlung bei 18 °C aufbewahrt. Für eine Auflistung aller verwendeten Fliegenstämme siehe Tab. 2.1.

Tab. 2.1: Fliegenstämme

Überordnung	Bezeichnung	Genotyp	Herkunft/Referenz
Injektionsstamm			
	pUAST attP40	y[1]v[1]P{y[+t7.7]=nos- phiC31\int.NLS}X; P{y[+t7.7]=CaryP}attP40	Bloomington
Stamm zur Rückkreuzung			
	White-	w/w ;;;	Bloomington
Gal4 Stämme			
	enGal4	w;P(Gal4 w)en/P(Gal4 w)en	A. Brand
	InscuteableGal4 (InscGal4)	insc-Gal4, UAS- CD8::GFP/CyO	C. Berger
UAS Stämme			
	UAScas	; UAScas/UAScas	A. Jüngling
	UAScasDel1	; UAScasDel1/UAScasDel1	A. Jüngling
	UAScasDel2	; UAScasDel2/UAScasDel2	A. Jüngling
	UAScasDel3	; UAScasDel3/UAScasDel3	A. Jüngling
	UAScasNTDel1	; UAScasNTDel1 /UAScasNTDel1	A. Jüngling
	UAScasNTDel2	; UAScasNTDel2 /UAScasNTDel2	A. Jüngling
	UAScasNTDel3	; UAScasNTDel3 /UAScasNTDel3	A. Jüngling
	UAScasNTDel1.1	; UAScasNTDel1.1 /UAScasNTDel1.1	A. Jüngling
	UAScasNTDel1.3	; UAScasNTDel1.3 /UAScasNTDel1.3	A. Jüngling
	UAScasNTDel1.4	; UAScasNTDel1.4 /UAScasNTDel1.4	A. Jüngling
	UAScasNTDel1.5	; UAScasNTDel1.5 /UAScasNTDel1.5	A. Jüngling
	UAScasDelZipcode	; UAScasDelZipcode/ UAScasDelZipcode	A. Jüngling
	UAScasAtZipcode	; UAScasAtZipcode/ UAScasAtZipcode	A. Jüngling
	1kbcasCDS+GFP	; 1kbcasCDS+GFP/ 1kbcasCDS+GFP	N. Zimmer
	CasCG-1	; CasCG-1/ CasCG-1	N. Zimmer
	CasCG-2	; CasCG-2/ CasCG-2	N. Zimmer
RNAi			
	dImp	KK107199	Vienna RNAi Stock Center
	Mbl	KK105486	Vienna RNAi Stock Center

2.1.3 Gewinnung von Jungfrauen

Zur gezielten Kreuzung zweier Fliegenstämme müssen jungfräuliche Weibchen gewonnen werden. Diese erhält man durch das Absammeln junger Weibchen vor dem ersten Geschlechtskontakt zum Männchen. Hierfür werden zuerst alle geschlüpften Fliegen aus dem Zuchtröhrchen entfernt. Anschließend werden alle 4-6 h die nachgeschlüpften Fliegen aus dem Zuchtgefäß abgesammelt und Weibchen von Männchen getrennt. Bis zu 8 h nach dem Schlüpfen können die Weibchen als jungfräulich betrachtet werden, da bis zu diesem Zeitpunkt ihr Abdomen noch nicht ausgehärtet ist und sie nicht zur Kopulation fähig sind. Jungfräuliche Weibchen sind meist sehr hell, groß und tragen das Meconium (verdautes Larvengewebe) als sichtbaren dunklen Fleck auf der ventralen Seite ihres Abdomens. Benötigt man viele Jungfrauen und erstreckt sich das Absammeln derselben über einen längeren Zeitraum, sollten die bereits gesammelten Jungfrauen bis zur Kreuzung bei 18 °C gehalten werden.

2.1.4 Kreuzungen

Bei der Verkreuzung zweier Fliegenstämme ist neben der Anzahl der Fliegen pro Zuchtgefäß auch auf das Verhältnis Weibchen zu Männchen zu achten. Drei Weibchen pro Männchen sind ein guter Maßstab für eine erfolgreiche Kreuzung. Die gesammelten Jungfrauen sollten vor der Kreuzung noch einmal auf ihr Geschlecht und ihre Jungfräulichkeit untersucht werden. Hierbei ist zu prüfen, ob sich in dem Sammelgefäß Larven befinden. Ist dies der Fall, müssen alle Weibchen dieses Gefäßes entsorgt werden. Die Kreuzung sollte in einem vorgewärmten Zuchtgefäß durchgeführt werden. Um die Fliegen zur Paarung anzuregen wurden dem Futterbrei ein paar Körner Trockenhefe zugesetzt. Diese Anfütterung sollte ca. zwei Tage gehalten werden. Dann wurde die Kreuzung auf Ablageröhrchen umgeschüttelt und mit dem Sammeln der Eiablage begonnen.

2.1.5 Eiablagen

Die Eiablagen der Fliegen wurden von mit Apfelsaftagar befüllten Röhrchen gesammelt. Zur Herstellung dieser Ablageröhrchen wurden 28 g Agar mit 1 l Apfelsaft gemischt und in der Mikrowelle aufgekocht, bis der Agar vollständig gelöst war. Dann konnte der heiße Apfelsaftagar ca. 0,5 cm hoch in die Ablageröhrchen gegossen werden. Nach Aushärtung wurden die Röhrchen mit luftdurchlässigen Stopfen versehen und bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

2.1.6 UAS-Gal4 System

In dieser Arbeit wurde das von Brand und Perrimon 1993 entwickelte UAS-Gal4 System verwendet (Brand und Perrimon, 1993). Es erlaubt die gezielte Genexpression in Zellen oder Geweben. Hierfür wird das aus der Hefe stammende Gen Gal4 genutzt. Gal4 bindet spezifisch an eine **Upstream Activating Sequenz (UAS)** und aktiviert downstream gelegene Gene. Es kann nun ein Gen downstream der UAS in das Genom eingebracht werden, z.B. durch das phi31 System (siehe 2.3). Das eingebrachte Gen wird im Muster des Gal4 Stammes exprimiert und es ist möglich die Auswirkung dieser ektopischen Expression in

Zellen oder ganzen Geweben zu untersuchen. Der Treiberstamm enthält die gewebsspezifische Gal4 Expression und der Trägerstamm das Gen von Interesse unter der Kontrolle der UAS. Um ein bestimmtes Gen nun in einem spezifischen Gewebe zu exprimieren, müssen nur die beiden Fliegenstämme miteinander gekreuzt werden (siehe Abb. 2.1).

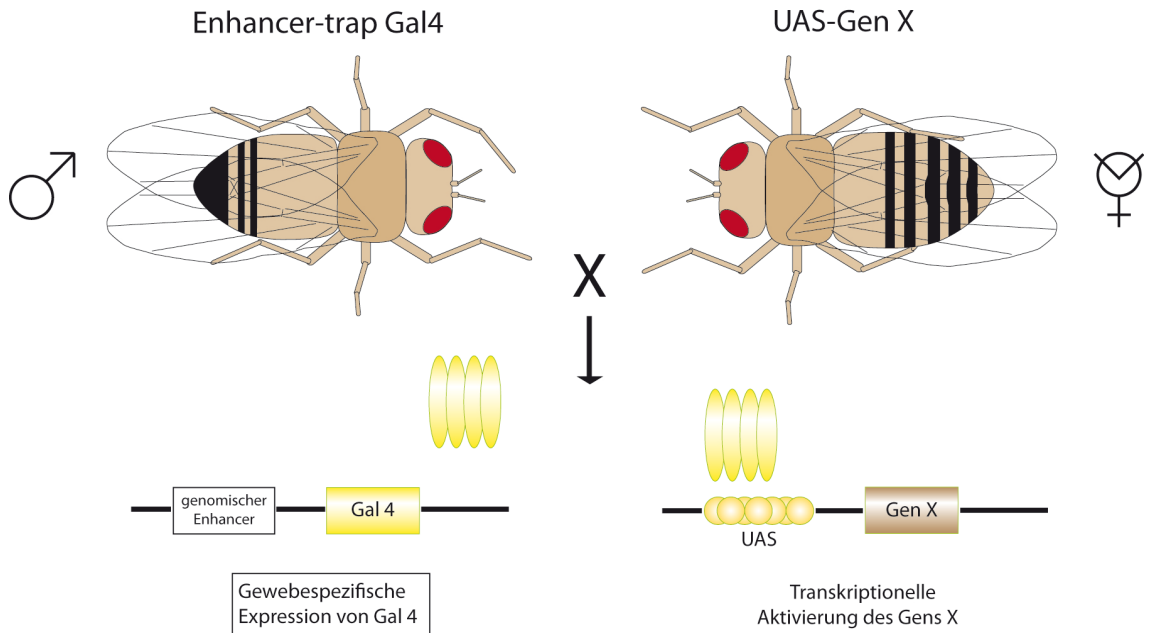


Abb. 2.1: UAS-Gal4 System. UAS: Upstream Activating Sequence. Das UAS-Gal4 System besteht aus zwei Komponenten, welche bei der Verkreuzung zweier Fliegenstämme aktiv werden. Der genomische Enhancer im Fliegenstamm Enhancer-trap Gal4 aktiviert die gewebsspezifische Expression des eingebrachten Gens Gal4. Dieses bindet an die dem Zielgen (Gen X) vorgelagerte UAS und sorgt für dessen transkriptionelle Aktivierung. (Abb. geändert nach Brand und Perrimon, 1993).

2.1.7 RNAi System

Bei dem RNA Interference (RNAi) System handelt es sich um einen natürlichen Mechanismus, welcher der Ausschaltung spezifischer Gene dient (Fire *et al.*, 1998). Er kommt z.B. bei der Virusabwehr oder der Regulation der Genexpression zum Einsatz (Haasnoot *et al.*, 2007; Kurreck J, 2009). Der RNAi Mechanismus wird in drei Abschnitte eingeteilt. Anfangs wird doppelsträngige RNA durch ein Ribonuklease Enzym (z.B. Dicer) in kurze RNA Fragmente zerlegt. Anschließend spalten sich diese Fragmente in ihre Einzelstränge auf und der Leitstrang wird von dem **RNA-induced silencing complex (RISC-Enzymkomplex)** aufgenommen. Im letzten Schritt bindet der Leitstrang samt RISC Komplex an eine zu ihm komplementäre mRNA und blockiert oder degradiert diese. Dies führt zu der zielgerichteten Abschaltung des Gens (Siomi H und Siomi MC, 2009). In dieser Arbeit wurde die RNAi zum Gen-Knockdown verschiedener RNA-bindender Proteine genutzt. Der hierfür benötigte Treiberstamm und die RNAi Trägerstämme wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von C. Berger und J.-Y. Roignant (bezogen über das Vienna RNAi Stock Center). Genutzt wurde das UAS-Gal4 System (siehe 2.1.6).

2.2 Molekularbiologische Arbeiten

2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Fliegenlarven

Zur Isolierung genomischer DNA wurden 30-40 L3-Wanderlarven benötigt. Diese wurden in einem Schälchen mit Wasser von allen Breiresten befreit, ohne Wasser in ein Eppendorfgefäß überführt und für mindestens 30 min bei -80 °C eingefroren. Anschließend wurden die Larven in 200 µl Puffer A mit einem autoklavierten Stößel homogenisiert. Nach der Zugabe von weiteren 200 µl Puffer A wurden die homogenisierten Larven bei 65 °C für 30 min inkubiert. Nach der Zugabe von 800 µl LiCl/KAc-Lösung und der zehninütigen Inkubation auf Eis erfolgte eine dreißigminütige Zentrifugation. Alle folgenden Zentrifugationsschritte wurden bei Raumtemperatur (RT) und 14.000 Umdrehungen pro Minute (rounds per minute, rpm) durchgeführt. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, 600 µl Isopropanol zugegeben, gemischt und für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 500 µl 70 % EtOH gewaschen und für 10 min zentrifugiert. Nach erneutem Verwerfen des Überstands, das DNA-Pellet trocknen lassen. Abschließend wurde das Pellet in 100 µl TE-Puffer gelöst und nach der Konzentrationsbestimmung bei -20 °C gelagert.

2.2.2 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von den Firmen Sigma Aldrich oder biomers bezogen. Die Schmelztemperatur („salt adjusted“) wurde mit der Software „Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator“ (Kibbe, 2007) berechnet. Es wurde des Weiteren verwendet um die designten Primer auf mögliche Haarnadelformationen und potenzielle Self-Annealing Sequenzen zu testen.

Sequenzierprimer

Die in der folgenden Tabelle aufgelisteten Primer wurden in dieser Arbeit als Sequenzierprimer eingesetzt.

Tab. 2.2: Sequenzierprimer

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Firma	T _m (°C)
Cas_nes 2	CGTAGTTGTAGTCCCAATAG	biomers	56,4
Cas_nes 3	GAGTGAGCAGAGCAAGAG	biomers	56,3
Cas_nes 3'exon I fwd	GCTGTTGTCTGGGGTCCATCCGCTG	biomers	74
Cas_nes 4	GACTCCGAGATCGTGAAC	biomers	56,3
Cas_nes 5	CCACCAGCCTTAGTCAATC	biomers	57,5
Cas_nes2.5 fwd	GGCCAGTTTGCCGGCTCC	biomers	66,1
Cas3' ZinkF XbaI	TTTTCTAGACTACTTAAACTGCTGGTACGCCTG	biomers	71,3
Cas3'start NdeI	TTTCATATGCTTCAGTACCTCCTCGTTCTG	biomers	69,2
Cas3UTR5primeNotI	CCCGCGGCCGCGAAGGATGCGTGTCTTAGGG	biomers	82,8
Cas5'ATHookNdeI	TTTCATATGCAGGCGTACCAGCAGTTTAAG	biomers	69,2
Cas5'start XhoI	TTTCTCGAGGAAAAGTGTGCCACAAAATGTCC	biomers	71,3
Cas5'ZinkFXhoI	TTTCTCGAGATGAGAACGAGGAGGTACTGAAG	biomers	73,7
P1 Hsp70-nested/ P1-Hsp70-PCR	CCAGCAACCAAGTAAATCAACTG	biomers	60,9
P2-Hsp70-nested	CAACTACTGAAATCTGCCAAGAAG	biomers	62
P3-SV40UTR	TAAATCTCTGTAGGTAGTTGTCC	biomers	60,3

PCR-Primer

Die in der folgenden Tabelle aufgelisteten Primer wurden in dieser Arbeit als PCR-Primer eingesetzt.

Tab. 2.3: PCR-Primer

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Verwendung	Firma	T _m (°C)
CasCDSSV40frwd	GCTTTAAGCCAGAGTTTA AGGAGTAGGGATCTTTGT GAAGGAACCTTACTTC	UAScas	biomers	80,4
SV40UTRamprev	CATTGATGAGTTTGGACA AACCACAACCTAGAATGCA GTGAAAAAATGC	UAScas	biomers	77,3
Cas5'startXhoI	TTTCTCGAGGAAAGTGTG CCACAAAAATGTCC	UAScasDel1	biomers	71,3
Cas3'startNdeI	TTTCATATGCTTCAGTAC CTCCTCGTTCTG	UAScasDel1	biomers	69,2
Cas5'ZinkFXhoI	TTTCTCGAGATGCAGAAC GAGGAGGTACTGAAG	UAScasDel2	biomers	73,7
Cas3' ZinkFXbaI	TTTTCTAGACTACTTAAA CTGCTGGTACGCCTG	UAScasDel2	biomers	71,3
Cas5'AT- HookNdeI	TTTCATATGCAGGCGTAC CAGCAGTTTAAG	UAScasDel3	biomers	69,2
Cas3'AT- HookXbaI	TTTTCTAGATTCCTACTCC TTAAACTCTGGC	UAScasDel3	biomers	68,4
casN-TermDel 3'Anker	CTCGTTCACGATCTCGGA GTC	UAScasNTDel1/ UAScasNTDel2/ UAScasNTDel3	Sigma	63,2
casN-TermDel1	TTCGTGAAAGTGTGCCAC AAAAATGCCCAACAGCCA CCCCAGCAACCTGG	UAScasNTDel1	Sigma	84,6
casN-TermDel2	CGCTACAGCGGCAACTCCT TCCACTGATAAGCCGCTG TCCAGCCTCACCA	UAScasNTDel2	Sigma	87,1
casN-TermDel3	GTCCGCCGACGACGATGA GGACGATCAGAACGAGGA GGTACTGAAGAACC	UAScasNTDel3	Sigma	86,3
Cas15'loops	GTGACCTGTTCCGAGTGA TTAGCG	UAScasNTDel1.1 /UAScasNTDel1. 3	biomers	66,9
CasDelNT1.1rev	GCTTGTGCGTTCTTGTCTT GCGGAGCATTTTTGTGGC ACACTTTCACG	UAScasNTDel1.1	Sigma	82,3
CasDelNT1.3rev	GAGGGTGCTGGTGTGGCT GCCTGCGTCAGCGGCGGCA GGC	UAScasNTDel1.3	Sigma	89,2
P1-Hsp 70-nested	CCAGCAACCAAGTAAATC AACTG	UAScasNTDel1.4 /UAScasNTDel1. 5	biomers	60,9

CasDelNT1.4rev	CATGCTGGGTGAGTCTAG GCTCTTCTCTCTCTCGATG GGCGTGGAG	UAScasNTDel1.4	Sigma	85,3
CasDelNT1.5rev	GGTTCTTCAGTACCTCCTC GTTCTGGTCGGTGGTTGA CTCCAGCGGATGG	UAScasNTDel1.5	Sigma	86,3
Cas_nes2	CGTAGTTGTAGTCCCAAT AG	UAScasDelzip/ UAScasAtZipcode	biomers	56,4
Cas_ZipcodeDel	GGGATATTGTTTGGGTGCG GTTGGAGCGGCTGCTTGA CGGGCGTATACAT	UAScasDelzip	Sigma	84,7
AlterZipcode_Prot _correct_rev	CGGAGTGTGGGGGTCAG ATCACTGTCGACCGGAGT GATCAGACCATACGATGA ATCGGC	UAScasAtZipcode	Sigma	88,6
MP1kbcas+ GFPfwd	GAGCGTGTACGGCGGCGG CGTCATGTCCAACCAAAT GGAGTTTATTATGC	1kbcasCDS+GFP	Sigma	84,6
MP1kbcas+ GFPprev	GGCCAGCGGCCTGGATGC TCTGCTCAGCATGAAGCA GCACGACTTCTTCA	1kbcasCDS+GFP	Sigma	87,1
ReplCG4854fwd1	CCAAAGCCTGCCGCCGCTG ACGCAGCGATAAAATCAA ACGCTGCACAG	CasCG-1	Sigma	85,6
ReplCG4854rev1	GATGAGCAGGAGACGAAG AAGAAAAGCAGCCACACC AGCACCTCCGCCG	CasCG-1	Sigma	87,1
ReplCG4854frw2	CCAAAGCCTGCCGCCGCTG ACGCAGAATCAAGAGACC TGTCCAAGAATG	CasCG-2	Sigma	85,5
ReplCG4854rev2	CAAACCGGTAACCTTTGA AGACGAGGCAGCCACACC AGCACCTCCGCCG	CasCG-2	Sigma	87,1
cas vir exon1 fwd	AACAGTTTGAGCTGCGCA GCC	Sonde <i>D. virilis</i>	Sigma	63,2
cas vir exon1 rev T7	TAATACGACTCACTATAG GGAGACCACTTAGAGAAC TTACCATGCTGGGCG	Sonde <i>D. virilis</i>	Sigma	82,1
Cas Intron 5prime alt	GCTGTTGTGGGCGTCCA TCCGCT	Intronsonde <i>D. melanogaster</i>	Sigma	72,2
Cas Intron rev SP6	ATTTAGGTGACACTATAG AAGAGCTGCAGTGGGAAA AAGAGG	Intronsonde <i>D. melanogaster</i>	Sigma	77

2.2.3 PCR

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR, „polymerase chain reaction“) vervielfältigt den definierten Teil eines DNA-Stranges. Zwei dem Template komplementäre Oligonukleotide (Primer) binden am Anfang und am Ende des zu vervielfältigenden Abschnitts (Template), legen so den Startpunkt der DNA-Synthese fest und stellen gleichzeitig der benötigten DNA-Polymerase ein freies 3' OH-Ende zur Verfügung. Die PCR wird in drei Schritte

eingeteilt: die Denaturierung (Teilung des DNA-Doppelstranges in Einzelstränge), die Primerhybridisierung (die Primer binden an ihre komplementäre DNA-Sequenz) und die Elongation (Synthese des komplementären Stranges). Für die Elongation benötigt die Polymerase die vier DNA-Nukleotide dATP, dTTP, dCTP und dGTP (dNTPs), welche dem PCR-Gemisch zugesetzt werden müssen.

Standard PCR

In dieser Arbeit wurden die KAPAHiFi™ Polymerase von Peqlab (KAPAHiFi™ PCR Kit) und die Taq PCR Polymerase von Qiagen (Taq PCR Master Mix Kit) verwendet. Die Schritte Denaturierung – Elongation wurden mit 30 Wiederholungen durchgeführt.

Tab. 2.4: Reaktionsprotokoll für einen 100 µl PCR-Ansatz mit der Taq PCR Polymerase (Qiagen)

Komponenten	Finale Konzentration
10x PCR Puffer	1x
dNTP Mix (10mM pro dNTP)	200 µM pro dNTP
Primer A	0,1-0,5 µM
Primer B	0,1-0,5 µM
Taq DNA Polymerase	2,5 Einheiten/Reaktion
Template DNA	≤ 1 µg/Reaktion
dd H ₂ O	-

Tab. 2.5: Thermocycler Konditionen für einen PCR-Ansatz mit der Taq PCR Polymerase (Qiagen)

PCR Schritte	Zeit (min)	Temperatur (°C)
Initiale Denaturierung	3	94
Denaturierung	0,5-1	94
Primerhybridisierung	0,5-1	50-68
Elongation	1	72
Terminale Elongation	10	72

Restriktion Free Cloning

Restriktionsfreies Klonieren (Restriction Free (RF) Cloning) ist eine Methode zur Herstellung spezifischer DNA-Plasmide ohne die Notwendigkeit von Restriktionsenzymen oder homologen Rekombinationsstellen. Ein DNA-Fragment kann hierbei durch zwei aufeinanderfolgende PCRs an eine beliebige Stelle innerhalb eines zirkulären Plasmids eingebracht werden (Van Den Ent und Löwe, 2006). Für die erste PCR werden zwei Primer benötigt, welche komplementäre Sequenzen zum Plasmid und der einzubringenden Sequenz enthalten. Bei der Herstellung dieser Primer sollten 50 Bp als Orientierung dienen und diese Länge nicht zu stark unter- oder überschritten werden. Während der ersten PCR dient die Sequenz als Template, welche in das Plasmid eingebracht werden soll. Hierbei wird der Megaprimer amplifiziert, welcher in der zweiten PCR zum Einsatz kommt. Der Megaprimer wird vor dem Einsatz anhand einer Gelelektrophorese überprüft und mittels PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Während der zweiten PCR dient das zirkuläre Plasmid als Template. Die komplementären Sequenzen des Megaprimers

binden an das Template, welches daraufhin gänzlich in beide Richtungen amplifiziert wird. Es entsteht ein zirkuläres Plasmid, in welchem die in der ersten PCR amplifizierten Sequenzen enthalten sind. Anschließend wird mithilfe des Restriktionsenzym DpnI das parentale Plasmid degradiert. DpnI baut spezifisch methylierte DNA ab und entfernt daher alle DNA-Moleküle bakterieller Abstammung. Die zurückbleibenden Plasmide werden für eine Transformation, beschrieben in 2.2.11, genutzt. Hierbei werden die durch die Synthetisierung des Komplementärstranges während der zweiten PCR entstandenen Einzelstrangbrüche, durch ein endogenes Reparatursystem, geschlossen.

Tab. 2.6: Reaktionsprotokoll für einen 50 µl PCR-Ansatz mit der KAPAHiFi™ DNA Polymerase (Peqlab)

Komponenten	Finale Konzentration
5x KAPAHiFi™ Fidelity oder GC Puffer	1x
dNTP Mix (10mM pro dNTP)	0,3 mM
Primer A (10 µM)	0,3 µM
Primer B (10 µM)	0,3 µM
KAPAHiFi™ DNA Polymerase (1 u/µl)	0,02 u/µl
Template DNA	≤ 5 ng Plasmid-DNA
dd H ₂ O	-

Tab. 2.7: Thermocycler Konditionen für einen 50 µl PCR-Ansatz mit der KAPAHiFi™ DNA Polymerase (Peqlab)

PCR Schritte	Zeit (min)	Temperatur (°C)
Initiale Denaturierung	2-5	95
Denaturierung	20 s	98
Primerhybridisierung	15 s	T _m +/- 10°C
Elongation	30 s/kb	72
Terminale Elongation	1-5	72

2.2.4 PCR Aufreinigung

Zur Aufreinigung von PCR Produkten wurde das GenElute PCR Clean-Up Kit von Sigma-Aldrich oder das QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen verwendet. Es wurde nach Protokoll verfahren. Die Eluierung der DNA erfolgte in 50 µl vorgewärmten Eluationspuffer oder ddH₂O.

2.2.5 Ethanolfällung

Die nukleinsäurehaltige Lösung wurde mit 1/10 2M NaCl und 2,5 Vol 100 % Ethanol gemischt, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 40 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 100 µl 70 % EtOH gewaschen und weitere 10 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgezogen und das Pellet getrocknet wurde, konnte es in 20 µl ddH₂O gelöst werden. Die Konzentration wurde mit der Nanodrop (Thermo Scientific) bestimmt. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 14.000 rpm und 4 °C durchgeführt.

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

In dieser Arbeit wurden horizontal laufende 0,7%ige Agarosegele verwendet. Zur Herstellung eines 50 ml-Gelansatzes wurden 0,35 g Agarose abgewogen und in 50 ml 1x TAE Puffer gelöst. Hierfür musste der Ansatz in der Mikrowelle so lange erhitzt werden, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Nach ein paar Minuten der Abkühlung konnte der Agarose/Puffer Mix mit 20 µl Ethidiumbromid versetzt und in den vorbereiteten Schlitten der Gelelektrophoresekammer gegossen werden. Nach einer Trocknungszeit von ca. 30 min war das Gel einsatzbereit und konnte mit der gewünschten DNA-Menge beladen werden. Hierfür wurde je nach Konzentration 1–5 µl eines PCR Ansatzes oder 5–20 µl einer Restriktion eingesetzt. Zur sichtbaren Kontrolle der Laufgeschwindigkeit wurde die DNA-Probe mit entsprechender Menge eines 6x LoadingDye versetzt. Der LoadingDye sollte im fertigen Ansatz einfach vorliegen. Wurde zur Restriktion ein Fast Digest (FD) Enzym verwendet, so enthielt der FD-Buffer green bereits einen Farbstoff, welcher bei der Gelelektrophorese als LoadingDye verwendet werden konnte. Nach Fertigstellung der Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert.

2.2.7 Gelextraktion

Zur Aufreinigung von nukleinsäurehaltigen Gelelektrophoresebanden wurde das Gen Elute Gel Extraction Kit von Sigma Aldrich oder das QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen verwendet. Es wurde nach Protokoll verfahren. Die Eluation der DNA erfolgte in 50 µl vorgewärmten Eluationspuffer oder ddH₂O.

2.2.8 Restriktion

Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme stammen von den Herstellern BioLabs oder Fermentas/Thermo Scientific. Der Restriktionsansatz mit entsprechendem Puffer wurde nach der Empfehlung des Herstellers angesetzt. Empfohlen wurde der Verdau von 1 µg DNA mit 5-10 Einheiten (units (u)) des Restriktionsenzym in einem 20 µl Ansatz für 1-16 h (Thermo Scientific). Die Reaktionstemperatur ist abhängig vom verwendeten Restriktionsenzym.

Tab. 2.8: Restriktionsenzyme

Bezeichnung	Erkennungssequenz	Puffer	Hersteller
BamHI	5'...GGATCC...3' 3'...CCTAGG...5'	BamHI Unique Buffer	Fermentas/Thermo Scientific
BglII	5'...AGATCT...3' 3'...TCTAGA...5'	Orange Buffer	Fermentas/Thermo Scientific
BsiWI	5'...CGTACG...3' 3'...GCATGC...5'	NEB Buffer 4	New England BioLabs
DpnI	5'...Gm6ATC...3' 3'...CTm6AG...5'	Tango Buffer	Fermentas/Thermo Scientific
FD BamHI	5'...GGATCC...3' 3'...CCTAGG...5'	FD Buffer green	Fermentas/Thermo Scientific

FD BglII	5'...AGATCT...3' 3'...TCTAGA...5'	FD Buffer green	Fermentas/Thermo Scientific
FD BsiWI	5'...CGTACG...3' 3'...GCATGC...5'	FD Buffer green	Fermentas/Thermo Scientific
FD DpnI	5'...Gm6ATC...3' 3'...CTm6AG...5'	FD Buffer green	Fermentas/Thermo Scientific
FD EcoRV	5'...CTGCAG...3' 3'...GACGTC...5'	FD Buffer green	Fermentas/Thermo Scientific
FD EcoRI	5'...GAATTC...3' 3'...CTTAAG...5'	FD Buffer green	Fermentas/Thermo Scientific
FD HindIII	5'...AAGCTT...3' 3'...TTCGAA...5'	FD Buffer green	Fermentas/Thermo Scientific
FD MfeI	5'...CAATTG...3' 3'...GTAAAC...5'	FD Buffer green	Fermentas/Thermo Scientific
FD NdeI	5'...CATATG...3' 3'...GTATAC...5'	FD Buffer green	Fermentas/Thermo Scientific
FD NotI	5'...GCGGCCGC...3' 3'...CGCCGGCG...5'	FD Buffer green	Fermentas/Thermo Scientific
FD Sall	5'...GTCGAC...3' 3'...CAGCTG...5'	FD Buffer green	Fermentas/Thermo Scientific
FD SmaI	5'...CCCGGG...3' 3'...GGGCCC...5'	FD Buffer green	Fermentas/Thermo Scientific
FD XbaI	5'...TCTAGA...3' 3'...AGATCT...5'	FD Buffer green	Fermentas/Thermo Scientific
FD XhoI	5'...CTCGAG...3' 3'...GAGCTC...5'	FD Buffer green	Fermentas/Thermo Scientific
MfeI	5'...CAATTG...3' 3'...GTAAAC...5'	NEB Buffer 4	New England BioLabs
NcoI	5'...CCATGG...3' 3'...GGTACC...5'	Tango Y Buffer	Fermentas/Thermo Scientific
NotI	5'...GCGGCCGC...3' 3'...CGCCGGCG...5'	Tango Y Buffer	Fermentas/Thermo Scientific

2.2.9 Ligation

In dieser Arbeit wurde die T4 DNA-Ligase von Thermo Scientific verwendet. Der Ligationsansatz mit entsprechendem Puffer wurde nach der Empfehlung des Herstellers angesetzt. Empfohlen wurde die Insertion der Ziel-DNA-Sequenz in einen linearisierten Vektor (20-100 ng) mit 1 u der T4 DNA-Ligase in einem 20 µl Ansatz für 10 min bei 22 °C (1:1 bis 1:5 Verhältnis Insert:Vektor).

2.2.10 Herstellung chemisch kompetenter DH5α-Bakterien

An Tag 1 wurden 100 µl chemisch kompetenter DH5α *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien auf einer LB-Agarplatte ohne Antibiotikum ausgestrichen. Diese wurde über Nacht (üN) bei 37 °C inkubiert. An Tag 2 wurden 50 ml SOB-Medium + 250 µl 2M MgCl₂ mit einer Kolonie des Ausstriches angeimpft und üN bei ca. 200 rpm und 37 °C geschüttelt. Zwei weitere Kolben mit jeweils 50 ml SOB wurden üN bei 37 °C angewärmt. An Tag 3 wurden jeweils 250 µl 2M MgCl₂ zu den beiden vorgewärmten 50 ml SOB-Kolben gegeben und diese anschließend mit je 1 ml der DH5α Kultur angeimpft. Parallel wurden 30 ml RF1-

und 8 ml RF2-Puffer auf Eis aufgetaut. Die optische Dichte (OD) der angeimpften DH5 α -Kulturen wird bei der optischen Dichte (OD) 600 gemessen. Hatten die Kulturen eine OD von 0,6 erreicht wurden sie in sterile vorgekühlte 50 ml Falcons umgefüllt und 10-15 min auf Eis gekühlt. Darauf folgend wurden beide Kulturen bei 3000 rpm für 15 min und 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgezogen. Die Bakterienpellets wurden anschließend in jeweils 15 ml RF1-Puffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 3000 rpm und 4 °C und ein Abziehen des Überstands. Die Bakterienpellets wurden mit jeweils 4 ml RF2-Puffer resuspendiert und 10-15 min auf Eis inkubiert. Abschließend wurden je 100 μ l Bakteriensuspension in vorgekühlte Eppendorfcaps aliquotiert, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.11 Transformation kompetenter Bakterien

Als Transformation wird das Einbringen freier Fremd-DNA in kompetente Bakterienzellen bezeichnet. In dieser Arbeit wurde die Transformation mit chemisch kompetenten Bakterien via Hitzeschock durchgeführt.

Transformation chemisch kompetenter DH5 α

In dieser Arbeit wurde der chemisch kompetente *E. coli* Stamm DH5 α verwendet. Dieser lagerte in 100 μ l Aliquots bei -80 °C und wurde vor Verwendung auf Eis aufgetaut. Abhängig von der DNA-Konzentration der verwendeten Plasmidpräparation oder des PCR Produktes wurde 1-5 μ l zu den Bakterien hinzupipettiert und diese 20-30 min auf Eis inkubiert. Darauf folgte ein zweiminütiger Hitzeschock bei 42 °C und die anschließende Zugabe von 200 μ l vorgewärmten SOC-Medium. Nach 60 min Inkubationszeit bei 37 °C wurden die Bakterien auf mit entsprechendem Antibiotikum versetzten Agarplatten, ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C gelagert.

Selektion transformierter DH5 α

Die verwendeten Vektoren tragen neben einer Multiple Cloning Site (MCS) und der Origin of Replication (ORI) eine Antibiotikaresistenz. Diese ermöglicht die Selektion erfolgreich transformierter Bakterien. Nach der Transformation werden die Bakterien auf mit Antibiotika versetzten Agarplatten ausgestrichen. Dadurch können selektiv nur die Bakterien wachsen, welche eine Kopie des transformierten Vektors aufgenommen haben. Alle anderen Bakterien sterben ab. Für eine Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren siehe Tab. 2.9.

Tab. 2.9: Vektoren

Bezeichnung	Resistenz	Verwendung	Herkunft
pUAST attB	Ampicillin	Generierung transgener Fliegenstämme	Johannes Bischof
Cas3 im pDrive Vektor	Ampicillin, Kanamycin	Generierung cas Sonde	Institutsintern (AG Urban)
pUAST-CG4854	Ampicillin	Generierung Konstrukte UAScasCG-1 und UAScasCG-2	Institutsintern

2.2.12 Ansetzen einer Flüssigkultur

Transformierte Bakterienkolonien wurden bis zu ihrer Verwendung auf 4 °C gelagert. Um eine erfolgreich transformierte Bakterienkolonie zu vermehren, wurde von dieser eine Flüssigkultur angesetzt. Dafür wird mit Antibiotikum versetztes LB-Medium genutzt. Je nach Nutzungsabsicht (Mini- oder Midiplasmidpräparation) wurden 3 bis 100 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum auf 37 °C erwärmt und unter sterilen Bedingungen jeder Ansatz mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft. Die Ansätze werden üN bei 37 °C auf dem Schüttler gelagert.

2.2.13 Plasmidpräparation

Über Nacht vermehrten sich die transformierten Bakterien. Am nächsten Morgen wurde die DNA aus den Bakterien isoliert. Hierfür wurden von verschiedenen Firmen standardisierte Kits entwickelt.

Mini

Zur Gewinnung von Plasmiden aus 3 ml Flüssigkulturansätzen wurde das GenElute™ Plasmid Miniprep Kit von Sigma-Aldrich oder das QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen verwendet. Es wurde nach Protokoll verfahren. Die Eluation der DNA erfolgte in 50 µl vorgewärmten Eluationspuffer oder ddH₂O.

Midi

Zur Gewinnung von Plasmiden aus 100 ml Flüssigkulturansätzen wurde das QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit von Qiagen verwendet. Es wurde nach Protokoll verfahren. Die Eluation der DNA erfolgte in 500 µl vorgewärmten Eluationspuffer oder ddH₂O.

2.2.14 Konzentrationsbestimmung

Alle Konzentrationsmessungen wurden mit der Nanodrop von Thermo Scientific durchgeführt. Als Blindprobe wurde die Lösung benutzt, in welcher die Probe gelöst wurde. Anschließend wurde mit 1 µl der Probe die DNA-Konzentration gemessen.

2.2.15 Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden nach dem Sanger-Verfahren von der Firma StarSEQ® GmbH durchgeführt. Es wurde der U-mix Service genutzt. In einen Gesamtansatz von 7 µl wurden 400-700 ng Plasmid-DNA und 10 pmol Sequenzierprimer zusammen mit entsprechendem Volumen ddH₂O pipettiert. Für eine Auflistung der verwendeten Sequenzierprimer siehe Tab. 2.2.

2.3 Generierung transgener Fliegen mit dem phi31 System

Das phi31 System basiert auf der Serinintegrase PhiC31 aus einer Bakteriophage. Diese vermittelt die zielgerichtete sequenzspezifische Rekombination zwischen zwei „attachment sites“; der „bacterial attachment site“ (attB), lokalisiert im Genom von *Streptomyces ambofaciens* und der „phage attachment site“ (attP), lokalisiert auf der

Bakteriophage. Die Integration der Erbinformation des Virus in das Bakterium wird vermittelt durch eine 3 Bp lange Crossover Region, welche beide „sites“ besitzen (Thorpe *et al.*, 2000). Durch die beiden „attachment sites“ und der zielgerichteten Reaktion der PhiC31-Integrase ist der Integrationsort genau festgelegt. Weitere Cofaktoren sind für eine stabile Rekombination nicht nötig (Thorpe und Smith, 1998). Das System wurde erfolgreich auf andere Species übertragen und wird bereits seit längerem In-vitro in menschlichen und Mäusezellen genutzt. Außerdem wurde die Integrase auch In-vivo in Mäusen zum Einsatz gebracht (Olivares *et al.*, 2002; Thyagarajan *et al.*, 2001). Seit 2004 wurde diese Liste an Nutzungsmöglichkeiten um den Modellorganismus *D. melanogaster* erweitert (Groth *et al.*, 2004). Groth *et al.* verwendeten das System erfolgreich in *Drosophila* S2 Zellkulturzellen und Embryonen. Zusätzlich generierten sie zwei stabile *Drosophila* Linien mit im Genom liegender attP Sequenz als Integrationszielort. Ein separates Plasmid enthält die attB „site“ und die gewünschte Sequenz, welche ins Genom eingebracht werden soll. Injiziert man das Plasmid zusammen mit der phiC31 Integrase in einen Embryo der stabilen attP Linie, resultiert dies in der Erzeugung transgener Nachkommen. Die Technik wurde in den folgenden Jahren durch den Einbau der Integrase als endogene Quelle im Fliegen-genom weiterentwickelt. Hierbei steht die Integrase unter der Kontrolle regulatorischer Elemente wie z.B. des *vasa* oder *nanos* Gens, welche für die keimbahn-spezifische Expression sorgen (Bischof *et al.*, 2007). Viele weitere attP Linien mit verschiedensten Integrationsorten sind gewerblich zu erhalten. Es wurden Fliegenlinien gewählt, welche die „attachment site“ am gewünschten Integrationsort besitzt. Dies bietet die Möglichkeit, bei Nutzung der gleichen Fliegenlinien, die Auswirkungen mehrerer Konstrukte miteinander vergleichen zu können.

2.3.1 Chemische Dechorionisierung von Embryonen

Die Embryonen werden von zwei Schutzhüllen umgeben, dem Chorion und der Vitellinmembran. Vor der Injektion muss erstere entfernt werden. Hierfür wurde 13%ige Chlorbleichlauge 1:1 mit Wasser verdünnt und die Embryonen in den Ablageröhrchen ca. 1 cm überschichtet. Nach zweiminütiger Einwirkzeit wurde die Chlorbleichlauge samt Embryonen in ein Falconnetz gespült. Die Ablageröhrchen wurden mit Wasser ausgespült und nochmals in das Netz geleert. Dann wurden die Embryonen vorsichtig mit Wasser aus einer Spritzflasche abgespült. Nach mehrmaligem Eintauchen in ein Wassergefäß wurden das Falconnetz und die darin befindlichen Embryonen vorsichtig mit einem Papier von unten getrocknet.

2.3.2 Injektionslösung

Die Injektionslösung sollte am Tag der Injektion vorbereitet werden. Hierbei ist es besonders wichtig, dass die DNA in ddH₂O gelöst wurde. Der Injektionsansatz (10 µl) besteht aus 2500 ng des DNA-Plasmids, 1 µl des 10x Injektionspuffers und die entsprechende Menge ddH₂O. Versetzt mit einer Spatelspitze Patentblau, wird der Ansatz 30 min bei 13.000 rpm auf RT zentrifugiert und anschließend 8 µl dieser Lösung in ein neues Eppi überführt. Hierdurch werden die entstandenen Schwebstoffe durch das Patentblau verworfen und die Gefahr die Injektionskapillare zu verstopfen wird verringert.

2.3.3 Injektionskapillare

Für die Injektion wurden die Kapillaren GB100TF-8P von Science Products verwendet. Das Programm des Sutter Pullers musste während dieser Arbeit aufgrund eines Defektes am Heizfilament neu angepasst werden. Anfangs wurde das Programm 55 verwendet (Pressure 250, Heat 503, Time 200, Pull 108 und Veloc. 80). Dann wurde zum Programm 66 gewechselt (Pressure 250, Heat 560, Time 200, Pull 108 und Veloc. 80). Das Anschleifen der Injektionskapillare wurde am Gerätetyp 462 von Bachofer Laboratoriumsgeräte durchgeführt. Die Kapillare wurde auf den Schleifstein aufgesetzt und ca. 2-5 s dort belassen, bis das Wasser ca. 1,5–2 cm eingezogen war. Anschließend wurde mit aufgezogener Spritze und Plastikschauch Luft durch die Kapillare in ein Wasserschälchen geleitet, um anhand der Bläschenbildung die Größe der Kapillarenöffnung feststellen zu können.

2.3.4 Mikroinjektion

Nach der Dechorionisierung (siehe 2.3.1) wurde das Falconnetz auseinander geschraubt und die Embryonen nochmals von unten getrocknet. Anschließend wurden sie mit einem feinen Pinsel von dem Netz aufgesammelt und ein Teil der Embryonen auf einen Aufreihblock überführt. Bei dem Aufreihblock handelt es sich um einen 1 x 1 cm großen, mit Patentblau angefärbten Agarblock, auf welchem die weißen Embryonen gut zu erkennen sind. Die Embryonen wurden hierauf mit einer Präpariernadel so angeordnet, dass sie mit ihrem posterioren Ende in eine Richtung lagen. Hierbei wurden fehlentwickelte Embryonen aussortiert. Anschließend wurden die Embryonen auf ein mit Heptankleber bestrichenes Deckglas überführt, indem man dieses leicht auf die Embryonen auflegte und kurz andrückte. Das mit den Embryonen behaftete Deckglas wurde dann mit den Embryonen nach oben und mithilfe von etwas Wasser auf einen Objektträger geklebt, um sie zu trocknen. Die Trocknungszeit der Embryonen lag zwischen acht und neun Minuten und wurde im Exsikator (Duran group) durchgeführt. Anschließend wurden die Embryonen für den Injektionsprozess mit 10S Voltaef Öl überschichtet. Es wurde darauf geachtet, dass immer mehr als eine Kapillare zur Injektion vorbereitet war. Verwendet wurde die Injektionsmaschine FemtoJet von Eppendorf. Die Injektion erfolgte bei 18 °C. Um für eine luftblasenfreie Kapillare zu sorgen, wurde diese nach Befüllen mit der DNA-Lösung mit der Spitze nach unten mittels Knetmasse an einer vertikalen Oberfläche befestigt. Anschließend konnte die Kapillare in die Injektionsvorrichtung eingespannt und fokussiert werden. Die mit Voltaef Öl überschichteten Embryonen wurden mit dem posterioren Ende zur Kapillare hin eingespannt und ebenfalls fokussiert. Die Injektion sollte mittig ins posteriore Ende gesetzt werden und kann durch die Blaufärbung des posterioren Pols des Embryos kontrolliert werden. Nach Abschluss der Injektion wurde das Deckglas mit den Embryonen in ein Wägeschälchen überführt und mit 3S Voltaef Öl überschichtet. Anschließend wurden die Schälchen wiederum in eine feuchte Kammer (mit nassem Papier ausgelegte Petrischale) gelegt und bei 25 °C bis zum Schlüpfen der L1 Larven aufbewahrt. Schlüpfen 24 h später die L1 Larven werden diese in kleine Absammelröhrchen, befüllt mit Futterbrei (Formula 4-24 von Carolina Biological), überführt. Es wurden 30–40 Larven pro Röhrchen gesammelt. Anschließend wurde zur Anfütterung etwas inaktive Trockenhefe zum Futterbrei gegeben und die Larven konnten sich bei 25 °C bis zur Imago entwickeln.

Aufreihblöcke

Zur Herstellung der Aufreihblöcke wurden 200 ml Wasser mit ca. 6,5 g Agar und einer Spatelspitze Patentblau in der Mikrowelle aufgeköcht und ca. 0,5 cm hoch in kleine Petrischalen gegossen. Nachdem sie abgekühlt waren, wurden die Petrischalen bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt. Kurz vor der Nutzung wurde ein rechteckiges Gitter in den Agar geschnitten und jeweils 1 Rechteck zur Aufreihung der Embryonen genutzt.

Heptandeckgläser

Zur Herstellung der Heptandeckgläser wurde mit der schmalen Seite eines Objektträgers in den Heptankleber eingetaucht und mit dieser Kante ca. $\frac{3}{4}$ eines Deckglases bestrichen. Eine ausreichende Menge an beschichteten Deckgläschen wurde hergestellt und bis zur Nutzung in einer großen Petrischale aufbewahrt.

Absammelröhrchen

Die Absammelröhrchen inklusive Stopfen wurden einen Tag vor der Injektion üN bei -80 °C eingefroren um eventuell vorhandene Bakterien abzutöten. Außerdem wurden jeweils ein Gefäß mit Futterflocken und eins mit Trockenhefe üN tiefgefroren. Kurz vor dem Schlüpfen der L1 Larven wurden die Absammelröhrchen ca. 0,5 cm hoch mit Futterbrei gefüllt und mit Chloramphenicol-Leitungswasser (51 µg/ml Chloramp.) überschichtet.

2.3.5 Kreuzungen zur Gewinnung homozygot transgener Fliegen

Nach ca. 10 Tagen schlüpfen aus den injizierten Embryonen die rotäugigen Imago. Um festzustellen, ob die Injektion der Konstrukte in einer Keimbahntransformation resultiert hat, müssen die männlichen Imago mit einer zweiten Fliegenlinie verkreuzt werden. Hierfür wurden jungfräuliche *white* (*w*-) Fliegen genutzt. *W* ist auf dem X-Chromosom lokalisiert, von welchem weibliche Fliegen zwei, männliche Fliegen hingegen nur eine Kopie besitzen. Anhand der F1 Generation, aus der Kreuzung der injizierten Imago und den jungfräulichen *w*-Fliegen, kann festgestellt werden, ob eine Keimbahntransformation stattgefunden hat. Die männlichen Nachkommen dieser Kreuzung erhalten ihr X-Chromosom von den *w*-Weibchen und ihr Y-Chromosom von den injizierten Männchen. Fand eine Keimbahntransformation statt, resultiert dies in orangefarbenen Augen der Männchen, da das injizierte Konstrukt eine Kopie des *white* Gens als Marker trägt. Diese Kopie übernimmt die natürliche Genfunktion und aufgrund der Dosisabhängigkeit der Augenfarbe entstehen orangefarbene Augen. Nachkommen der Kreuzung bei denen keine Keimbahntransformation stattgefunden hat besitzen weiße bzw. rote Augen. Bei dieser ersten Kreuzung sollte darauf geachtet werden, die aus der Injektion stammenden männlichen Fliegen, einzeln mit den *w*-Weibchen zu verkreuzen, um jedem Männchen die Möglichkeit der Reproduktion zu geben. Zur Auskreuzung der auf dem X-Chromosom liegenden Integrase werden die orangeäugigen Männchen ein weiteres Mal mit jungfräulichen *w*-Fliegen gekreuzt. Die aus dieser Kreuzung schlüpfenden orangeäugigen Männchen und orangeäugigen jungfräulichen Weibchen können nun durch Selbststellung zur Homozygotisierung genutzt werden. Die homozygoten Fliegen besitzen eine rote Augenfarbe (siehe Abb. 2.2).

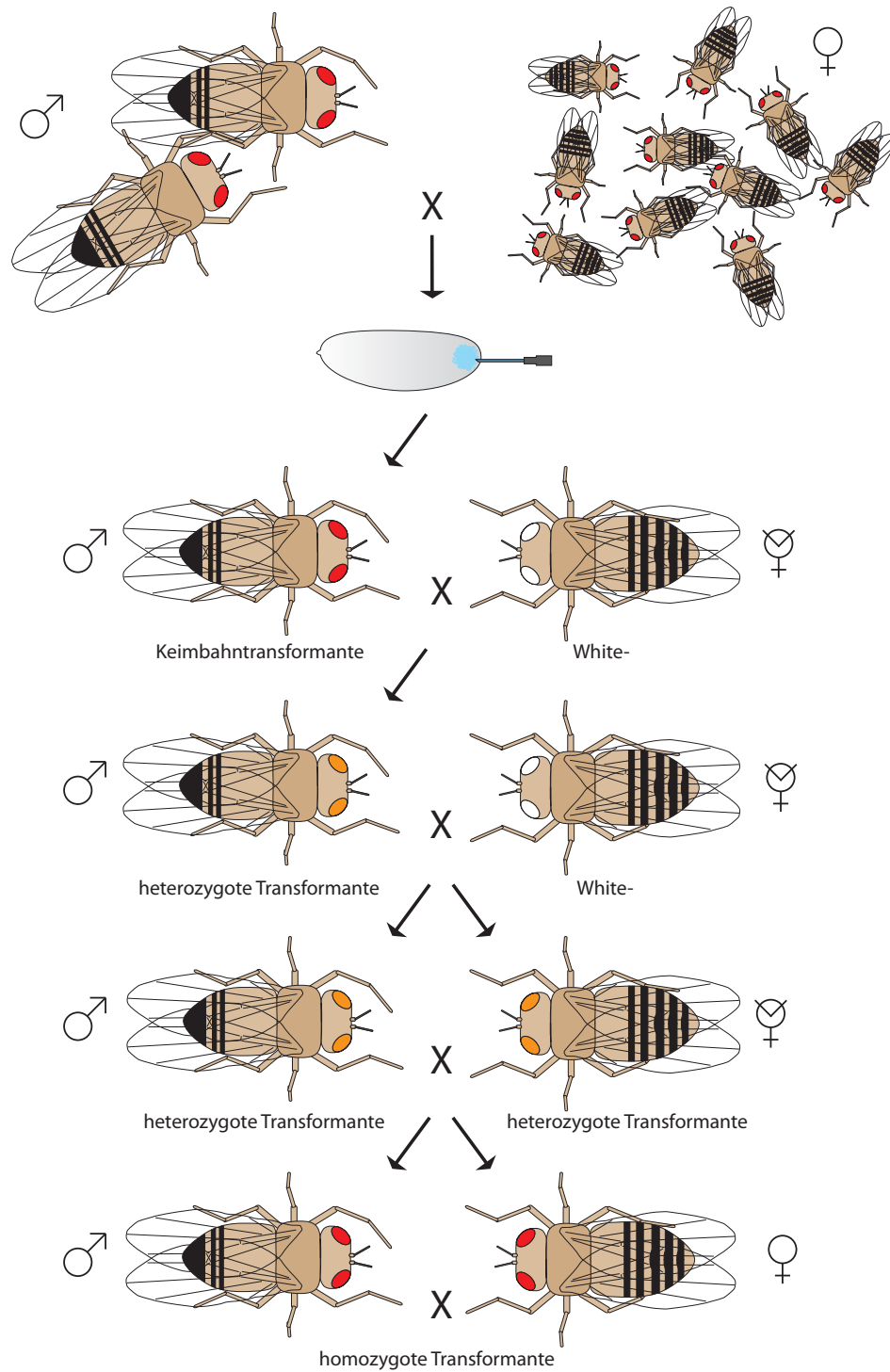


Abb. 2.2: Kreuzung zur Gewinnung homozygot transgener Fliegen. Zum Erhalt möglichst zahlreicher Eiablagen werden viele Weibchen mit ein paar Männchen des attP Fliegenstammes verkreuzt. In die Ablage wird anschließend das gewünschte Plasmid injiziert und die Fliegen können sich zu Imago entwickeln. Zum Nachweis einer Keimbahntransformation werden die männlichen Fliegen einzeln mit jungfräulichen w-Weibchen verkreuzt. Hat eine Keimbahntransformation stattgefunden, besitzen die Nachkommen orangefarbene Augen. Durch weitere Kreuzungen wird zuerst die Integrase herausgekreuzt und anschließend ein homozygot transformanter Fliegenstamm erzeugt. Abbildung abgeändert durch Jüngling, mit freundlicher Genehmigung von Oliver Birkholz.

2.4 Immunhistochemie

In dieser Arbeit wurden fluoreszente In-situ Hybridisierungen und Antikörperfärbungen an *Drosophila* Embryonen und larvalen Gehirnen durchgeführt. Sie sind im Folgenden beschrieben.

2.4.1 Sondenherstellung

In dieser Arbeit wurde eine anti - Digoxigenin (Dig) gekoppelte RNA-Sonde gegen *cas* verwendet. Zur Herstellung wurde auf das Konstrukt Cas3 im pDrive Vektor zurückgegriffen (laborintern hergestellt durch Kathrin Fischer). Die Herstellung der Sonde wird im Folgenden beschrieben.

Sondenherstellung mithilfe eines Restriktionsverdau

Drei μg des Vektors Cas3 im pDrive wurden nach Herstellerangaben mit dem FD-Enzym Hind III in einem 40 μl Ansatz verdaut. Anschließend erfolgte eine nach Kapitel 2.2.5 durchgeführte Ethanol-fällung. Nach der Trocknung des DNA-Pellets erfolgte die Lösung in 20 μl DEPC- H_2O . Die Vollständigkeit der Restriktion und die Größe der Bande wurden anhand eines Gels überprüft. Der In-vitro Transkriptionsansatz wurde wie folgt hergestellt.

Tab. 2.10: In-vitro Transkriptionsansatz (20 μl) zur Herstellung einer RNA-Sonde mit der T7 Polymerase

Komponenten	Eingesetzte Menge
gefällte Restriktion	14 μl
10x Transkriptionspuffer	2 μl
Dig Labeling Mix	2 μl
T7 Polymerase	2 μl
RNAse Inhibitor	1 μl

Nach der Inkubation für 2 Stunden bei 37 °C erfolgte die Zugabe von 2 μl DNase I für einen Zeitraum von 15 min bei 37 °C. Um die Reaktion abzustoppen, wurden dem Ansatz anschließend 2 μl 0,2 M EDTA-DEPC zugegeben und es erfolgte eine weitere Ethanol-fällung üN. Nach der Trocknung des RNA-Pellets wurde dieses in 50 μl Hybridisierungslösung gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Sondenherstellung mithilfe einer PCR

Zur Herstellung der *cas* Intronsonde wurde die Amplifikation des In-vitro Transkriptionstemplates per PCR bevorzugt. Hierfür wurde ein Reverseprimer mit angehängter Polymerasesequenz amplifiziert und die PCR wie folgt durchgeführt.

Tab. 2.11: Reaktionsprotokoll zur Sondenherstellung für einen 100 μl PCR-Ansatz mit der Taq PCR Polymerase (Qiagen)

Komponenten	Eingesetzte Menge
10x advanced Puffer	10 μl
dNTP Mix (2mM dNTP)	4 μl
Primer A	4 μl

Primer B	4 μ l
Taq DNA Polymerase	1 μ l
Cas1 im pUAST attB	1 μ g
dd H ₂ O	-

Für die Thermocyclerkonditionen zur Sondenherstellung mit der Taq PCR Polymerase (Qiagen) siehe Tab. 2.5. Anschließend erfolgte eine PCR-Aufreinigung nach Kapitel 2.2.4 und die Eluierung in 30 μ l ddH₂O. Nach der Konzentrationsmessung wurden 500 ng für die In-vitro Transkription eingesetzt und nach dem oben beschriebenen Protokoll weiter verfahren.

2.4.2 Fluoreszente In-situ Hybridisierung

Die In-situ Hybridisierung dient dem Nachweis von Nukleinsäuren (RNA oder DNA) in Geweben. In dieser Arbeit wurde vornehmlich die fluoreszente In-situ Hybridisierung (FISH) genutzt. Die Herstellung der verwendeten DIG-gekoppelten *cas* RNA-Sonde wird in Kapitel 2.4.1 beschrieben. Zur Verstärkung der Färbung wurde das TSA Kit von PerkinElmer verwendet.

Embryonen

Als Vorbereitung auf die fluoreszente In-situ Hybridisierung mussten die Embryonen der μ N-Ablage zuerst chemisch dechorionisiert werden (siehe 2.3.1). Die Embryonen wurden anschließend möglichst ohne überschüssiges Wasser in die Fixierungslösung überführt. Diese setzt sich zusammen aus 450 μ l PBS, 50 μ l 37 % Formaldehyd und 500 μ l Heptan für wildtypische Embryonen (350 μ l PBS, 150 μ l 37 % Formaldehyd und 500 μ l Heptan für Mutanten). In dieser wurden die Embryonen für 25 min auf dem Schüttler fixiert. Anschließend wurden die Embryonen von ihrer zweiten Hülle, der Vitellinmembran befreit. Hierfür mussten die Embryonen in der Fixierungslösung absinken. Dann wurde die untere Phase des Gemisches abgezogen und durch 500 μ l Methanol ersetzt. Dieser Ansatz wurde für eine Minute kräftig gevortext. Durch die entstehenden Scherkräfte löst sich die Vitellinmembran vom Embryo. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt, um anschließend beide Phasen des Gemisches abzuziehen und durch Methanol zu ersetzen. Die Embryonen wurden mehrmals mit Methanol gewaschen und abschließend in diesem bei -20 °C bis zum Gebrauch gelagert. Alle im Anschluss genutzten Lösungen wurden mit DEPC-H₂O angesetzt. Zur Vorbehandlung der Embryonen wurden diese in MeOH/H₂O₂ (900 μ l/100 μ l) für 20 min gewaschen. Im Anschluss folgten mehrere Spül- und Waschschrte mit PBTween und die Überführung in die Hybridisierungslösung (Hyb.-lsg.). Hierfür wurde zuerst für 10 min mit PBTween/Hyb.-lsg. bei RT gewaschen. Dann folgte die Inkubation mit Hyb.-lsg. für ebenfalls 10 min bei RT. Die Embryonen wurden anschließend für 2 h bei 55 °C in der Prähybridisierungslösung (990 μ l Hyb.-lsg. + 10 μ l ssDNA, 100 °C) unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss folgte die Inkubation mit der Hybridisierungslösung inklusive der Sonde (495 μ l Hyb.-sol. + 5 μ l ssDNA + 0,5 μ l Sonde, 100 °C) für ca. 16 h bei 55 °C. Am Tag 2 wurde die Hyb.-lsg. samt Sonde abpipettiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Embryonen wurden anschließend für 30 bzw. 20 min bei 65 °C gewaschen (Hyb.-lsg., Hyb.-lsg./PBTween 1:1, PBTween). Nach einem weiteren Waschschrte (10 min) mit PBTween bei RT wurde mit TNB (500 μ l) geblockt. Diesem wurde nach 30 min das anti-DIG-POD Fab-Fragment zugesetzt (1 μ l/500

µl) und der Ansatz für 2 h auf dem Schüttler inkubiert. Es folgten mehrere Spül- und Waschschriffe mit PBTween und 2x 5 min mit TNT, bevor die Embryonen für max. 10 min in Tyramide Cy3/Cy5 (1:50 in Amplification diluent) inkubiert wurden. Nachdem dieses in mehreren Spül- und Waschschriffen mit TNT heruntergespült wurde, folgte die Kontrolle unter dem Fluoreszenzmikroskop. Schließt sich der In-situ Hybridisierung keine Antikörperfärbung an, folgt eine üN-Inkubation mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol/Propidiumiodid (DAPI/PI) im Verhältnis 1:2000 in PBT und nach Waschen der Embryonen die Aufbewahrung derselben in 70 % Glycerol/PBS bei 4 °C. Schließt sich eine Antikörperfärbung an siehe 2.4.4.

Larven

Als Vorbereitung auf die fluoreszente In-situ Hybridisierung der larvalen Gehirne wurden ca. 20 Larven aus den Zuchtgefäßen abgesammelt und in eine mit Wasser gefüllte Porzellanschale überführt. Nach mehrmaligem Waschen der Larven wurden ca. 4-5 Larven zusammen auf einen Objektträger überführt und das Gehirn freigelegt. Hierfür wurden die Larven mit zwei Pinzetten in der Hälfte geteilt und Darm und Fettgewebe entfernt; nur Mundwerkzeuge, Gehirn und ein Teil des Darms sollten zusammenbleiben, um ein späteres Absinken im Eppi zu gewährleisten. Anschließend wurden die Präparate in eisgekühlten 0,1 M Natriumphosphatpuffer überführt. Je nach Mengenbedarf an Gehirnen wurde diese Präparation mehrfach durchgeführt. Die Präparation der Gehirne sollte jedoch nicht länger als 30 min dauern. Nach abgeschlossener Präparation wurde der Puffer durch 400 µl PLP ersetzt und die Fixierung für 1 h bei RT auf dem Schüttler durchgeführt. Anschließend wurde das PLP abgezogen und die Gehirne 3x 5 min mit PBT gewaschen. Es folgten 2x 5 min Waschen mit PBTween und eine 20-minütige Inkubation in PBTween/37 % Formaldehyd (1000/140). Nach weiteren Waschschriffen (3x 10 min PBTween) begann die Überführung in die Hybridisierungsphase. Hierfür wurde zuerst 5 min in PBTween/Hyb B (1:1) gewaschen und dann 5 min in reiner Hyb B. In der Zwischenzeit wurde die Hyb A Lösung 5 min auf 100 °C erhitzt und zum schnellen Abkühlen direkt auf Eis überführt. Diese Hyb A Lösung wurde anschließend zur Prähybridisierung für 2-4 h bei 65 °C auf die Gehirne gegeben. Anschließend erfolgte die eigentliche Hybridisierung mit der Sonde üN bei ebenfalls 65 °C. Hierfür wurde die Hyb A samt Sonde (500:1) für 5 min aufgekocht, zum Abkühlen direkt auf Eis überführt und anschließend auf die Embryonen gegeben. An Tag 2 wurde die Sonde abpipettiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Larven wurden für jeweils 15 min mit auf 65 °C vorgewärmten Lösungen (Hyb B, Hyb B/2x SSC, 2x SSC) gewaschen. Anschließend folgten 2x 20 min mit 0,2x SSC bei 65 °C. Die Überführung in PBTween wurde ebenfalls schrittweise vorgenommen. Nach einem zehnminütigen Waschschriff mit 0,2x SSC/PBTween, wurden die Larven 10 min mit PBTween gewaschen. Bevor die Larven üN mit dem anti-DIG-POD Fab-Fragment (1:500 in TNB) inkubiert wurden, wurde 30 min mit TNB geblockt. An Tag 3 wurde der anti-DIG-POD verworfen und die Gehirne mehrmals mit PBTween gespült und gewaschen. Nach 2x 5 min waschen mit TNT wurden sie für max. 10 min in Tyramide Cy3 (bzw. Cy5) 1:50 in Amplification diluent inkubiert. Des Weiteren folgten mehrere Spül- und Waschschriffe mit TNT und die Überprüfung der Färbung am Fluoreszenzmikroskop. Wurde an die In-situ Hybridisierung keine Antikörperfärbung angeschlossen, folgten zwei weitere Waschschriffe mit PBS und die üN-Inkubation mit DAPI bzw. PI zur Anfärbung der im Zellkern vorliegenden DNA. Am nächsten Tag wurde der DNA-Interkalator mit PBT heruntergespült und die Gehirne bis

zur Präparation in 70 % Glycerol/PBS bei 4 °C aufbewahrt. Folgte eine Antikörperfärbung siehe 2.4.4.

2.4.3 Verwendete Antikörper

Tab. 2.12: Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verwendete Konzentration	Herkunft
Castor (Cas)	Hase	1:600	Ward Odenwald
GFP	Hase	1:250	Roche
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein at 27C (Hrb27C/Hrp48)	Hase	1:1000	Julie Aspen (Donald Rio Lab)
IGF-II mRNA-binding protein (dImp)	Hase	1:1000	Jan Christiansen
Lamin	Hase	1:2000	Ana Rogulja-Ortmann
Lamin	Maus	1:50	P. A. Fisher (Riemer <i>et al.</i> , 1995)
Muscleblind (Mbl)	Schaf	1:500	Darren Monckton
Squid (Sqd)	Maus	1:1000	Julie Aspen (Donald Rio Lab)
Syncrip (Syp)	Meerschwein	1:1000	Ilan Davis

Tab. 2.13: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verwendete Konzentration	Herkunft
Alexa 488	Hase	1:250	Invitrogen
Alexa 647	Hase	1:500	Invitrogen
Alexa 647	Maus	1:500	Invitrogen
Anti- Digoxigenin POD	Schaf	1:500	Roche
Cy5	Hase	1:250	Dianova/Jackson
Fitc	Meerschwein	1:250	Dianova/Jackson
Tyramid Cy5	Ziege	1:50	PerkinElmer
Tyramid Cy3	Ziege	1:50	PerkinElmer

Tab. 2.14: Nukleinsäureinterkalatoren

Antikörper	Verwendete Konzentration	Herkunft
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	≤ 1:2000	Vector Laboratories
Propidiumiodid (PI)	≤ 1:2000	Invitrogen

2.4.4 Fluoreszente Antikörperfärbung

Die Antikörperfärbung dient dem Nachweis von Proteinen in Geweben. In dieser Arbeit wurden fluoreszenzmarkierte Antikörper genutzt. Alle verwendeten Antikörper, deren Herkunft und verwendete Konzentrationen sind in 2.4.3 aufgeführt.

Embryonen

Folgt auf die In-situ Hybridisierung (siehe 2.4.2) eine Antikörperfärbung wurden die Embryonen nach der Überprüfung der In-situ Färbung am Fluoreszenzmikroskop mit PBT (0,3 % Triton) gewaschen (2x kurz, 1x 10 min). Anschließend folgte die Inkubation des primären Antikörpers in entsprechender Konzentration (siehe Tab 2.12) üN bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde der Antikörper abgezogen und bis zur Wiederverwendung bei 4 °C aufbewahrt. Nach mehreren Spül- und Waschschritten mit 0,5 % PBT wurden die Gehirne 2 h bei RT mit dem sekundären Antikörper (siehe Tab. 2.13) inkubiert. Dieser kann nicht wieder verwendet werden und wurde im Anschluss verworfen. Nach weiteren Spül- und Waschschritten mit 0,5 % PBT, 2x 10 min PBS und der Überprüfung der Antikörperfärbung am Fluoreszenzmikroskop folgte eine üN-Inkubation mit DAPI/PI. Am darauffolgenden Tag wurden die Embryonen gewaschen und in einem Gemisch aus 70 % Glycerol/PBS bis zur Präparation bei 4 °C gelagert.

Larven

An die In-situ Hybridisierung anschließend (siehe 2.4.2) wurde eine Antikörperfärbung durchgeführt. Hierfür wurden die Larvengehirne nach der Überprüfung der In-situ Färbung eine Stunde in 1 % Milchpulver-PBT-Lösung inkubiert. Um ein gutes Eindringen des Antikörpers in das Larvengehirn zu ermöglichen wurde die das Gehirn umgebende Membran mit einer Nadel perforiert. Darauf folgend wurden die Gehirne üN bei 4 °C mit entsprechendem Antikörper (siehe Tab. 2.12) in PBT inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Antikörper abgezogen und bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Nach mehreren Spül- und Waschschritten mit 0,5 % PBT wurden die Gehirne 2 h bei RT mit dem sekundären Antikörper (siehe Tab. 2.13) inkubiert. Nach weiteren Spül- und Waschschritten mit 0,5% PBT, 2x 10 min PBS und der Überprüfung der Antikörperfärbung am Fluoreszenzmikroskop folgte eine üN-Inkubation mit DAPI/PI. Am darauffolgenden Tag wurden die Larvengehirne gewaschen und in einem Gemisch aus 70 % Glycerol/PBS bis zur Präparation bei 4 °C gelagert.

2.4.5 Präparation der Embryonen

Unter dem Begriff „flatten“ versteht man das Öffnen und Freipräparieren des embryonalen ZNS. Dies ermöglicht das problemlose Scannen am konfokalen Mikroskop. Hierfür wurden Embryonen in 70 % Glycerol/PBS auf einen Objektträger überführt und unter dem Binokular platziert. Dann wurden die benötigten Stadien herausgesucht und die restlichen Embryonen verworfen. Stadien und Färbung wurden noch einmal am fluoreszenten Mikroskop überprüft und fehlerhafte Embryonen gegebenenfalls aussortiert. Mithilfe zweier Nadeln und unter Sichtkontakt wurde dann der Embryo geöffnet und bis auf die Epidermis und das vNS alle Gewebe entfernt. Anschließend wurden die Embryonen mit der ventralen Seite nach unten in einer Reihe angeordnet. Als Mounting Medium wurde 1:1 mit 70 % Glycerol verdünntes Vectashield verwendet. Es wurde ein dünner Streifen Vectashield unterhalb der angeordneten Embryonen auf den Objektträger aufgetragen und ein Deckglas aus Richtung der aufgereihten Embryonen auf das Vectashield aufgelegt. Dadurch konnte sich das Vectashield langsam unter dem Deckglas ausbreiten und die Embryonen bedecken, ohne dass diese verrutschten. Die Ecken des Deckglases wurden mit Nagellack fixiert und nach dessen Trocknung das Deckglas vollständig mit Nagellack umrandet.

2.4.6 Präparation der Larvengehirne

Um die Larvengehirne problemfrei am konfokalen Mikroskop scannen zu können, müssen alle an den Gehirnen verbliebenen Anhängsel (z.B. Imaginalscheiben, Darmreste) entfernt werden. Hierfür wurden bis zu 10 Larvengehirne in 70 % Glycerol/PBS auf einen Objektträger überführt und unter dem Binokular platziert. Mithilfe zweier Nadeln und unter Sichtkontakt konnten dann alle Anhängsel entfernt und verworfen werden. Anschließend wurden die Larvengehirne mit dem vNS nach oben in einer Reihe angeordnet, und als Platzhalter dienende Knete um die Gehirne platziert. Als Mounting Medium wurde 1:1 mit Glycerol verdünntes Vectashield verwendet. Dieses wurde um die angeordneten Gehirne aufgetragen. Dann wurde ein Deckglas auf die Knete aufgelegt und festgedrückt. Dadurch konnte sich das Vectashield langsam unter dem Deckglas ausbreiten und die Gehirne bedecken, ohne dass diese verrutschten. Die Ecken des Deckglases wurden mit Nagellack fixiert und nach dessen Trocknung das Deckglas vollständig mit Nagellack umrandet.

2.5 Dokumentation der Färbungen

Die Dokumentation der fluoreszierenden In-situ- und Antikörperfärbungen erfolgte mit dem Institutseigenen Leica TCS SP5 II Confocal oder dem Leica TCS SP2 Confocal Mikroskop.

2.6 Kits, Geräte, Chemikalien und Lösungen

Auflistungen aller in dieser Arbeit verwendeten Kits, Geräte, Chemikalien und Lösungen befinden sich im Anhang (siehe 7.3 und 7.4).

3 ERGEBNISSE

3.1 Die Kernrückhaltung der *cas* mRNA im Embryo

Einleitend zum Ergebnisteil dieser Arbeit soll noch einmal die Kernrückhaltung der *cas* mRNA im Embryo dargestellt werden. Zur Darstellung werden Daten aus Experimenten von Kathrin Fischer, die im Rahmen ihrer Diplomarbeit am Institut für Genetik, Uni Mainz 2009 generiert wurden, verwendet. Das Thema ihrer Arbeit war die Untersuchung der Lokalisation der *cas* mRNA sowie die Synthese und Lokalisation des Cas Proteins in verschiedenen Zellzyklusphasen ausgewählter Neuroblasten. Sie wählte hierfür die Neuroblasten 6-1 und 2-4, da diese anhand spezifischer Marker und ihrer Lage im Nervensystem leicht zu identifizieren sind. Die folgende Abbildung aus der Diplomarbeit von K. Fischer zeigt den NB 6-1. Er ist aufgrund seiner Lage im *engrailed*-Streifen und als erster *cas* exprimierender NB im ventralen NS einfach zu identifizieren (Cui und Doe, 1992; Mellerick *et al.*, 1992). Abb. 3.1 zeigt einen wildtypischen Stadium 10 Embryo. Neben der *cas* mRNA in-situ Hybridisierung (rot) und der Cas Antikörperfärbung (blau) wurde die Kernmembran mit dem Lektin Weizenkeim-Agglutinin (wheat germ agglutinin, WGA) gefärbt. Anfang St. 10 beginnt der NB 6-1 mit der *cas* mRNA-Synthese (A, A') und die *cas*-Transkripte lokalisieren in der gesamten Kernregion (B, B'). Cas Protein ist zu diesem Zeitpunkt nicht zu detektieren (A'', B''), was darauf hindeutet, dass nur eine sehr geringe Menge an *cas* mRNA den Kern verlässt. Wird die Kernmembran des Neuroblasten für die bevorstehende Zellteilung aufgelöst, verbleibt die *cas* mRNA weitestgehend im Bereich des vorherigen Zellkerns (C, C'). Der NB ist weiterhin Cas negativ (C''). Im weiteren Verlauf der Zellteilung wird die *cas* mRNA auf die beiden zukünftigen Tochterzellen aufgeteilt (D, D') und verbleibt auch bei wiederhergestellter Kernmembran im Cytoplasma (E, E'). Die Synthese des Cas Proteins ist jetzt nachweisbar (E''). Während im Kern die Neusynthese der *cas* mRNA beginnt (F, F'': weiße Pfeile), wird das Cas Protein im Kern angesammelt (F''). Auch während der neu gestarteten Syntheserunde der *cas* mRNA im NB 6-1 werden die Transkripte im Kern zurückgehalten und sammeln sich dort an (G-G'). In der GMZ 1 konnten keine Anzeichen einer *cas*-Transkription gefunden werden.

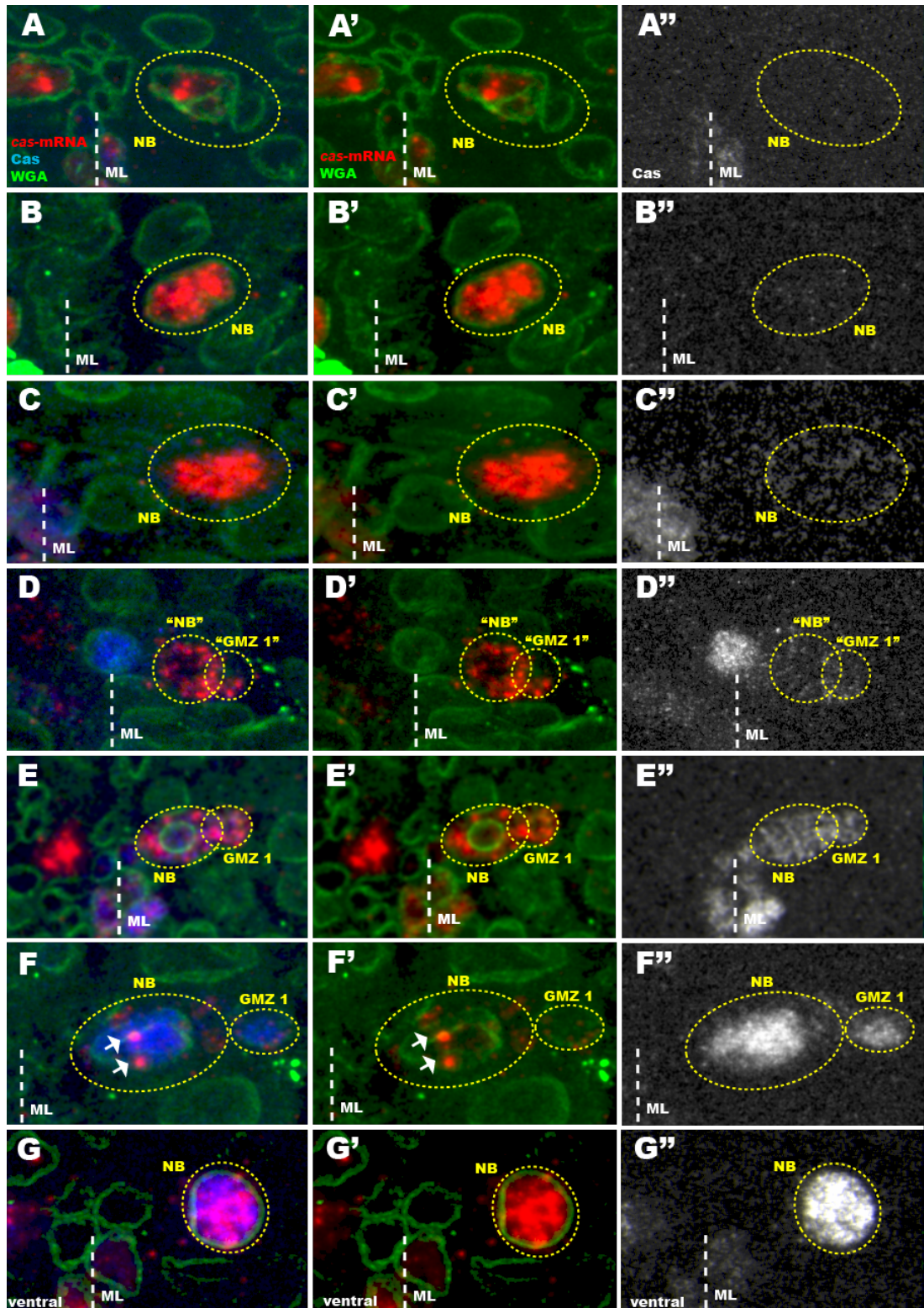


Abb. 3.1: Die Lokalisation der *cas* mRNA und des Cas Proteins vom Start der Transkription bis zur zweiten mRNA-Syntheserunde im NB 6-1. Wildtyp, embryonales St. 10, anterior oben, posterior unten, Bildausschnitte sind Maximalprojektionen ausgewählter Fokusebenen, *cas* mRNA in rot, Cas Protein in blau und WGA Färbung in grün dargestellt. ML: Mittellinie, NB: Neuroblast, GMZ 1: erste Ganglionmutterzelle, "NB"/"GMZ": zukünftige Tochterzellen. A-A'': NB 6-1 beginnt im frühen St. 10 mit der *cas*-Transkription. B-B'': Die *cas* mRNA-Transkripte werden im Kern zurückgehalten. C-C'': Trotz zellzyklusbedingt aufgelöster Kernmembran bleibt die *cas* mRNA im NB zentral lokalisiert. D-D'': Im Verlauf der Zellteilung wird die *cas* mRNA auf den NB und die neu gebildete GMZ 1 aufgeteilt. E-E'': Im NB und seiner GMZ ist die *cas* mRNA vorwiegend cytoplasmatisch lokalisiert. Das jetzt detektierbare Cas Protein ist diffus in der gesamten Zelle verteilt. F-F'': Das gebildete Cas Protein reichert sich im Zellkern an. Zeitgleich beginnt im NB die Neusynthese

der *cas* mRNA (weiße Pfeile). G-G'': Anreicherung der neu synthetisierten *cas* mRNA im Zellkern des NB, wo sich ebenfalls der Großteil des Cas Proteins befindet (Fischer, 2009).

3.2 Dokumentation der larvalen *cas* Expression

Laut Lecuyer *et al.*, 2007 wird *cas* vor allem in den Gehirnloben der Larve exprimiert (Lécuyer *et al.*, 2007). Eine genauere Beschreibung des larvalen Expressionsmusters von *cas* liegt jedoch nicht vor. Im Folgenden wurde die *cas*-Expression an den larvalen Stadien zwei und drei mithilfe fluoreszenter In-situ Hybridisierungen dokumentiert. Die Dokumentation der *cas*-Expression in der Larve bildet die Grundlage der späteren RNAi-Versuche (3.28 und 3.31/32). Aufgrund der Verwendung von InscGal4 als Treiber der RNAi-Konstrukte, ist die *cas*-Expression im larvalen St. 2 in InscGal4 Larven dargestellt (3.2). Die Darstellung der *cas*-Expression im larvalen St. 3 erfolgte in wildtypischen Larven (3.4).

3.2.1 Die Expression von *cas* im larvalen Stadium 2 (L2)

Abb. 3.2 zeigt die *cas*-Expression in Typ I Neuroblasten einer Inscuteable Gal4 L2-Larve. In der Übersichtsdarstellung (A und A') der linken Hirnhemisphäre sind deutlich die *cas* positiven Zellen zu erkennen. Bei A und A' handelt es sich um Maximalprojektionen, welche aus 7 Ebenen zusammengesetzt sind. Die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung ist in grün dargestellt. Des Weiteren wurde eine DAPI Färbung durchgeführt, welche in rot abgebildet ist. In Teilen der Hirnhemisphäre sind Zellen zu erkennen, in welchen sich die *cas* mRNA im Zellkern befindet. Des Weiteren sind auch Zellen zu erkennen, in welchen die *cas* mRNA-Färbung im Cytoplasma vorliegt. Der weiße Kreis kennzeichnet einen in der Teilung befindlichen NB mit im Cytoplasma vorhandener *cas* mRNA (A'). Vergleicht man den NB mit den umliegenden Zellen, so ist er durchschnittlich drei bis viermal so groß. An den NB anschließend liegt eine ebenfalls *cas* positive Zelle. Hierbei handelt es sich vermutlich um eine GMZ. Die Teilabb. B-B'' zeigen eine Einzelebene der in A' dargestellten Maximalprojektion. Teilabb. B zeigt die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, B' die DAPI Färbung und B'' die farbige Überlagerung der beiden Kanäle. In B'' ist der Neuroblast, welcher soeben eine Teilung vollzogen hat, durch eine weiße Umrandung gekennzeichnet. Bei der durch den Pfeilkopf gekennzeichneten Zelle handelt es sich vermutlich um eine GMZ, welche sich gerade vom NB abgeschnürt hat. Wie auch in dem benachbarten Neuroblasten befindet sich die *cas* mRNA im Cytoplasma der GMZ.

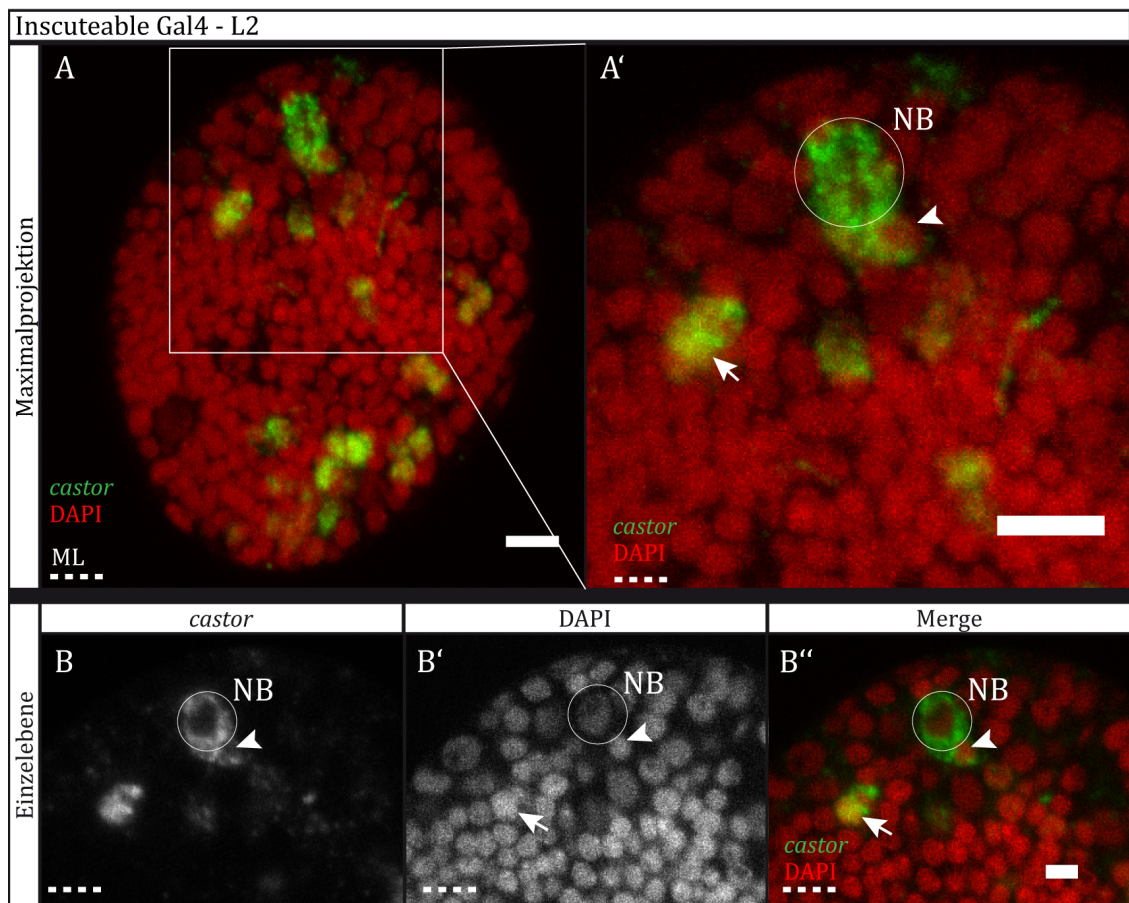


Abb. 3.2: InscGal4 L2-Larve, Typ I. Anterior links, posterior rechts, ML: Mittellinie, Maßstab: 20 μ m, Maximalprojektion zusammengesetzt aus 7 Ebenen, A-A': Maximalprojektion, A: Übersicht der linken Hirnhemisphäre, A': entspricht weiß umrandeten Bereich der Hemisphäre in A. NB: Neuroblast, gekennzeichnet durch weiße Umrandung. Pfeil: kernlokalisierte *cas* mRNA, Pfeilkopf: GMZ mit cytoplasmatischer *cas* mRNA. B-B'': Einzelebene, B: *cas* mRNA, B': DAPI, B'': Zusammengesetzte farbige Darstellung von B und B'. Zur besseren Orientierung wurde der Pfeilkopf auch in B' eingefügt. In B'' ist die cytoplasmatische *cas* mRNA gut zu erkennen. Der NB hat soeben eine Teilung vollzogen.

3.2.2 Die Expression von *cas* im larvalen Stadium 3

Im ZNS der L3-Wanderlarve zeigt die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung ein ähnliches Bild wie in der L2-Larve. Hervorzuheben ist jedoch der Größenunterschied des NS. Zentralgehirn und ventrales Nervensystem der L3-Larve haben im Vergleich zur L2-Larve deutlich an Umfang und Länge gewonnen. Des Weiteren wird nun deutlich, dass im Larvengehirn zwei Arten von Neuroblasten existieren. Typ I und Typ II Neuroblasten werden anhand ihrer Lage innerhalb der Gehirnhemisphäre und anhand der Anzahl ihrer Tochterzellen voneinander unterschieden. In Bezug auf die Anzahl der Nachkommenzellen gibt es fundamentale Unterschiede. Während die Typ I Neuroblasten eine stammzellartige Teilung vollziehen, in einen weiteren NB und eine GMZ, teilt sich der Typ II NB stammzellartig in einen weiteren NB und den sogenannten intermediären neuronalen Nachkommen (intermediate neural progenitor: INP). Nach einer gewissen Reifezeit teilt sich der INP stammzellartig in eine Tochter-INP und eine GMZ. Durch diese zusätzlichen intermediären neuronalen Nachkommenzellen generiert der Typ II NB einen erheblich größeren Zellstammbaum als der Typ I NB (Abb. 3.3). So besitzt der Typ I NB ca. $4 \pm 1,5$ teilungsaktive Zellen (GMZs) und generiert zwischen 100-150 Nachkommenzellen pro

Stammbaum. Der Typ II NB hingegen besitzt ca. 38 ± 8 teilungsaktive Zellen (INPs und GMZs) und generiert einen Zellstammbaum mit durchschnittlich 450 Nachkommenzellen (Bello *et al.*, 2008; Riebli *et al.*, 2013).

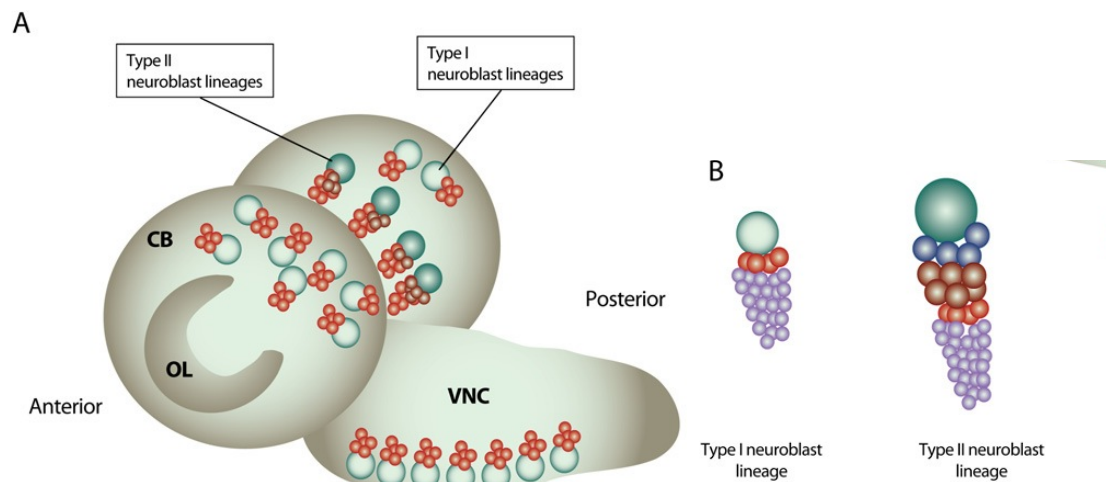


Abb. 3.3: Neurogenese im larvalen Gehirn von *Drosophila*. A: Das Gehirn der L3 *Drosophila* Larve besteht aus drei Regionen. Man unterscheidet die olfaktorische Region (OL: optic lobe), welche im lateralen Bereich der Hemisphäre liegt, das Zentralgehirn (CB: central brain), medial zum OL gelegen, und das ventrale Nervensystem (VNC: ventral nerve cord). B: Die Mehrzahl der Neuroblasten im Zentralgehirn und dem ventralen NS sind Typ I Neuroblasten. Der Typ I NB teilt sich stammzellartig in einen weiteren NB und eine GMZ, welche zwei Tochterzellen hervorbringt. Die Typ II Neuroblasten liegen an der medialen, posterioren Oberfläche der Gehirnhemisphären. Sie teilen sich stammzellartig in einen NB und eine intermediale neurale Nachkommenzelle, die sogenannte INP (intermediate neural progenitor). Diese teilt sich asymmetrisch in eine Tochter-INP und eine GMZ, welche wiederum zwei Tochterzellen hervorbringt (verändert nach Neumüller und Knoblich, 2009).

Die Abb. 3.4 zeigt den Bereich eines wildtypischen L3-Larvengehirns, in welchem sich die Typ I Neuroblasten befinden. Die durchgeführte *cas* mRNA in-situ Hybridisierung ist in rot, die Cas Antikörperfärbung in grün und die DAPI Färbung in blau dargestellt. In A und A' ist eine Maximalprojektion des Hemisphärenbereichs abgebildet. Diese besteht aus 25 Einzelebenen. Der NB unterscheidet sich von seinen Nachkommenzellen, welche ihm wie eine Traube anhängen, durch seine besondere Größe. Interessanterweise ist der NB zu diesem späten Entwicklungszeitpunkt immer *cas* mRNA und Cas Protein negativ. Dies ist ein wichtiger Unterschied zur gezeigten Situation in der L2-Larve, in welcher der NB noch *cas* exprimiert. Offenbar wechselt der Expressionszeitpunkt innerhalb des NB Stammbaums in der L3 Phase vom NB zur neu geborenen GMZ. Teilabb. A' entspricht dem weiß umrandeten Bereich in A. Hier lässt sich auch die traubenförmige Anordnung der Nachkommenzellen der Neuroblasten besonders gut erkennen. Meist sind es 1-3 *cas* positive Zellen (Pfeilkopf), welche in proximaler Nähe zum Neuroblasten liegen. Die markierte *cas* positive GMZ besitzt im Zellkern zurückgehaltene *cas* mRNA, die neben ihr liegende GMZ hat sich gerade geteilt und besitzt cytoplasmatische *cas* mRNA. An diese anschließend liegen zwischen 4-10 Cas Protein positive Zellen (Pfeil), bei welchen es sich um die Nachkommen der GMZ handeln muss. Die Abb. B-B''' zeigen eine repräsentative Einzelebene. B zeigt die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, B' die Cas Antikörperfärbung und B'' die DAPI Färbung. B''' zeigt die zusammengesetzte farbige Darstellung der Kanäle B-B''. Hierbei entspricht die farbliche Zuteilung der Kanäle denen in Abb. A'. Ein NB wurde durch eine weiße Umrandung hervorgehoben, dessen benachbarte *cas* positive GMZ, mit kernlokalisierter *cas* mRNA, wurde durch den Pfeilkopf gekennzeichnet. Die erste an die GMZ anliegende Cas positive Nachkommenzelle wurde durch den Pfeil markiert.

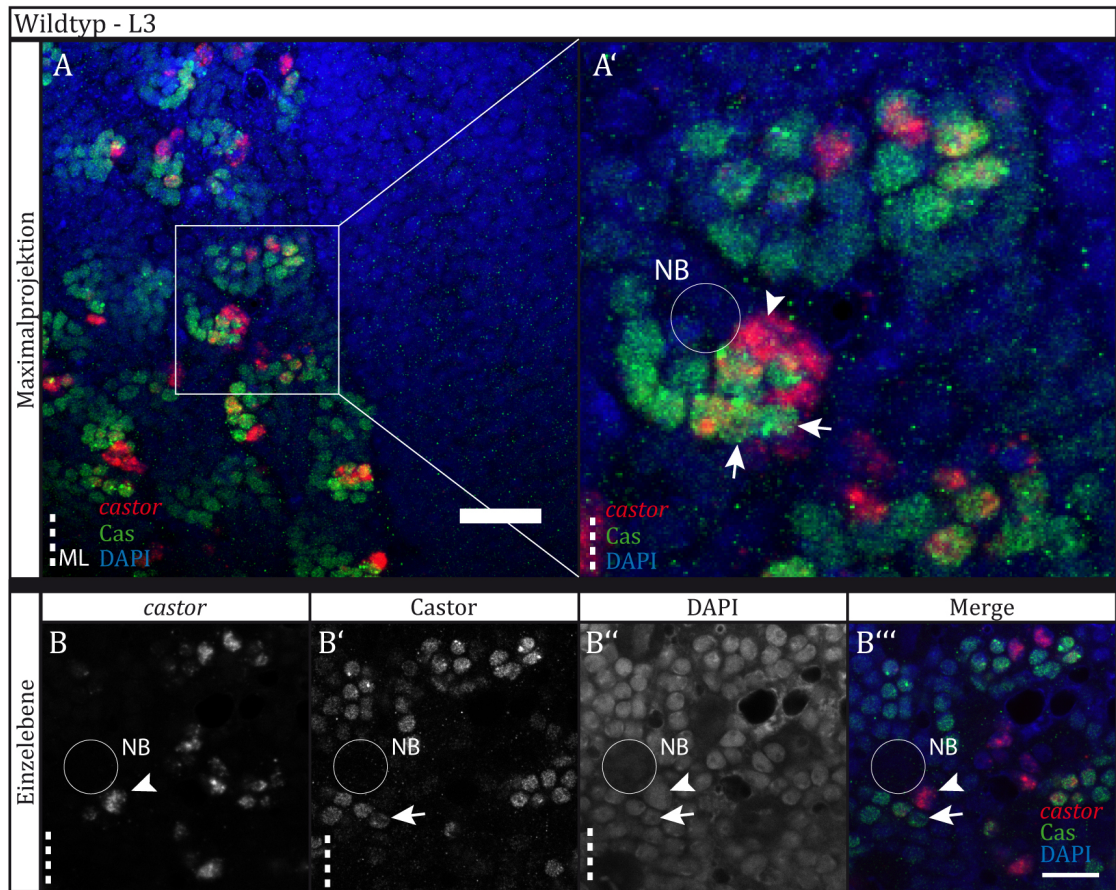


Abb. 3.4: *cas* mRNA in-situ Hybridisierung und Cas Antikörperfärbung am Gehirn einer wildtypischer L3-Larve. Anterior oben, posterior unten, ML: Mittellinie, Maßstab: 20µm, Maximalprojektion zusammengesetzt aus 25 Ebenen. A-A': Maximalprojektion, A: Übersichtsdarstellung der rechten Hirnhemisphäre, A': entspricht weiß umrandeten Bereich in A. B-B''': Einzelebene, B: *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, B': Cas Antikörperfärbung, B'': DAPI, B''': Zusammengesetzte farbige Darstellung der Kanäle B-B''. NB: Neuroblast, gekennzeichnet durch weiße Umrandung. Pfeilkopf: kernlokalisierte *cas* mRNA, Pfeil: Cas Antikörperfärbung. Zur besseren Orientierung wurden der Pfeilkopf/Pfeil auch in B'' eingefügt. Es besteht keine Kolo-kalisation der beiden Färbungen. Dies ist auch in B''' gezeigt. Der NB (Typ I) ist weiß umrandet dargestellt. Er ist *cas* und Cas negativ. Bei der *cas* positiven Zelle (Pfeilkopf) in direkter Nähe zum Neuroblasten handelt es sich vermutlich um die GMZ. Daran angrenzend liegen mehrere Cas positive Nachkommenzellen (Pfeil).

In Abb. 3.5 ist der Bereich einer Hirnhemisphäre des ZNS einer wildtypischen L3-Larve gezeigt, in welchem sich die Typ II Neuroblasten befinden. Deren Nachkommen sind, wie auch bei den Typ I Neuroblasten, als eine Art Traube an den Neuroblasten angelagert. Wie bereits dargelegt unterscheiden sich die beiden NB-Typen anhand ihrer Lage und der Anzahl ihrer Nachkommenzellen. In den Teilabb. A und A' sind Maximalprojektionen, zusammengesetzt aus 24 Einzelebenen, dargestellt. Abb. A' entspricht dem in A weiß umrandeten Bereich. Die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung ist in rot, die Cas Antikörperfärbung in grün und die DAPI Färbung in blau dargestellt. Für einen Typ II NB wurden in A' die Nachkommen mit einem Pfeil bzw. einem Pfeilkopf herausgestellt. Der Pfeilkopf markiert hierbei eine *cas* positive Zelle, welche direkt am NB liegt und bei der es sich wahrscheinlich um einen INP handelt. An diese angrenzend und durch den Pfeil markiert liegen die Nachkommen der INPs. Diese sind Cas positiv und können in ihrer Anzahl stark variieren. Ob es sich hierbei um gereifte INPs, GMZs oder Neurone handelt, ist nicht eindeutig zu sagen. In den Abb. B-B''' ist eine repräsentative Einzelebene dargestellt. B zeigt die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, B' die Cas Antikörperfärbung und B'' die DAPI Färbung. Die einzelnen Kanäle wurden in der Teilabbildung B'''

zusammengefügt. Hierbei sind wie auch in A' die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung in rot, die Cas Antikörperfärbung in grün und DAPI in blau abgebildet. Ein NB ist durch die weiße Umrandung hervorgehoben. Er ist *cas* und Cas negativ. Eine an den NB angrenzende Zelle, bei welcher es sich vermutlich um einen INP handelt, wurde durch einen Pfeilkopf markiert. Des Weiteren ist durch den Pfeil eine Cas positive Nachkommenzelle des Neuroblasten hervorgehoben.

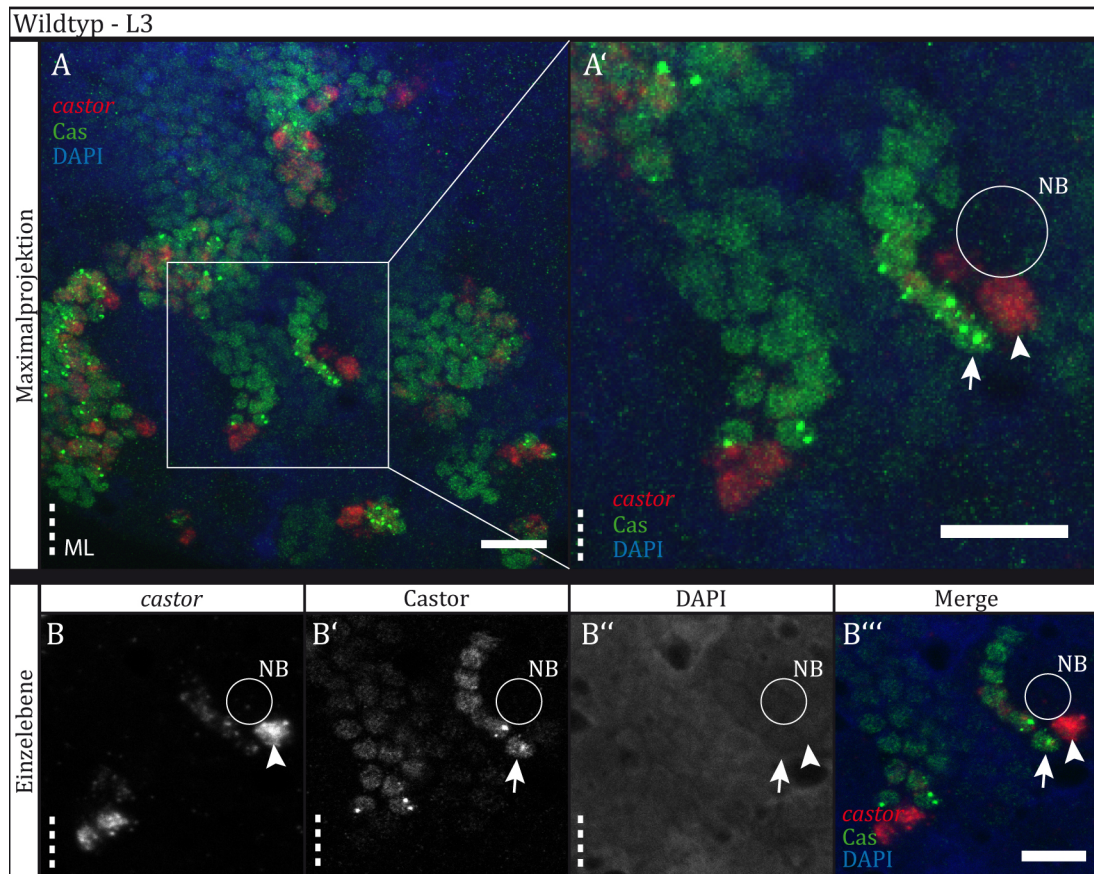


Abb. 3.5: *cas* mRNA in-situ Hybridisierung und Cas Antikörperfärbung am Gehirn einer wildtypischer L3-Larve, Typ II. Anterior oben, posterior unten, ML: Mittellinie, Maßstab: 20µm, Maximalprojektion zusammengesetzt aus 24 Ebenen. A-A': Maximalprojektionen, A: Übersichtsdarstellung der rechten Hirnhemisphäre, A': entspricht weiß umrandeten Bereich in A. NB: Neuroblast, gekennzeichnet durch weiße Umrandung. B-B''': Einzelebenen, B: *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, B': Cas Antikörperfärbung, B'': DAPI, B''': Zusammengesetzte farbige Darstellung der Kanäle B-B''. Pfeilkopf: kernlokalisierte *cas* mRNA, Pfeil: Cas Antikörperfärbung. Zur besseren Orientierung wurden der Pfeilkopf/Pfeil auch in B'' eingefügt. Es besteht keine Kolokalisation der beiden Färbungen. Dies wird in B''' noch einmal deutlicher hervorgehoben. Der Typ II Neuroblast ist weiß umrandet dargestellt. Er ist *cas* und Cas negativ. Bei der Cas positiven Zelle könnte es sich um einen gereiften INP, eine GMZ oder deren Nachkommenzellen handeln.

3.3 Die *cas* mRNA wird gespleißt im Kern zurückgehalten

Als nächsten Schritt galt es zu klären, ob die *cas* mRNA in Abhängigkeit vom Spleißvorgang im Kern zurückgehalten wird. Hierfür wurden zwei Sonden genutzt, welche an unterschiedliche Sequenzen der *cas* mRNA binden. Die Intronsonde bindet an einen Bereich des Introns 1, dem größten Intron der *cas* mRNA. Als Exonsonde wurde die generell verwendete *cas* Sonde genutzt.

3.3.1 Nachweis der *cas* mRNA mit einer Exonsonde

Um zu klären, ob es sich bei der im Kern zurückgehaltenen *cas* mRNA um die gespleißte Variante handelt, wurde mit der hergestellten *cas* Exonsonde eine in-situ Hybridisierung durchgeführt. Exemplarisch ist in Abb. 3.6 ein wildtypischer St. 10 Embryo abgebildet. Die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung ist in rot und die Cas Antikörperfärbung in grün dargestellt. Die Maximalprojektion wurde aus 19 Ebenen zusammengesetzt. In A' ist deutlich die kernlokalisierte *cas* mRNA, gekennzeichnet durch die Pfeilköpfe, zu erkennen. Die *cas*-Expression ist zu diesem Zeitpunkt auf einzelne Neuroblasten entlang der Mittellinie beschränkt. Die fehlende Cas Proteinfärbung in den markierten Neuroblasten (Pfeilkopf) zeigt, dass die Translation der *cas* mRNA in diesen Zellen noch nicht begonnen hat. Im Zellkern befindliches Cas Protein ist durch den Pfeil gekennzeichnet. Bei diesen Zellen handelt es sich vermutlich um Mittellinienglia, in welchen die *cas*-Expression zeitlich am frühesten beginnt. Bei den Abb. B-B''' handelt es sich um eine repräsentative Einzelebene. B zeigt die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, B' die Cas Antikörperfärbung und B'' die DAPI Färbung. Die Abb. B''' stellt eine Zusammensetzung der Einzelebenen B-B'' dar. Hierbei sind die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung in rot, die Cas Antikörperfärbung in grün und DAPI in blau dargestellt. Außerdem ist durch den Pfeil die Cas Antikörperfärbung und durch die Pfeilköpfe die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung hervorgehoben. In B ist die im Kern lokalisierte *cas* mRNA durch die Pfeilköpfe markiert. Dass diese nicht aus dem Zellkern entlassen wird, wird auch anhand der fehlenden Cas Antikörperfärbung deutlich (B' und B'''). Es zeigt sich keine Cas Färbung in den mit dem Pfeilkopf markierten *cas* positiven Zellen.

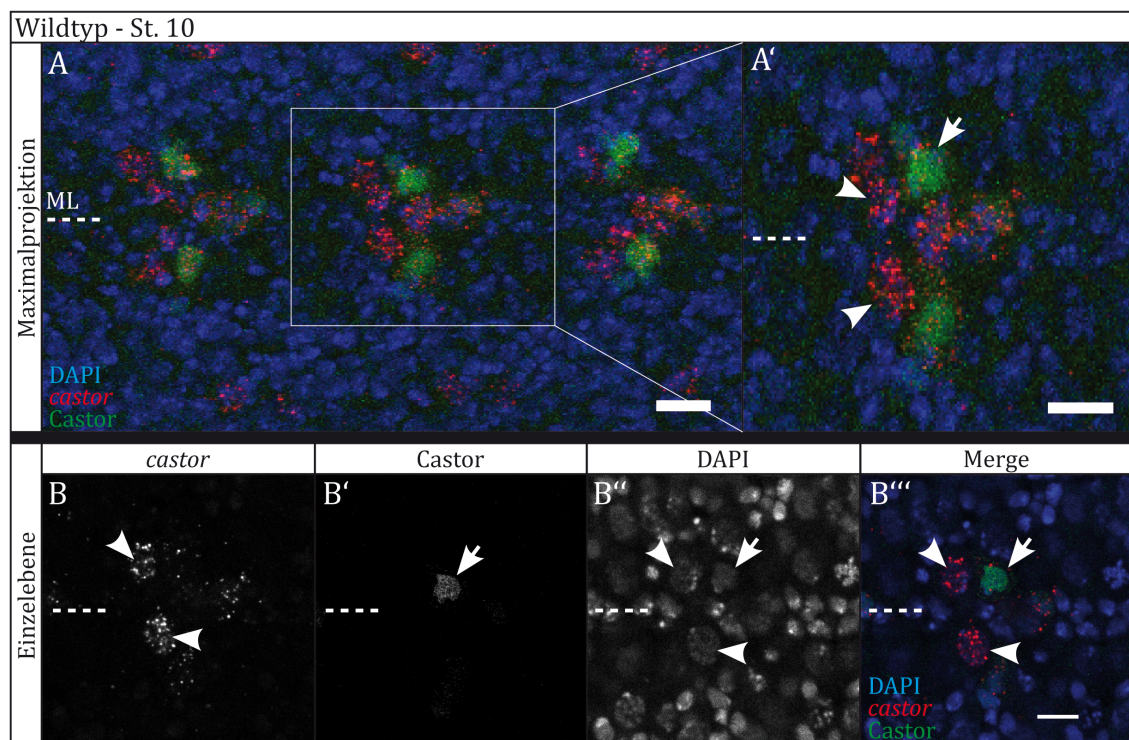


Abb. 3.6: In-situ Hybridisierung mit *cas* Exonsonde. Wildtyp, embryonales St. 10, anterior links, posterior rechts, ML: Mittellinie, Maßstab: 20µm, Maximalprojektion zusammengesetzt aus 19 Ebenen. A-A': Maximalprojektion, A: Übersicht, A': entspricht weiß umrandeten Segmenten in A. Pfeil: Cas Protein, Pfeilkopf: *cas* mRNA. B-B''': Einzelebene, B: *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, B': Cas Antikörperfärbung, B'': DAPI, B''': Zusammengesetzte farbige Darstellung von B-B''. Zur besseren Orientierung wurden die Pfeilköpfe/Pfeile auch in B'' eingefügt. In A' ist deutlich die Kernrückhaltung der gespleißten *cas* mRNA zu erkennen. Solange

sich diese im Kern befindet wird kein Cas Protein hergestellt. Nach der Translation der *cas* mRNA kann das Protein in den Zellkern geschleust werden, wo es als Transkriptionsfaktor aktiv ist (Pfeil).

3.3.2 Nachweis der *cas* mRNA mit einer Intronsonde

Zur Untersuchung der *cas* mRNA-Kernrückhaltung in Abhängigkeit des Spleißvorgangs wurde eine Hybridisierung an wildtypischen Embryonen mit der hergestellten Intronsonde durchgeführt (Abb. 3.7). Die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung ist in rot, die Cas Antikörperfärbung in grün dargestellt. Bei den Teilabb. A und A' handelt es sich um Maximalprojektionen, welche aus 12 Ebenen zusammengesetzt wurden. Die Abb. zeigt einen St. 12 Embryo. In A' lassen sich in vielen Zellen ein oder zwei punktuelle Signale ausmachen, die eindeutig die Primärtranskription der *cas* mRNA darstellen. Da sich in manchen Zellen zusätzlich Cas Protein (grün) im Zellkern befindet, ist zu vermuten, dass sich diese Zellen bereits einmal geteilt haben. Durch die Teilung gelangte die im Zellkern zurückgehaltene *cas* mRNA in das Cytoplasma und wurde translatiert. Bei den Zellen in A' mit positiver Cas Proteinfärbung, ohne dass *cas* Transkriptionspunkte zu erkennen sind, handelt es sich vermutlich um Zellen direkt nach einer Teilung. Die *cas* mRNA wurde hier bereits translatiert und das Protein in den Zellkern geschleust. Eine weitere Transkriptionsrunde der *cas* mRNA hat hier offenbar noch nicht begonnen.

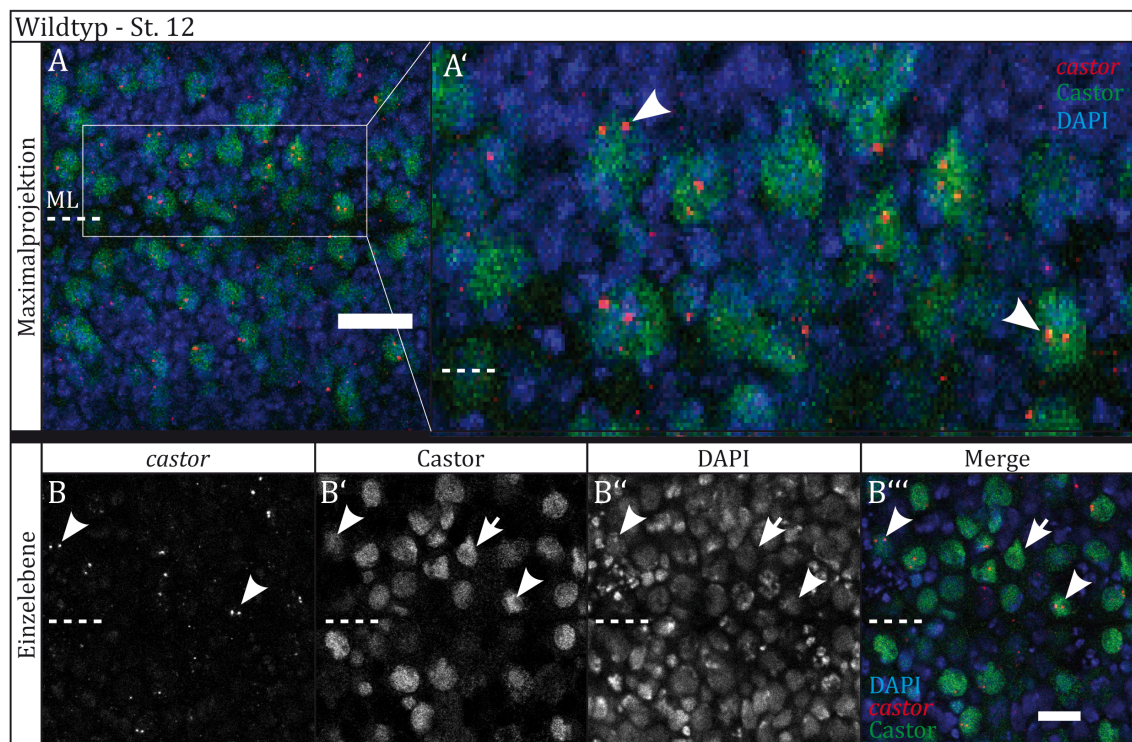


Abb. 3.7: In-situ Hybridisierung mit *cas* Intronsonde. Wildtyp, embryonales St. 12, anterior links, posterior rechts, ML: Mittellinie, Maßstab: 20µm, Maximalprojektion zusammengesetzt aus 12 Ebenen. A-A': Maximalprojektion, A: Übersicht, A': entspricht weiß umrandeten Segmenten in A. Pfeil: Cas positive Zelle, Pfeilkopf: *cas* mRNA-Transkriptionspunkte. Zur besseren Orientierung wurden die Pfeilköpfe/Pfeile auch in B'' eingefügt. B-B'': Einzelebene, B: *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, B': Cas Antikörperfärbung, B'': DAPI, B''': Zusammengesetzte farbige Darstellung von B-B''. Rote konzentrierte Färbung in A', B und B''' kennzeichnet die *cas* mRNA-Transkriptionspunkte im Zellkern.

3.4 Die nukleare Retention der *cas* mRNA ist in *D. virilis* konserviert

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ermittelt werden, ob es sich bei der Kernrückhaltung der *cas* mRNA um ein zwischen den *Drosophila* Spezies konserviertes Phänomen handelt. Bisher konnte die Kernrückhaltung nur in *D. melanogaster* (*Dmel*) nachgewiesen werden. Zur Einordnung der biologischen Relevanz dieses Mechanismus ist es jedoch wichtig die Verbreitung desselben innerhalb der verschiedenen Spezies zu kennen. Daher wurde für *D. virilis* eine *cas* Sonde hergestellt (siehe Material und Methode 2.4.1). Mit dieser wurden fluoreszente in-situ Hybridisierungen an Embryonen und Larven von *D. virilis* durchgeführt und auf eine mögliche Kernretention der *cas* mRNA untersucht.

3.4.1 Die *cas* mRNA zeigt auch im *D. virilis* Embryo eine nukleare Retention

Die Abb. 3.8 zeigt einen St. 10 Embryo der Spezies *D. virilis*. Die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung ist in rot und die DAPI Färbung in blau dargestellt. Bei den Teilabb. A und A' handelt es sich um Maximalprojektionen, welche aus 31 Ebenen zusammengesetzt wurden. In A' lässt sich deutlich die Kernrückhaltung der *cas* mRNA erkennen (Pfeilköpfe). Aufgrund der im Kern lokalisierten *cas* mRNA handelt es sich hierbei vermutlich um einen NB der sich noch nicht geteilt hat. Anhand der Einzelebenen (B-B'') lässt sich die Kernlokalisierung der *cas* mRNA noch einmal deutlicher erkennen. Auch hier wurde die kernständige *cas* mRNA durch Pfeilköpfe markiert. B zeigt die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, B' die DAPI Färbung und B'' die zusammengesetzte farbige Darstellung der beiden Kanäle. Wie auch in A', ist in B'' die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung in rot und die DAPI Färbung in blau dargestellt. Es zeigt sich eine Kolo-kalisation zwischen DAPI und der *cas* mRNA. Die Konservierung der Kernrückhaltung der *cas* mRNA im Embryo konnte also für *D. virilis* bestätigt werden. Ob dies auch in der Larve von *D. virilis* der Fall ist, wurde im folgenden Abschnitt untersucht.

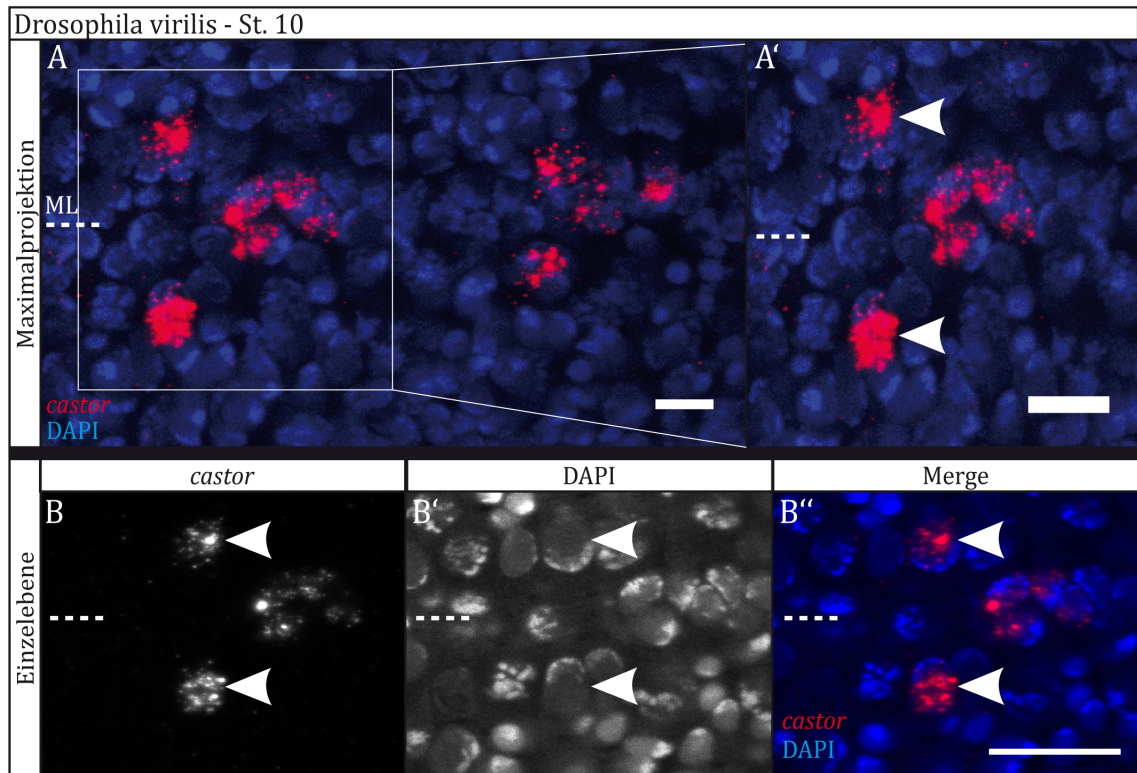


Abb. 3.8: Die *cas* mRNA-Retention ist im *D. virilis* Embryo konserviert. *D. virilis*, embryonales St. 10, anterior links, posterior rechts, ML: Mittellinie, Maßstab: 20µm, Maximalprojektion zusammengesetzt aus 31 Ebenen. A-A': Maximalprojektion, A: Übersicht, A': entspricht weiß umrandeten Segmenten in A. Pfeilkopf: *cas* mRNA. Zur besseren Orientierung wurden die Pfeilköpfe auch in B' eingefügt. B: *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, B': DAPI, B'': Zusammengesetzte farbige Darstellung von B und B'. In A' und B'' sind deutlich die Kernrückhaltungen der *cas* mRNA zu erkennen.

3.4.2 Die *cas* mRNA zeigt auch in der *D. virilis* Larve eine nukleare Retention

Hier dargestellt ist die Retention der *cas* mRNA in der L3-Wanderlarve von *D. virilis* (Abb. 3.9). Die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung ist in rot und die DAPI Färbung in grün dargestellt. Die Maximalprojektionen A und A' sind aus 7 Ebenen zusammengesetzt. Wie auch im *D. virilis* Embryo wird die larvale *cas* mRNA im Zellkern zurückgehalten, bis die Zelle sich teilt. Bereits in der Maximalprojektion lässt sich die Kernrückhaltung gut erkennen (A' Pfeilköpfe). Besonders deutlich zeigt die Einzelebene die Kernretention der *cas* mRNA (B-B''). Identisch zur *D. melanogaster* Larve beschränkt sich die *cas*-Expression auf zwei bis drei, dem NB angrenzende, Zellen. Hierbei handelt es sich um die GMZs der Typ I Neuroblasten. In B'' kennzeichnen die Pfeilköpfe kernlokalisierte *cas* mRNA, der Pfeil hingegen *cas* mRNA welche sich außerhalb des Kerns befindet. Der NB ist weiß umrandet dargestellt und verbleibt erwartungsgemäß *cas* negativ (B'').

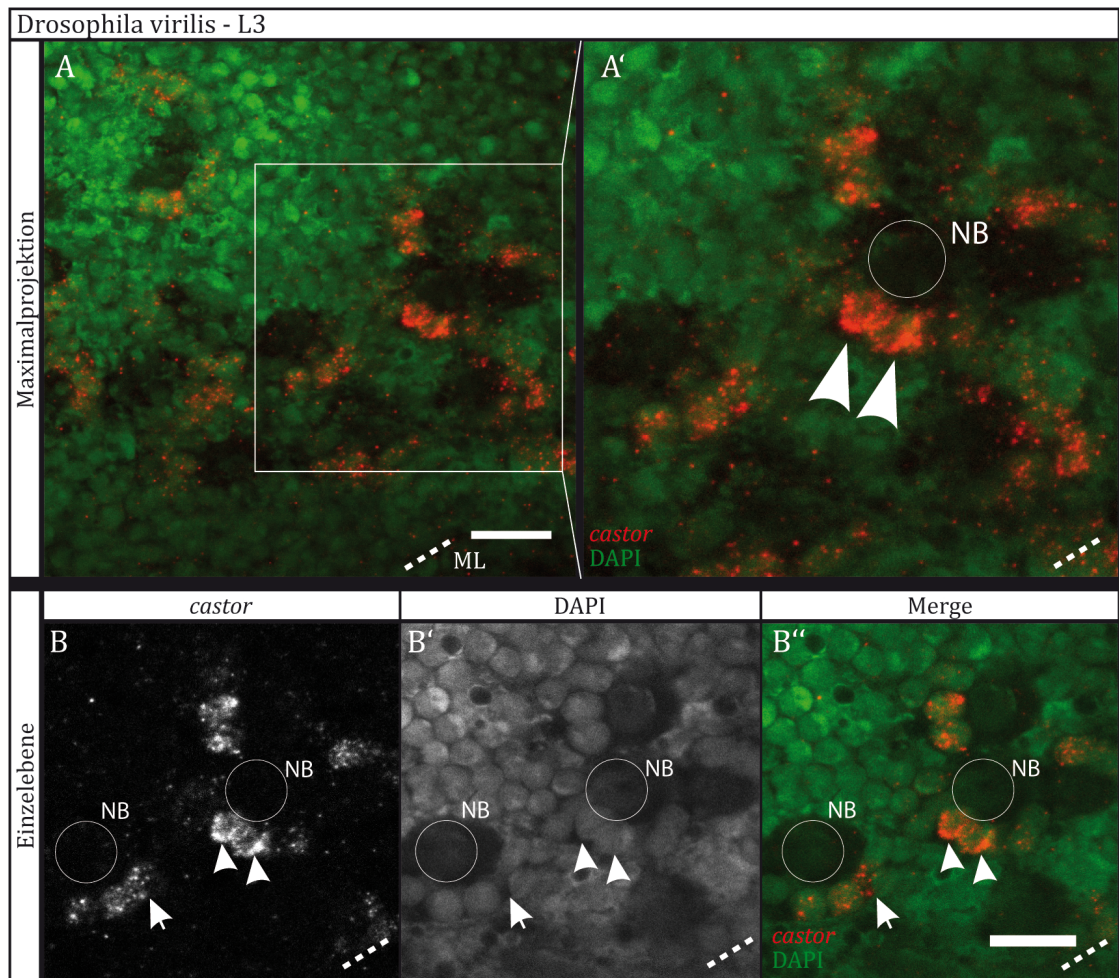


Abb. 3.9: Die *cas* mRNA-Retention ist in der *D. virilis* Larve konserviert. *D. virilis*, linke Hemisphäre einer L3-Wanderlarve, anterior rechts oben, posterior links unten, ML: Mittellinie, Maßstab: 20µm, Maximalprojektion zusammengesetzt aus 7 Ebenen. NB: Neuroblast, gekennzeichnet durch weiße Umrandung. A-A': Maximalprojektion, A: Übersicht, A': entspricht weiß umrandeten Bereich in A. Pfeilkopf: *cas* mRNA im Zellkern, Pfeil: *cas* mRNA außerhalb des Zellkerns. Zur besseren Orientierung wurden die Pfeilköpfe/Pfeile auch in B' eingefügt. B-B'': Einzelebene, B: *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, B': DAPI, B'': Zusammengesetzte farbige Darstellung von B und B'. In A' und B'' sind deutlich die Kernrückhaltung der *cas* mRNA zu erkennen (Pfeilköpfe). Teilt sich die Zelle, wird die *cas* mRNA in das Cytoplasma entlassen (Pfeil).

3.5 Das Signal zur nuklearen Retention der *cas* mRNA

In ihrer Diplomarbeit konnte Melanie Homberg zeigen, dass sich das Signal zur Kernrückhaltung der *cas* mRNA in der kodierenden Sequenz von *cas* befinden muss. Dies konnte durch die In-frame-Deletion der UTR's und der Introns von *cas* herausgearbeitet werden. Mit Hilfe dieser Information konnte die weitere Suche nach der Signal gebenden Sequenz eingegrenzt werden. Dieses und das folgende Kapitel legen dar, welche Sequenz für die Kernrückhaltung verantwortlich scheint und ob diese Sequenz allein ausreichend zur Kernrückhaltung einer anderen beliebigen mRNA ist. Dies wurde durch ein Kombinationskonstrukt der vermutlich entscheidenden Sequenz und GFP getestet. Alle in dieser Arbeit hergestellten UAS-Konstrukte wurden mit Hilfe des phi31-Systems und unter Verwendung des Fliegenstammes pUAST attP40 in die Fliege eingebracht und befinden sich somit am gleichen Insertionsort.

3.5.1 Das Retentionssignal von *cas* befindet sich innerhalb der ersten 1035 Basen

Die Abb. 3.10 zeigt eine graphische Darstellung der ektopisch exprimierten UAS*cas*-Konstrukte aus der Abb. 3.11. Hierbei ist in der obersten Zeile das Ausgangskonstrukt (UAS*cas* CDS) zur Herstellung der drei darunter befindlichen UAS-Konstrukte abgebildet. Alle Deletionen wurden in-frame durchgeführt. Ziel bei der Generierung dieser Deletionskonstrukte war es herauszufinden, welche der vorhandenen funktionellen Motive entscheidend für die Kernrückhaltung der *cas* mRNA sind. ATG kennzeichnet das Startcodon. Dieses wurde im Konstrukt UAS*cas*Del1 reproduziert und dem Bereich, welcher das Zinkfingermotiv (ZF) enthält, vorangestellt. Die Konstrukte UAS*cas*Del2 und UAS*cas*Del3 beinhalten den ersten Abschnitt der *cas* CDS (siehe Konstrukt *cas* CDS) und somit das endogene Startcodon. Bei dem AT hook handelt es sich um ein DNA-Motiv im hinteren Teil der CDS von *cas*. Als artifizielle 3' UTR wurde der kodierenden Sequenz von *cas* die SV40 UTR (Simian-Virus 40 untranslated region) angehängt. Des Weiteren deuten die grauen Linien an, welche Bereiche der kodierenden Sequenz in dem jeweiligen Konstrukt deletiert wurden. Anschließend wurden die verschiedenen UAS*cas*-Konstrukte mit enGal4 in der Epidermis ektopisch exprimiert und die Notwendigkeit der funktionellen Sequenzbereiche für die nukleare Retention der *cas* mRNA untersucht (siehe Abb. 3.11).

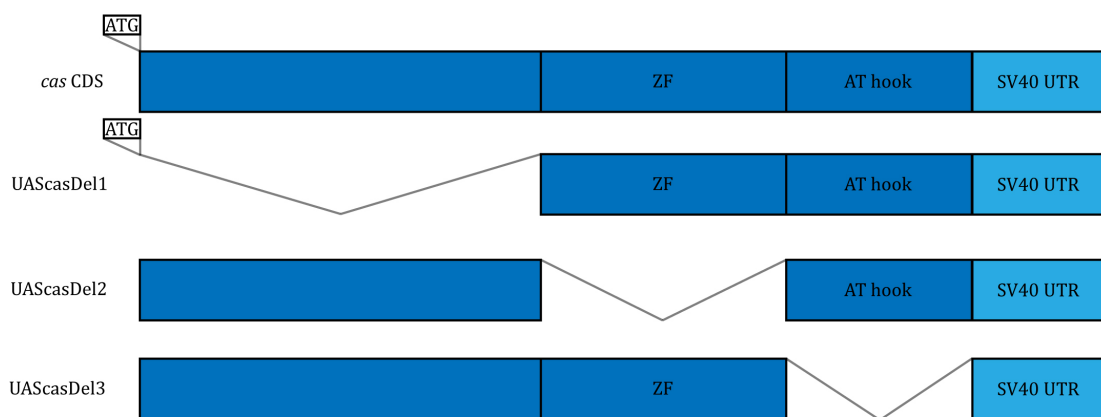


Abb. 3.10: Die Deletionskonstrukte UAS*cas*Del1-3. ATG: Startcodon; ZF: Zinkfinger; AT hook: DNA Bindemotiv; SV40 UTR: Simian-Virus 40 untranslated region. Die verschiedenen UAS*cas*-Konstrukte werden mit enGal4 in der Epidermis ektopisch exprimiert und die Notwendigkeit der funktionellen Sequenzbereiche für die nukleare Retention der *cas* mRNA untersucht. Bei den exprimierten *cas*-Sequenzen handelt es sich um den kodierenden Bereich von *cas*. Die grauen Linien kennzeichnen, welche Bereiche in den jeweiligen Konstrukten (UAS*cas*Del1-3) deletiert wurden.

Die Abb. 3.11 zeigt die ektopische Expression dreier *cas* mRNA-Deletionskonstrukte in der Epidermis. Die ektopische Expression wurde mit enGal4 getrieben. Das Konstrukt in Abbildung A-A'' besteht aus der gesamten *cas* CDS und diente als Ausgangskonstrukt zur Herstellung der gezeigten Deletionskonstrukte UAS*cas*Del1-3 (vergleiche auch 3.10). Bei den exprimierten *cas*-Sequenzen handelt es sich um den kodierenden Bereich von *cas*. Dem Konstrukt UAS*cas*Del1, bei welchem die ersten 1035 Basen der kodierenden *cas*-Sequenz entfernt wurden, wurde das Starttriplet ATG vorangestellt. Es bestätigt sich, dass die ektopische Expression der *cas* mRNA in einem nicht endogenen Gewebe keinen Einfluss auf die Kernrückhaltung der *cas* mRNA hat. Dies konnte auch schon von Melanie Homberg gezeigt werden und ist Voraussetzung zur Verwendung der Epidermis als Expressionsgewebe für die weiteren Versuche. In A-D'' ist die kernlokalisierte *cas* mRNA durch Pfeilköpfe, die cytoplasmatische *cas* mRNA durch Pfeile gekennzeichnet. Die *cas*

mRNA in-situ Hybridisierung ist in rot und die Lamin Antikörperfärbung zur Detektion der Zellkernmembran in grün dargestellt. Die Färbungen der Konstrukte UAScasDel2 und UAScasDel3 zeigen keinen Unterschied zum Ausgangskonstrukt UAScas. Beide Deletionskonstrukte werden bei der ektopischen Expression in der Epidermis im Zellkern zurückgehalten. Den Konstrukten fehlen die in 3.10 dargestellten funktionellen Sequenzen. Hierbei handelt es sich um Sequenzen, welche die für Cas wichtige Zinkfingerdomäne und den AT Hook kodieren. Keiner der beiden Sequenzabschnitte scheint jedoch notwendig für die Kernrückhaltung der *cas* mRNA zu sein. Überraschenderweise enthalten die ersten 1035 Basen von *cas* Sequenzen, welche für die Kernrückhaltung benötigt werden. Dies ist in den Abb. B-B'' gezeigt. Die *cas* mRNA wird nicht mehr im Kern zurückgehalten, sondern verteilt sich mehr oder weniger gleichmäßig im Expressionsbereich des *engrailed* Streifens. Vereinzelt lassen sich auch noch Zellen mit im Kern lokalisierter *cas* mRNA erkennen; diese sind jedoch die Ausnahme (Pfeilkopf). Es ist zu vermuten, dass es sich um Bereiche handelt, in welchen die Transkription von *cas* gerade begonnen hat. Zellen, in denen sich die *cas* mRNA im Cytoplasma befindet, wurden mit Pfeilen markiert. Es scheint außerdem, als sei die *cas* mRNA im Cytoplasma weniger stabil als im Zellkern, da die Färbung diffuser und allgemein schwächer ausfällt. Dies könnte auf eine schnellere Degradation der mRNA oder die Verteilung derselben auf eine größere Fläche zurückzuführen sein. In den ersten 1035 Basen, welche im Konstrukt UAScasDel1 deletiert wurden, befinden sich keine bekannten strukturellen mRNA-Motive. Warum die Deletion dieses Bereiches für die Verlagerung der *cas* mRNA aus dem Zellkern in den cytoplasmatischen Bereich der Zelle sorgt, muss durch weitere Experimente geklärt werden. Aufgrund dessen wurde versucht in den folgenden Experimenten die für die Kernretention verantwortliche Sequenz durch weitere Deletionen einzuengen.

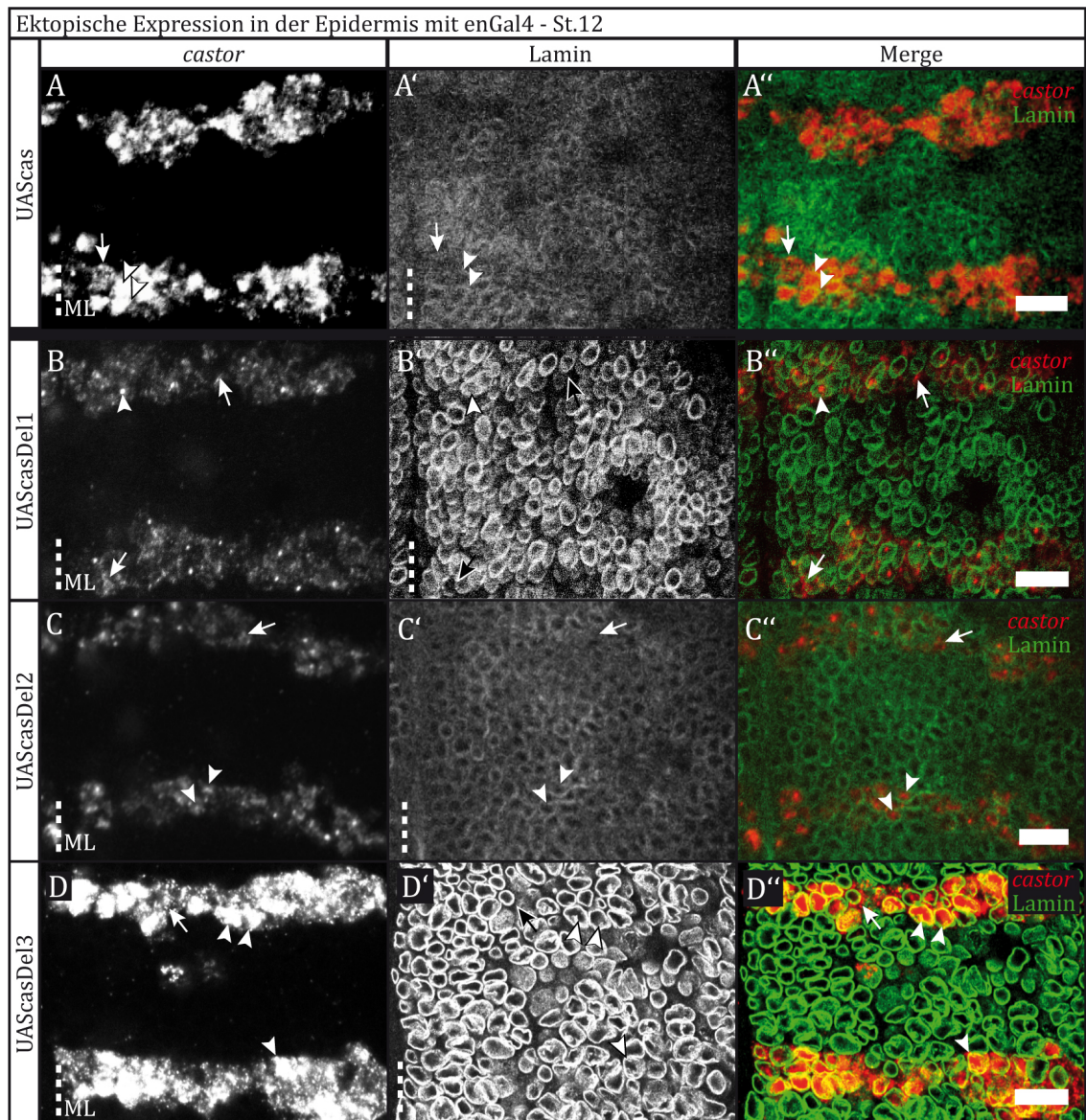


Abb. 3.11: Das *cas* mRNA-Retentionssignal befindet sich innerhalb der ersten 1035 Basen der CDS. Ektopische Expression der UAScas Deletionskonstrukte (siehe 3.10) in der Epidermis mit enGal4; embryonales St. 12; anterior oben, posterior unten, ML: Mittellinie, Maßstab: 20 μ m, A-A'': enGal4xUAScas; B-B'': enGal4xUAScasDel1; C-C'': enGal4xUAScasDel2; D-D'': enGal4xUAScasDel3; Spalte 1 zeigt die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, Spalte 2 die Lamin Antikörperfärbung und Spalte 3 eine zusammengesetzte farbige Darstellung der Spalten 1 und 2. Pfeil: *cas* mRNA außerhalb des Zellkerns, Pfeilkopf: *cas* mRNA im Zellkern. Zur besseren Orientierung wurden die Pfeilköpfe/Pfeile auch in A', B', C' und D' eingefügt. A-A'': Das Konstrukt besteht aus der gesamten kodierenden *cas*-Sequenz und diente als Ausgangskonstrukt der Deletionskonstrukte. In A'', C'' und D'' ist deutlich die Kernlokalisierung der *cas* mRNA zu erkennen. Auffallend ist Konstrukt UAScasDel1. Bei dessen ektopischer Expression wird die *cas* mRNA nicht mehr im Kern zurückgehalten. Die entscheidende Sequenz zur Lokalisierung der *cas* mRNA im Zellkern muss sich also in den ersten 1035 Basen der *cas* CDS befinden.

3.5.2 Deletionen von 300 Bp können das Retentionssignal nicht eingrenzen

Die Abb. 3.12 zeigt die graphische Darstellung der in Abb. 3.13 ektopisch exprimierten UAScas-Konstrukte. In der obersten Zeile ist das Ausgangskonstrukt (UAScas CDS) zur Herstellung der drei darunter befindlichen UAS-Konstrukte abgebildet. In UAScas CDS sind die Deletionen, welche in den Konstrukten UAScasNTDel1-3 durchgeführt wurden, mit 1-3 gekennzeichnet. Alle Deletionen wurden in-frame durchgeführt. Ziel bei der

Generierung dieser Deletionskonstrukte war die Einengung des Retentionssignals, welches in den vorhergehenden Deletionen (Abb. 3.11) auf die ersten 1035 Basen der CDS beschränkt werden konnte. Entsprechend der Abb. 3.10 kennzeichnet ATG das Startcodon, welches dem Konstrukt UAScasNTDel1 vorangestellt wurde. Die Konstrukte UAScasNTDel2 und UAScasNTDel3 beinhalten den ersten Abschnitt der *cas* CDS (siehe Konstrukt *cas* CDS) und somit das endogene Startcodon. Alle Konstrukte besitzen die SV40 am 3'-Ende. Die grauen Linien deuten an, welche Bereiche der kodierenden Sequenz in dem jeweiligen Konstrukt deletiert wurden. Anschließend wurden die verschiedenen UAScas-Konstrukte mit enGal4 in der Epidermis ektopisch exprimiert und die Notwendigkeit der deletierten Sequenzbereiche für die nukleare Retention der *cas* mRNA untersucht (siehe Abb. 3.13).

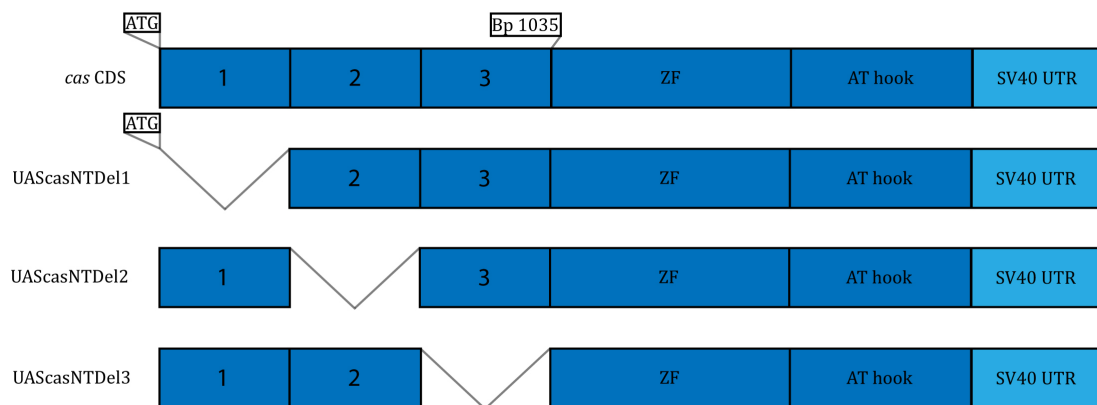


Abb. 3.12: Die Deletionskonstrukte UAScasNTDel1-3. ATG: Startcodon; Bp 1035: Basenpaar 1035; ZF: Zinkfinger; AT hook: DNA Bindemotiv; SV40 UTR: Simian-Virus 40 untranslated region. Die verschiedenen UAS-Konstrukte werden mit enGal4 in der Epidermis ektopisch exprimiert und die Notwendigkeit der Sequenzbereiche für die nukleare Retention der *cas* mRNA untersucht. Bei den exprimierten *cas*-Sequenzen handelt es sich um den kodierenden Bereich von *cas*. Die grauen Linien kennzeichnen, welche Bereiche in den jeweiligen Konstrukten (UAScasNTDel1-3) deletiert wurden.

Die Abb. 3.13 zeigt repräsentative Fokusebenen der ektopischen Expression der drei oben beschriebenen *cas*-Deletionskonstrukte in der Epidermis. Auch hier wurden die verwendeten UAScas Deletionskonstrukte mit enGal4 getrieben. Abb. A-A'' zeigt die ektopische Expression der gesamten *cas* mRNA im *en*-Streifen. Sie wird, wie das endogene *cas*, im Kern zurückgehalten und dient als Kontrolle der Deletionskonstrukte UAScasNTDel1-3. Spalte eins zeigt die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, Spalte zwei die Lamin Antikörperfärbung und Spalte drei eine zusammengesetzte farbige Darstellung der beiden vorherigen Kanäle. Hierbei sind die in-situ Hybridisierung in rot und die Antikörperfärbung in grün dargestellt. In Spalte drei wurden die kernlokalisierte *cas* mRNA durch die Pfeile und die *cas* mRNA außerhalb des Zellkerns mit Pfeilköpfen markiert. Dies gilt sowohl für UAScas, als auch für die Deletionskonstrukte. Im Gegensatz zu dem Konstrukt UAScas und dessen Retention im Zellkern zeigt sich bei den drei Deletionskonstrukten keine Zellkernretention der *cas* mRNA. In den vorliegenden Färbungen der ektopischen Expressionen (B-D'') befindet sich die *cas* mRNA im Cytoplasma und es ist eine deutlich diffusere Verteilung der *cas* mRNA sichtbar. Erkennt man bei dem UAScas CDS-Konstrukt hell leuchtende und zentrierte Färbung, ist diese bei den Deletionskonstrukten über den gesamten *en*-Expressionsbereich verteilt. Durch die Deletion von 300 Bp konnte die für die Retention verantwortliche Sequenz nicht eingengt werden. Es besteht einerseits die Möglichkeit, dass die gesamten 1035 Bp für die

Kernrückhaltung der *cas* mRNA benötigt werden oder dass das Signal über mehrere Sequenzen innerhalb dieses Bereiches verteilt ist. Um eine Zerstörung oder Zerteilung des Retentionsmotivs durch die gewählten Deletionen auszuschließen, wurden in weiteren Experimenten kürzere Deletionen durchgeführt.

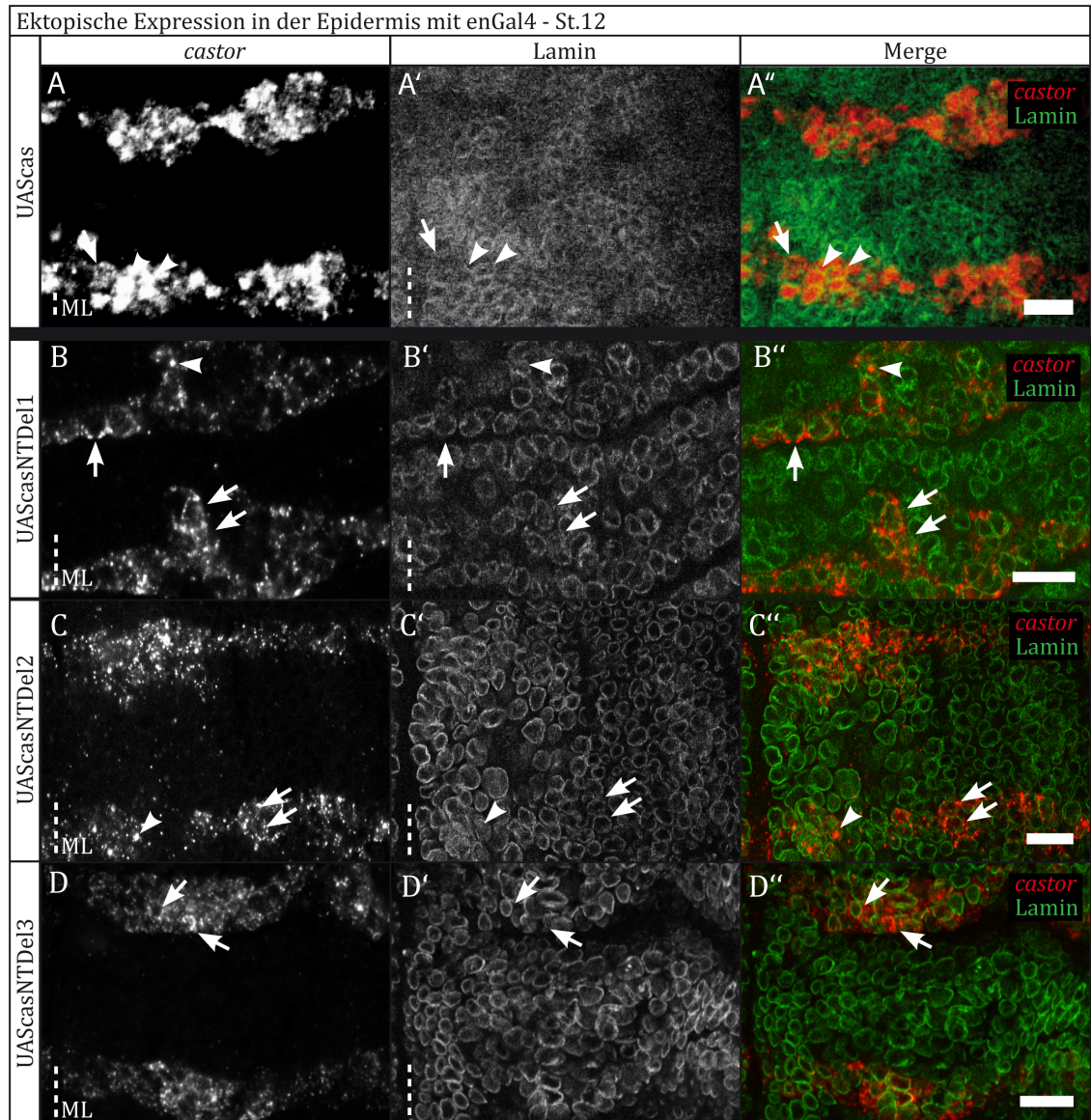


Abb. 3.13: 300 Bp Deletionen können das Retentionssignal der *cas* mRNA nicht weiter eingrenzen. Ektopische Expression der UAS*cas* Deletionskonstrukte (siehe 3.12) in der Epidermis mit enGal4; embryonales St. 12; anterior oben, posterior unten, ML: Mittellinie, Maßstab: 20 μ m, A-A'': enGal4xUAS*cas*; B-B'': enGal4xUAS*cas*NTDel1; C-C'': enGal4xUAS*cas*NTDel2; D-D'': enGal4xUAS*cas*NTDel3; Spalte 1 zeigt die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, Spalte 2 die Lamin Antikörperfärbung und Spalte 3 eine zusammengesetzte farbige Darstellung der Spalten 1 und 2. Pfeil: *cas* mRNA außerhalb des Zellkerns, Pfeilkopf: *cas* mRNA im Zellkern. Zur besseren Orientierung wurden die Pfeilköpfe/Pfeile auch in A', B', C' und D' eingefügt. A-A'': Das UAS-Konstrukt mit der gesamten *cas* CDS behält bei ektopischer Expression in der Epidermis die Kernlokalisation bei. Abb. B-D'' entsprechen den Deletionskonstrukten in 3.12. Es zeigt sich, dass keines der Deletionskonstrukte im Kern zurückgehalten wird. Dies könnte für eine Verteilung des Kernrückhaltungssignals über mehrere Sequenzen innerhalb der ersten 1035 Basen der *cas* CDS sprechen.

3.5.3 Deletionen von 207 Bp können das Retentionssignal nicht eingrenzen

Die Abb. 3.14 zeigt die graphische Darstellung der in Abb. 3.15 ektopisch exprimierten UAScas-Konstrukte. In der obersten Zeile ist das Ausgangskonstrukt (UAScas CDS) zur Herstellung der vier darunter befindlichen UAS-Konstrukte abgebildet. Hierbei sind in UAScas CDS die Deletionen, welche in den Konstrukten UAScasNTDel1.1-1.5 durchgeführt wurden, mit 1-5 gekennzeichnet. Alle Deletionen wurden in-frame durchgeführt. Ziel bei der Generierung dieser Deletionskonstrukte war auch hier die Einengung des Retentionssignals, welches in den vorhergehenden Deletionen (Abb. 3.11 und 3.13) auf die ersten 1035 Basen der CDS beschränkt werden konnte. Entsprechend der Abb. 3.10 und 3.12 kennzeichnet ATG das Startcodon, welches dem Konstrukt UAScasNTDel1.1 vorangestellt wurde. Die Konstrukte UAScasNTDel1.3, UAScasNTDel1.4 und UAScasNTDel1.5 beinhalten den ersten Abschnitt der *cas* CDS (siehe Konstrukt *cas* CDS) und somit das endogene Startcodon. Alle Konstrukte besitzen die SV40 am 3'-Ende. Die grauen Linien deuten an, welche Bereiche der kodierenden Sequenz in dem jeweiligen Konstrukt deletiert wurden. Anschließend wurden die verschiedenen UAScas-Konstrukte mit enGal4 in der Epidermis ektopisch exprimiert und die Notwendigkeit der deletierten Sequenzbereiche für die nukleare Retention der *cas* mRNA untersucht (siehe Abb. 3.13). Das Deletionskonstrukt UAScasNTDel1.2 konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht generiert werden.

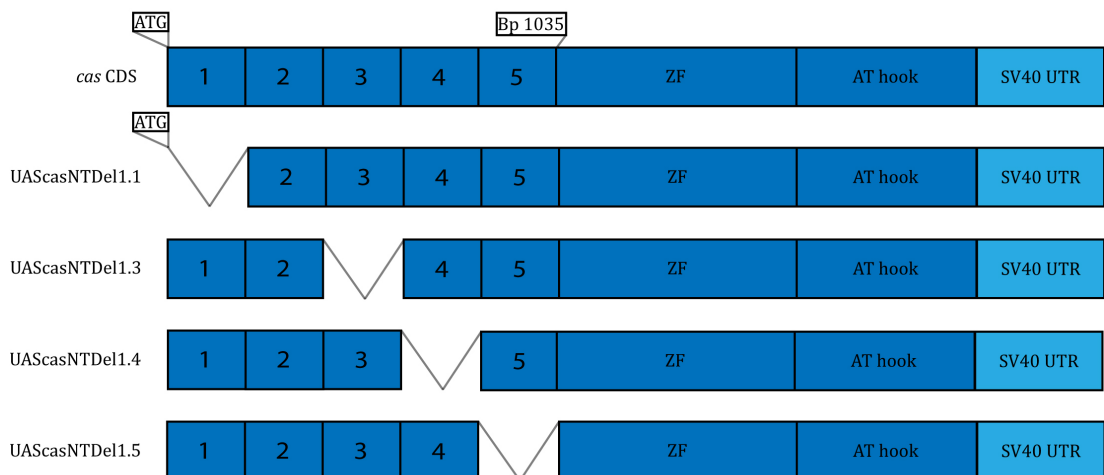


Abb. 3.14: Die Deletionskonstrukte UAScasNTDel1.1-1.5. ATG: Startcodon; Bp 1035: Basenpaar 1035; ZF: Zinkfinger; AT hook: DNA Bindemotiv; SV40 UTR: Simian-Virus 40 untranslated region. Die verschiedenen UAS-Konstrukte werden mit enGal4 in der Epidermis ektopisch exprimiert und die Notwendigkeit der Sequenzbereiche für die nukleare Retention der *cas* mRNA untersucht. Das Konstrukt UAScasNTDel1.2 konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht hergestellt werden.

Die Abb. 3.15 zeigt in Zeile A–A'' die ektopische Expression des UAScas CDS-Konstrukts im *en*-Streifen als Kontrolle. Des Weiteren sind hier die Ergebnisse der UAScas Deletionskonstrukte UAScasNTDel1.1-1.5 aufgeführt (Abb. 3.14). Zusätzlich zur *cas* mRNA in-situ Hybridisierung in rot und der DAPI Färbung in blau wurde bei den Deletionskonstrukten auch eine Cas Antikörperfärbung durchgeführt. Diese ist in grün dargestellt. Die letzte, bei den Deletionskonstrukten vierte Spalte, besteht aus der farbigen Zusammensetzung der drei ersten Spalten. Eine Ausnahme besteht für das Konstrukt UAScas. Hier wurde keine Cas Antikörperfärbung durchgeführt und somit besteht die Spalte 3 (A'') nur aus der Zusammensetzung der ersten beiden Spalten (A und A'). Den

vorausgehenden Abb. folgend, markieren die Pfeilköpfe kernlokalisierte *cas* mRNA und die Pfeile im Cytoplasma befindliche *cas* mRNA. Die ektopischen Expressionen der Deletionskonstrukte UAS*cas*NTDel1.1-1.5 zeigen ähnliche Lokalisationsmuster der *cas* mRNA. Keine der exprimierten *cas* mRNA-Deletionskonstrukte weist eine Kernretention auf. Dies könnte bedeuten, dass das zur Kernretention benötigte Signal entweder aus mehreren Signalen besteht, welche über die 1035 Bp verteilt sind oder, dass die gesamten 1035 Bp zur Retention der *cas* mRNA im Zellkern benötigt werden. Des Weiteren lässt sich sagen, dass die Kernlokalisationssequenz von Cas bei den Deletionskonstrukten UAS*cas*NTDel1.1-1.4 trotz der Deletionen funktional ist. Die Cas Antikörperfärbung ist im Kern lokalisiert. Für das Deletionskonstrukt UAS*cas*NTDel1.5 ist dies nicht der Fall. Hier wurden die letzten 207 Bp der ersten 1035 Basen von *cas* deletiert. Im Vergleich zu den Cas Antikörperfärbungen in B', C' und D', in welchen die Färbung als zentriertes, im Zellkern vorliegendes Cas sichtbar ist, ist in E' die Cas Färbung als kreisförmige Struktur im Cytoplasma der Zellen zu erkennen. Die Auswertung der Färbung legt die Vermutung nahe, dass das aus dem vorliegenden UAS*cas*NTDel1.5 Konstrukt resultierende Cas Protein nicht mehr in den Zellkern transportiert werden kann (E-E''). Eine Analyse der Sequenzierung legte zudem offen, dass durch einen Fehler bei der Amplifikation zur Herstellung des Konstrukts ein Stopcodon eingebaut wurde, welches die Translation des Cas Proteins vorzeitig abbricht. Nichtsdestotrotz reicht der translatierte Bereich des Cas Proteins, um von dem Cas Antikörper erkannt zu werden.

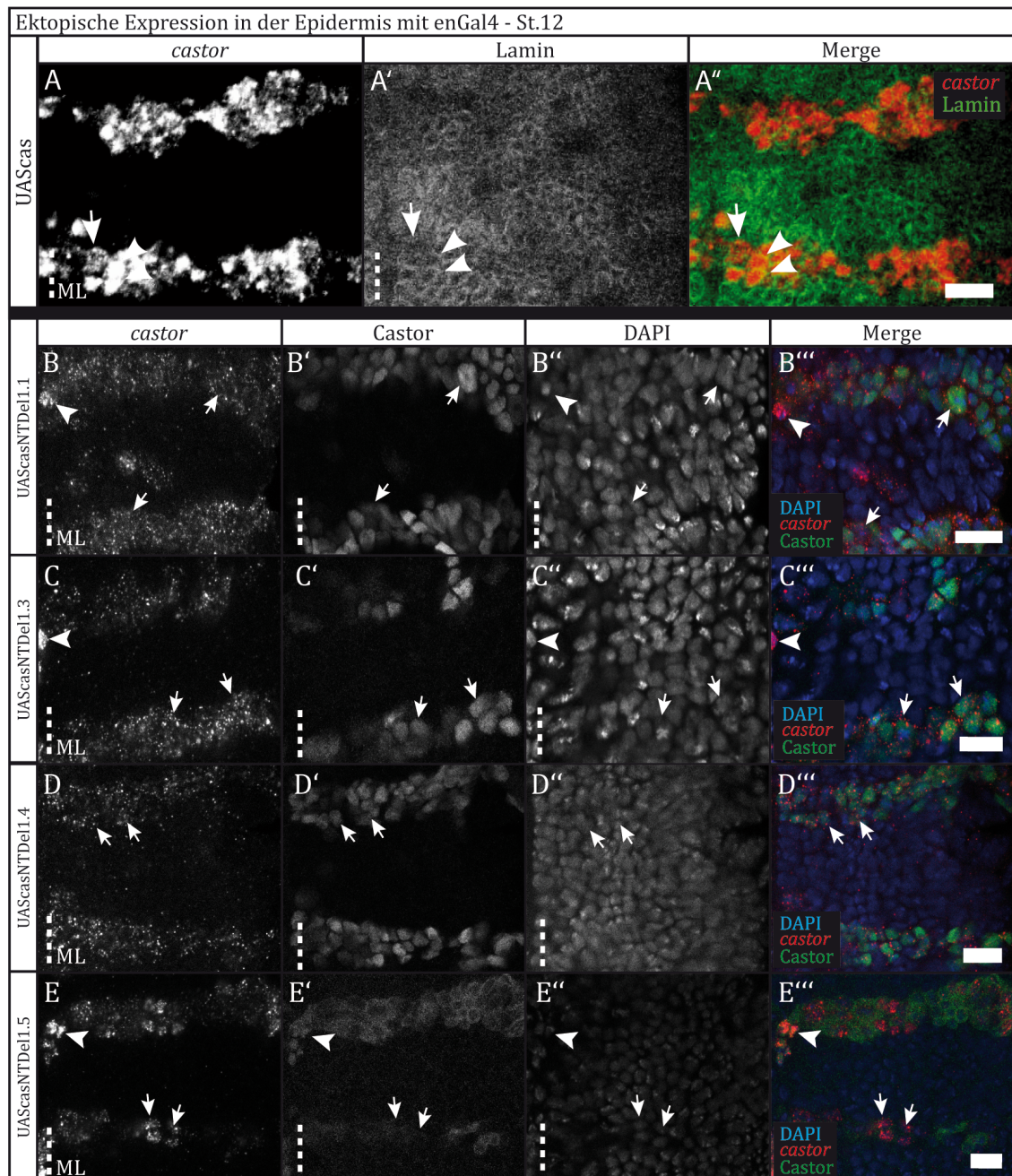


Abb. 3.15: 207 Bp Deletionen können das Retentionssignal der *cas* mRNA nicht weiter eingrenzen. Ektopische Expression der UAS*Scas*NTDel1.1-1.5 Deletionskonstrukte in der Epidermis mit enGal4; embryonales St. 12; anterior oben, posterior unten, ML: Mittellinie, Maßstab: 20 μ m, A-A'': enGal4xUAS*Scas*; B-B''': enGal4xUAS*Scas*NTDel1.1; C-C''': enGal4xUAS*Scas*NTDel1.3; D-D''': enGal4xUAS*Scas*NTDel1.4; E-E''': enGal4xUAS*Scas*NTDel1.5. In A-A'' zeigt die erste Spalte die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, Spalte 2 die Lamin Antikörperfärbung und Spalte 3 die zusammengefügte farbige Darstellung beider Kanäle. B-E''': Spalte 1 zeigt die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, Spalte 2 die Cas Antikörperfärbung, Spalte 3 die DAPI Färbung und Spalte 4 eine zusammengesetzte farbige Darstellung der Spalten 1-3. Pfeil: *cas* mRNA außerhalb des Zellkerns, Pfeilkopf: *cas* mRNA im Zellkern. Zur besseren Orientierung wurden die Pfeilköpfe/Pfeile auch in A', B'', C'' und D'' eingefügt. A-A''': Bei ektopischer Expression von UAS*Scas* in der Epidermis wird die *cas* mRNA weiterhin im Kern zurückgehalten. Abb. B-E'''' entspricht den Deletionskonstrukten in 3.14. Es zeigt sich, dass keines der Deletionskonstrukte im Kern zurückgehalten wird. Dies könnte für eine Verteilung des Kernrückhaltesignals über mehrere Sequenzen innerhalb der ersten 1035 Basen der *cas* CDS sprechen oder die Notwendigkeit der gesamten 1035 Bp. Auffallend ist die fehlende Kernlokalisation des Cas Proteins in Abb. E-E'''' (UAS*Scas*NTDel1.5).

3.6 Weitere Experimente zur Lokalisierung des Kernrückhaltesignals

In Abb. 3.16 ist eine graphische Darstellung der generierten UAScas Konstrukte gezeigt. In Zeile 1 ist die komplette *cas* CDS aufgeführt. Diese wurde genutzt um die drei darunter liegenden UAScas-Konstrukte herzustellen. Das Startcodon ist durch das Triplet ATG gekennzeichnet und alle Konstrukte besitzen am 3'-Ende die SV40 UTR. Das Konstrukt 1kb-nGFP besteht aus den ersten 1035 Bp der CDS von *cas*, einer 3-basigen Linkersequenz und nGFP. Bei den Konstrukten CG-1 und CG-2 wurde der Sequenzbereich 3, mit der Länge von 207 Basenpaaren, durch eine zufällig ausgewählte Sequenz des Vektors pUAST-CG4854 ausgetauscht. Die UAScas-Konstrukte wurden mit enGal in der Epidermis getrieben und auf ihre Kernrückhaltung untersucht.

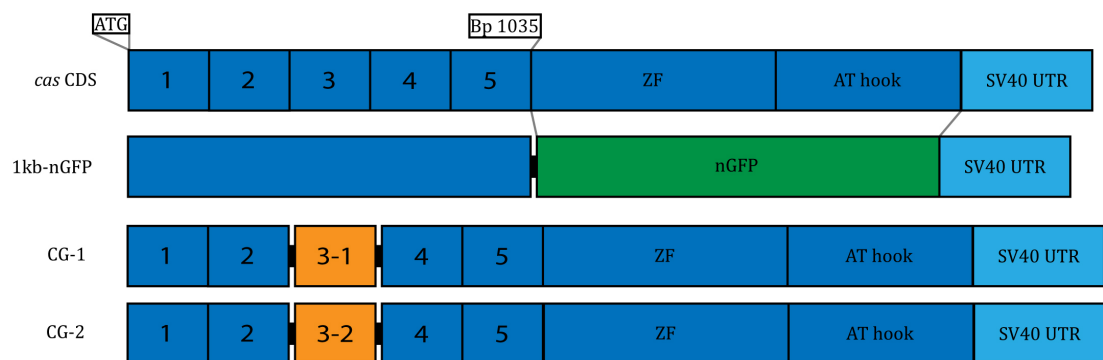


Abb. 3.16: Das 1kb-nGFP-Fusionskonstrukt und die Konstrukte CG-1/2 mit eingebauten Spacersequenzen. ATG: Startcodon; Bp 1035: Basenpaar 1035; ZF: Zinkfinger; AT hook: DNA Bindemotiv; SV40 UTR: Simian-Virus 40 untranslated region; nGFP: nukleares grün fluoreszierendes Protein. Die verschiedenen UAS-Konstrukte werden mit enGal4 in der Epidermis ektopisch exprimiert. 1kb-nGFP: Das Fusionskonstrukt besteht aus den ersten 1035 Basen der *cas* CDS, einer 3-basigen Linkersequenz und nGFP. CG-1/2: Bei den Konstrukten CG-1 und CG-2 wurden die mittleren 207 Bp gegen zwei beliebige Sequenzen des Vektors pUAST-CG4854 ausgetauscht.

3.6.1 Die ersten 1035 Bp sind nicht ausreichend zur Kernrückhaltung von nGFP

Bisher konnte nachgewiesen werden, dass sich ein Signal zur Kernrückhaltung der *cas* mRNA in den ersten 1035 Basen derselben befinden muss. Dieses Signal konnte jedoch anhand der durchgeführten Deletionskonstrukte nicht weiter eingengt werden. Eine Möglichkeit besteht in der Notwendigkeit der kompletten 1035 Basen zur funktionellen Retention der mRNA im Zellkern. Um zu ermitteln, ob diese 1035 Basen auch ausreichend zur Retention einer beliebigen mRNA sind, wurde aus den 1035 Basen der *cas* CDS und der nGFP (nuclear Green Fluorescent Protein) Sequenz ein Fusionskonstrukt unter Gal4-Kontrolle hergestellt (Abb. 3.16). Dieses wurde anschließend mit enGal4 in der Epidermis ektopisch exprimiert und neben einer in-situ Hybridisierung gegen den *cas* mRNA-Anteil, zusätzlich das GFP-Signal mithilfe einer Antikörperfärbung nachgewiesen. Sind die ersten 1035 Basen der *cas* CDS ausreichend zur Kernrückhaltung des nGFP, dürfte in einem frühen Embryo, nur ein geringes nGFP Signal zu sehen sein. Aufgrund der sich teilenden Epidermiszellen und der Vermutung dass die Rückhaltung keine 100% beträgt ist trotz funktionierender Rückhaltung mit einem nGFP-Signal zu rechnen. Abb. 3.17 zeigt die ektopische Expression des UAScas1kb:GFP. Dargestellt ist ein Stadium 11 Embryo. Bei den Abbildungen handelt es sich um die Durchschnittsprojektion von 5 übereinandergelegten

Bildebenen. Bei A' handelt es sich um den in A weißumrandeten Bereich, welcher zusätzlich um 90° gedreht wurde. Es wurden eine *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, eine GFP Antikörperfärbung und eine DAPI Färbung durchgeführt. Die in-situ Hybridisierung ist in rot, die GFP Antikörperfärbung in blau und die DAPI Färbung in grün dargestellt. Die Pfeilköpfe markieren die nGFP Antikörperfärbung im *en*-Streifen. Die Pfeile markieren *cas* positive Zellen. Das ektopisch im *en*-Streifen exprimierte Fusionskonstrukt aus den ersten 1035 Basen der *cas* CDS und dem nGFP konnte den Zellkern verlassen und wurde translatiert. Dies zeigt, dass die 1035 Basen höchstwahrscheinlich nicht ausreichen das nGFP im Kern zurückzuhalten. Aufgrund der bereits erwähnten vorliegenden Teilungen der Epidermiszellen oder einer nicht 100%igen Retention des Konstrukts ist dies jedoch nicht eindeutig zu sagen. Bei den Teilabb. B-B''' handelt es sich ebenfalls um Durchschnittpjektionen. B zeigt die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, B' die nGFP Antikörperfärbung, B'' die DAPI Färbung und B''' die zusammengesetzte farbige Darstellung der drei Kanäle. In Abb. B liegt die ektopisch exprimierte *cas* mRNA diffus im *en*-Streifen vor. Hierbei ist zu beachten, dass nur 1035 Bp der *cas* CDS in dem Fusionskonstrukt vorliegen, welche vermutlich von der Sonde nur bedingt erkannt werden. Nichtsdestotrotz wird deutlich, dass das UAS*cas*1kb:GFP-Konstrukt nicht im Kern zurückgehalten wird. Hierfür spricht auch die im Cytoplasma vorliegende Antikörperfärbung des nGFP. Sie ist sehr gut im *en*-Expressionsmuster sichtbar (B'). Bei nGFP handelt es sich um ein kernlokalisiertes Protein, welches nach seiner Translation in den Kern zurücktransportiert wird. Die Fusion mit der ca. 1kb großen Retentionssequenz scheint die für diesen Transport notwendige Sequenz bzw. Faltung nicht zu behindern.

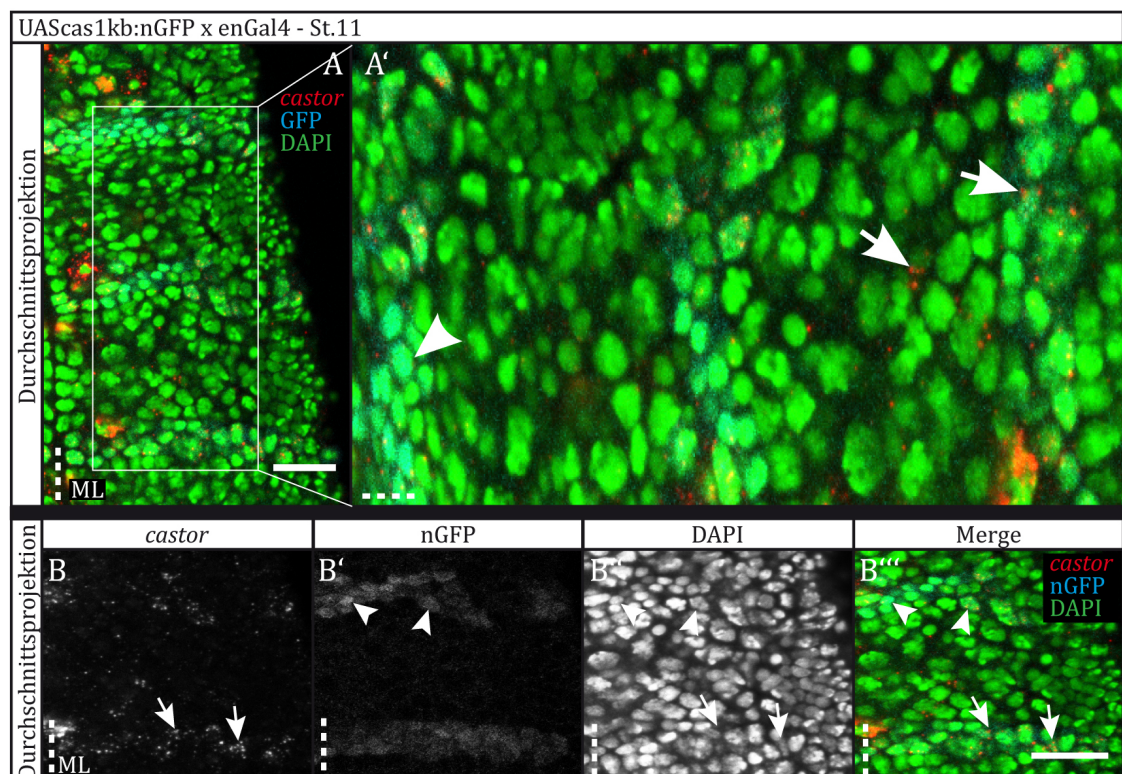


Abb. 3.17: Das erste kb der *cas* CDS reicht nicht zur Kernrückhaltung von nGFP aus. Ektopische Expression des UAS*cas*1kb:GFP Konstrukts in der Epidermis mit enGal4; embryonales St. 11; anterior oben bzw. links (A'), posterior unten bzw. rechts (A'), ML: Mittellinie, Maßstab: 20 µm. A-B''': Durchschnittpjektionen zusammengesetzt aus 5 Einzelebenen. A: Übersicht, A': entspricht weiß umrandeten Segmenten in A, um 90° gedreht. B: *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, B': nGFP Antikörperfärbung, B'': DAPI, B''': zusammengesetzte farbige Darstellung von B-B'', Pfeile: *cas* mRNA in-situ Hybridisierung in rot, nGFP Antikörperfärbung in blau Pfeilköpfe: nGFP Antikörperfärbung.

und DAPI Färbung in grün dargestellt. Zur besseren Orientierung wurden die Pfeilköpfe/Pfeile auch in B' eingefügt. A': Die diffuse Färbung zeigt, dass die ektopisch exprimierte *cas* mRNA nicht im Kern zurückgehalten wird. Die nGFP Färbung in B' macht des Weiteren deutlich, dass das erste kb der *cas* CDS scheinbar nicht für die vollständige Kernrückhaltung von nGFP ausreicht. (Generierung des Konstrukts und Färbungen durchgeführt von Niklas Zimmer).

3.6.2 Der Einbau von Spacersequenzen innerhalb des ersten kbs der *cas* CDS stört die *cas* mRNA Kernrückhaltung

Des Weiteren wurde in Betracht gezogen, dass es sich bei dem Retentionssignal um mehrere, über das erste kb der *cas* CDS, verteilte Sequenzen handeln könnte, die in einem gewissen Abstand zueinander liegen müssen. Besteht das Lokalisationssignal beispielsweise aus zwei Sequenzen im vorderen und hinteren Bereich der 1035 Bp, die einen bestimmten Abstand haben müssen, wären die bisher erhaltenen Ergebnisse erklärbar. In diesem Fall müsste der Austausch der in der Mitte liegenden Sequenzen gegen einen gleichlangen Spacer keinen Einfluss auf die Kernrückhaltung des Konstrukts haben. Um diese Annahmen zu überprüfen, wurden zwei Konstrukte erzeugt, in welchen das mittlere Teilstück der ersten 1035 Bp langen *cas* mRNA-Sequenz durch eine Spacersequenz ersetzt wurde. Bei der verwendeten Fremd-DNA handelt es sich um zwei 207 Bp lange, zufällig ausgewählte Sequenzen des Vektors pUAST-CG4854. Es wurden zwei unterschiedliche Sequenzen ausgetauscht, um die Wahrscheinlichkeit des zufälligen Einbaus eines anderen Lokalisationssignals zu verhindern (siehe Abb. 3.16). Abb. 3.18 zeigt die ektopische Expression der Kreuzung UAS*cas*CG1 mit *enGal4*. Der abgebildete Embryo befindet sich im Stadium 11. Die Teilabb. A und A' sind Maximalprojektionen bestehend aus 3 Ebenen. Hierbei stellt A' den weiß umrandeten Bereich aus A dar. Der Bereich aus A wurde in A' vergrößert und um 90° gedreht. Es wurden eine *cas* mRNA in-situ Hybridisierung (rot), eine Cas Antikörperfärbung (blau) und eine DAPI Färbung (grün) durchgeführt. Die Pfeilköpfe in A' markieren die aus der ektopischen Expression des Konstrukts resultierende *cas* Färbung. Deutlich ist zu erkennen, dass die *cas* mRNA nicht im Zellkern zurückgehalten wird. Der Einbau der 207 Bp langen Sequenz CG1 unterbindet also die Rückhaltung der *cas* mRNA im Zellkern. Die durch den Pfeil markierte Cas Antikörperfärbung zeigt, dass das Protein intakt ist und der Transport in den Zellkern weiterhin funktioniert. Das Einfügen der CG1 Sequenz scheint also zumindest die für den Kerntransport nötige Proteinstruktur nicht zu zerstören. Dies wird auch in den gezeigten Einzelebenen B-B''' deutlich. Abb. B zeigt die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, B' die Cas Antikörperfärbung, B'' die DAPI Färbung und Abbildung B''' die zusammengesetzte farbige Darstellung der drei Kanäle. Bei den gezeigten Bildern B-B''' handelt es sich um repräsentative Fokusebenen der Epidermis. In B lässt sich deutlich erkennen, dass die ektopisch exprimierte mRNA nicht im Kern zurückgehalten wird. Die gezeigte Färbung im Bereich des *en*-Streifens ist eher diffus und die Cas Antikörperfärbung fällt schwach aus. An dem posterior gelegenen Streifen kann jedoch gut die Lokalisierung des Proteins im Kern gezeigt werden. Hervorgehoben werden die Färbungen in der zusammengesetzten Darstellung der drei Kanäle in B'''. Hier markieren die Pfeilköpfe die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung und der Pfeil die Cas Antikörperfärbung. Die Teilabb. C-C''' zeigen eine Einzelebene des Nervensystems. Bei C handelt es sich um die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung und bei C' um die Cas Antikörperfärbung. C'' zeigt die DAPI Färbung und C''' die zusammengesetzte farbige Darstellung der drei Kanäle. In C sind deutlich die großen *cas* positiven Neuroblasten zu erkennen. Hierbei handelt es sich um die endogene

cas mRNA, welche im Kern zurückgehalten wird. Geschieht dies, kann *cas* nicht in Protein translatiert werden, welches an der fehlenden Cas Antikörperfärbung im NS deutlich wird (C''). Eine im Zellkern zentrierte Cas Färbung kann bei den Neuroblasten beobachtet werden, welche sich in der Phase nach der Teilung befinden und somit im Cytoplasma vorliegendes freies *cas* zur Translation zur Verfügung haben. Die endogene *cas* mRNA wird im Neuroblasten im Zellkern zurückgehalten und ist durch den Pfeilkopf markiert (C'''). Der Pfeil markiert die endogene Cas Antikörperfärbung.

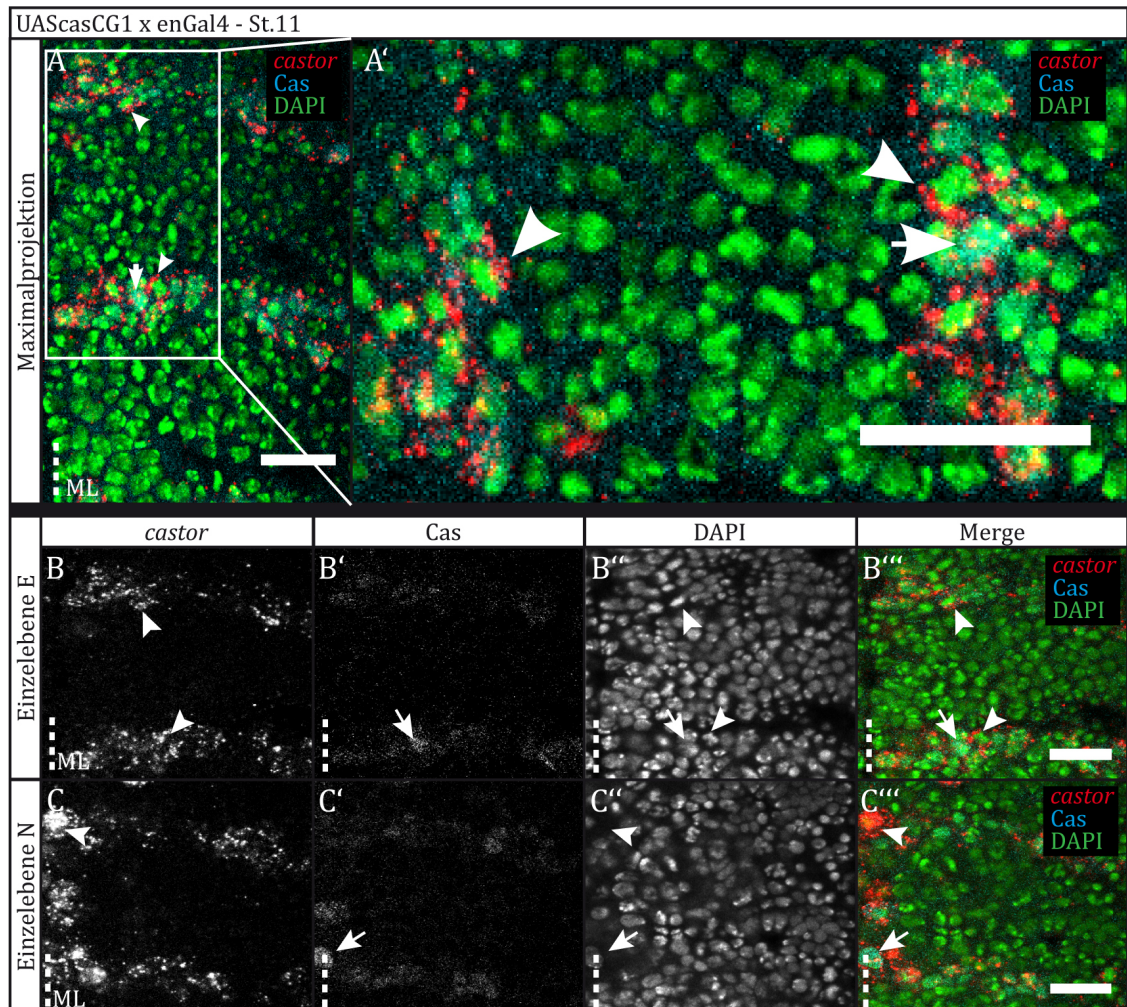


Abb. 3.18: Der Einbau der Spacersequenz CG1 in die *cas* mRNA stört deren Kernrückhaltung. Ektopische Expression des UAScasCG1 Konstrukts in der Epidermis mit enGal4; embryonales St. 11; anterior oben bzw. links (A'), posterior unten bzw. rechts (A'), ML: Mittellinie, Maßstab: 20 μ m, Maximalprojektion zusammengesetzt aus 3 Ebenen. A-A': Maximalprojektion, A: Übersicht, A': entspricht weiß umrandeten Segmenten in A, gedreht um 90°. B-B''': Einzelebene Ektoderm (E), B: *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, B': Cas Antikörperfärbung, B'': DAPI, B''': zusammengesetzte farbige Darstellung von B-B''. C-C''': Einzelebene Nervensystem (N), C: *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, C': Cas Antikörperfärbung, C'': DAPI, C''': zusammengesetzte farbige Darstellung von C-C''. Pfeilkopf: *cas* mRNA, Pfeil: Cas Protein. Zur besseren Orientierung wurden die Pfeilköpfe/Pfeile auch in B'' und C'' eingefügt. *cas* mRNA in-situ Hybridisierung in rot, Cas Antikörperfärbung in blau und DAPI Färbung in grün dargestellt. A' und B''': Das ektopisch exprimierte UAScasCG1 Konstrukt wird nicht im Kern zurückgehalten (Pfeilkopf). Das aus dem ektopisch exprimierten Konstrukt gebildete Protein verhält sich wie das endogene Cas Protein und wird in den Zellkern eingeschleust (Pfeil). C''': Markiert durch den Pfeilkopf ist eindeutig das im Kern lokalisierte, endogene *cas* im zentralen Nervensystem zu erkennen (Pfeilkopf). Auch das endogene Cas Protein ist kernlokalisiert (Pfeil) (Generierung des Konstrukts und Färbungen durchgeführt von Niklas Zimmer).

In der folgenden Abb. 3.19 ist die ektopische Expression des Konstrukts UAScasCG2 mit enGal4 dargestellt. Der abgebildete Embryo befindet sich im Stadium 11. Bei den

Teilabbildungen A und A' handelt es sich um Maximalprojektionen. A' entspricht den weiß umrandeten Segmenten in A und wurde um 90° gedreht. Die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung ist in rot, die Cas Antikörperfärbung in blau und die DAPI Färbung in grün dargestellt. Durch den Einbau der Spacersequenz wird die endogene Zellkernretention der *cas* mRNA unterbunden und die mRNA vorzeitig aus dem Kern entlassen. Dies ist vor allem im rechts gelegenen enGal Expressionsstreifen (A') gut sichtbar (Pfeilköpfe). Trotz der Zerstörung der Kernrückhaltesequenz der *cas* mRNA scheint die Cas Proteinfaltung nicht erheblich beeinflusst zu sein, da der endogene Transport in den Zellkern weiterhin funktioniert (Pfeile). Die Einzelebene E (B-B''') zeigt die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung (B), die Cas Antikörperfärbung (B'), die DAPI Färbung (B'') und die zusammengesetzte farbige Darstellung der drei Kanäle in der Epidermis (B'''). Es ist deutlich zu erkennen, dass die ektopisch exprimierte *cas* mRNA diffus im Expressionsbereich des *en* Streifens verteilt ist und die eingebaute Spacersequenz die Kernretention unterbindet. Dass der Rücktransport des Cas Proteins in den Kern jedoch trotz Sequenzaustausch weiterhin funktioniert, ist in B' und B''' gut zu erkennen und durch den Pfeil markiert. Die Pfeilköpfe in B''' markieren die ektopische *cas* mRNA in-situ Hybridisierung. Schaut man sich die *cas* Färbung im Nervensystem an fällt direkt die Lokalisierung der mRNA im Zellkern auf (C). Hierbei handelt es sich um die endogene *cas* mRNA. In C' ist die Cas Antikörperfärbung dargestellt. C'' zeigt die DAPI Färbung und C''' die zusammengesetzte farbige Darstellung der drei Kanäle. Auch hier sind durch die Pfeilköpfe die endogene im Zellkern retentierte *cas* mRNA und durch den Pfeil das Cas Protein markiert.

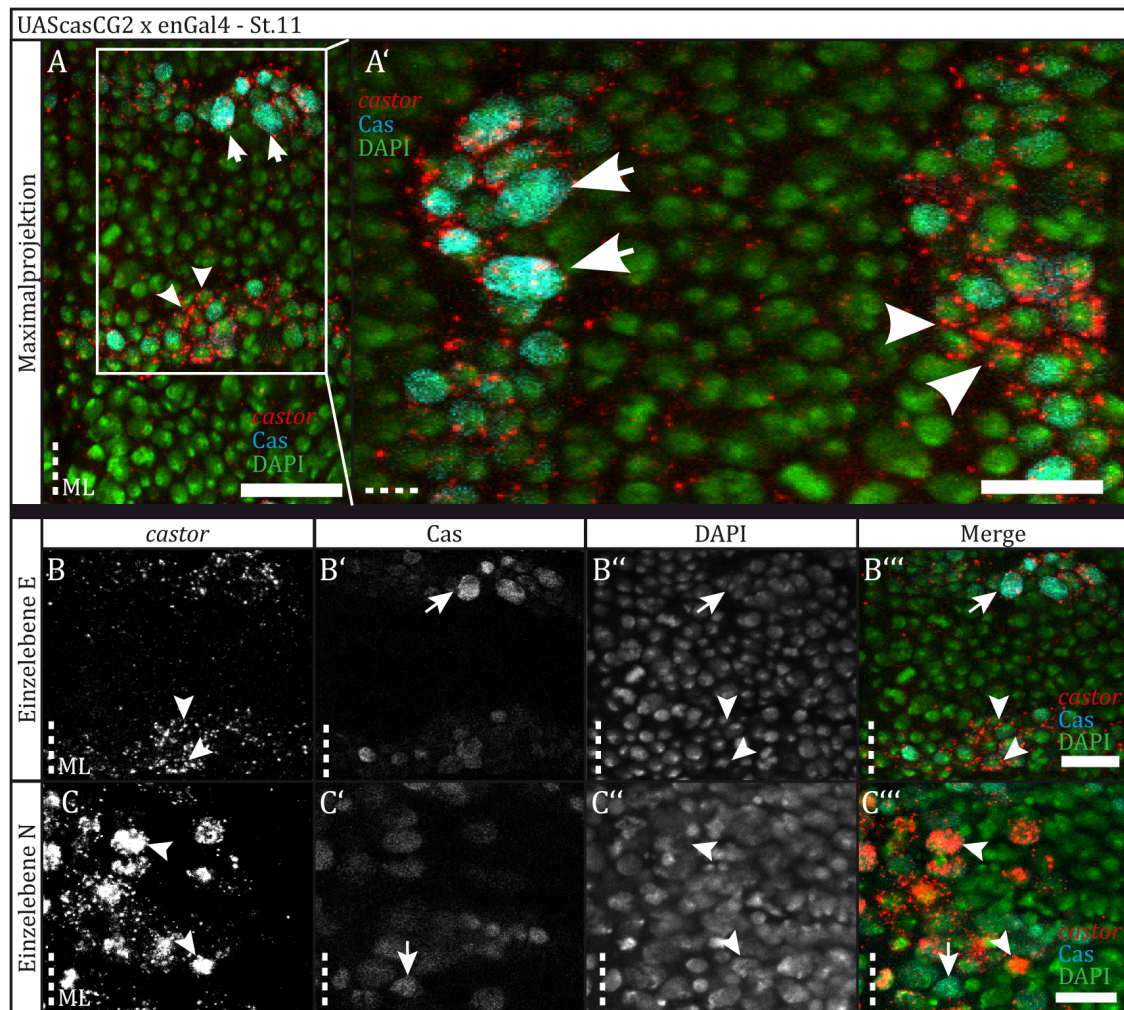


Abb. 3.19: Der Einbau der Spacersequenz CG2 in die *cas* mRNA stört deren Kernrückhaltung. Ektopische Expression des UAScasCG2 Konstrukts in der Epidermis mit enGal4; embryonales St. 11; anterior oben bzw. links (A'), posterior unten bzw. rechts (A'), ML: Mittellinie, Maßstab: 20 μ m, Maximalprojektion zusammengesetzt aus 3 Ebenen. A-A': Maximalprojektion, A: Übersicht, A': entspricht weiß umrandeten Segmenten in A, gedreht um 90°. B-B''': Einzel Ebene Ektoderm (E), B: *cas* mRNA Hybridisierung, B': Cas Antikörperfärbung, B'': DAPI, B''': zusammengesetzte farbige Darstellung von B-B''. C-C''': Einzel Ebene Nervensystem (N), C: *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, C': Cas Antikörperfärbung, C'': DAPI, C''': zusammengesetzte farbige Darstellung von C-C''. Pfeilkopf: *cas* mRNA, Pfeil: Cas Antikörperfärbung. Zur besseren Orientierung wurden die Pfeilköpfe/Pfeile auch in B'' und C'' eingefügt. *cas* mRNA in-situ Hybridisierung in rot, Cas Antikörperfärbung in blau und DAPI Färbung in grün dargestellt. A' und B''': Das ektopisch exprimierte UAScasCG2 Konstrukt wird nicht im Kern zurückgehalten (Pfeilköpfe). Das aus dem ektopisch exprimierten Konstrukt gebildete Protein verhält sich wie das endogene Cas Protein und wird in den Zellkern eingeschleust (Pfeile). C''': Markiert durch die Pfeilköpfe ist eindeutig die im Kern lokalisierte endogene *cas* mRNA im zentralen Nervensystem zu erkennen. (Generierung des Konstrukts und Färbungen durchgeführt von Niklas Zimmer).

3.7 Das dlmp-Bindemotiv ist notwendig für die *cas* mRNA-Kernrückhaltung

Bisher konnte gezeigt werden, dass die ersten 1035 Basen der CDS von *cas* notwendig, jedoch nicht ausreichend sind zur nuklearen Retention der *cas* mRNA. Die gezielten In-frame-Deletionen konnten das Retentionssignal nicht weiter einengen. Daher wurde auf eine andere Technik zurückgegriffen und nach Sequenzmotiven gesucht, von denen bereits gezeigt werden konnte, dass sie an der Lokalisation von mRNA beteiligt sind.

Hierbei wurde eine vielversprechende Sequenz innerhalb des eingegrenzten Sequenzbereiches von 1kb lokalisiert. Es handelt sich um das Bindemotiv des RNA-Bindeproteins *Drosophila* Insulin-like Growth-Faktor-II mRNA-Bindeprotein (dImp). dImp wird während der embryonalen Entwicklung des Nervensystems im Gehirn, dem ventralen Nervenstrang und dem peripheren Nervensystem exprimiert und ist unabdingbar für die neurale Stammzellentwicklung (Adolph *et al.*, 2009; Nielsen *et al.*, 2000). Das Bindemotiv, welches von dImp erkannt und gebunden wird, besteht aus den beiden Sequenzen CGGAC und ACACCC. Diese müssen sich in einem bestimmten Abstand zueinander befinden (Patel *et al.*, 2011). Das gleiche Bindemotiv wurde erstmals innerhalb der 3' UTR der β -Aktin mRNA, einem Ortholog von dImp, des Hühnchens gefunden (siehe Abb. 3.20). Hier konnte gezeigt werden, dass eine 54 Bp lange Sequenz, welche von ZBP-1 erkannt wird, zur Lokalisation der β -Aktin mRNA in den wachsenden Fortsätzen von Fibroblasten notwendig ist (Kislauskis *et al.*, 1993; Kislauskis *et al.*, 1994; Lawrence und Singer, 1986). Innerhalb der 54 Bp wurden die Motive GGACT, AATGC und eine besonders AC-reiche Region als essenziell für die Aktivität der Bindung identifiziert (Kislauskis *et al.*, 1994; Kislauskis *et al.*, 1997; Ross *et al.*, 1997). Das Motiv ACACCC ist hierbei in den unterschiedlichsten Spezies konserviert (Yaffe *et al.*, 1985). Aufgrund der übereinstimmenden Bindemotive und der Expression im embryonalen Nervensystem von *D. melanogaster* wurde in den folgenden Experimenten dieser Arbeit untersucht, ob dImp in die Kernretionen der *cas* mRNA involviert ist. Die Analyse der *cas* mRNA-Sequenz ergab, dass innerhalb der *cas*-CDS das dImp-Sequenzmotiv (CGGAC und ACACCC) zweimal vorliegt (Abb. 3.21).



Abb. 3.20: Die ZBP-1-Lokalisationssequenz der β -Aktin mRNA im Hühnchen. Die schwarzen Dreiecke markieren den von Kislauskis *et al.* identifizierten Zipcode innerhalb der 54 Bp langen β -Aktin mRNA-Lokalisationssequenz (Kislauskis *et al.*, 1994). Die weißen Dreiecke markieren die von Ross *et al.* identifizierten ZBP-1 Bindemotive (ACACCC) (Ross *et al.*, 1997).

Das Sequenzmotiv tritt innerhalb der ersten 1035 Basen der *cas*-CDS zweimal in direkter Nachbarschaft auf.



Abb. 3.21: Das dImp-Sequenzmotiv ist zweimal innerhalb des ersten Kbs der *cas*-CDS lokalisiert. Das dImp-Sequenzmotiv besteht aus zwei Teilen, welche innerhalb einer bestimmten Basenzahl aufeinanderfolgen müssen. Der erste Teil des Sequenzmotivs (CGGAC) wurde mit einem schwarzen Dreieck markiert (entsprechend Kislauskis *et al.*, 1994), der zweite Teil (ACACCC) wurde mit einem weißen Dreieck markiert (entsprechend Ross *et al.*, 1997).

3.7.1 Übereinstimmungen im *cas*-Sequenzvergleich zwischen *D. melanogaster* und *D. virilis*

Um die Signifikanz des dImp-Bindemotivs für die Kernrückhaltung der *cas* mRNA abschätzen zu können, wurde ein Sequenzvergleich des *cas* Lokuses von *D. melanogaster* mit dem *cas* Homolog aus *Drosophila virilis* getätigt. Das folgende Alignment zeigt die Übereinstimmungen der *cas*-Sequenz von *D. melanogaster* (Query) mit der Sequenz von *D. virilis* (Sbjct). *cas* trägt in *D. virilis* die Bezeichnung GJ23287 und besitzt eine Länge von 2499 Basen. Es bestehen zwei homologe Bereiche innerhalb der beiden Sequenzen. Der erste übereinstimmende Bereich zwischen den beiden Sequenzen beginnt bei Base 187/*Dmel* bzw. 157/*Dvir* und reicht bis Base 482/*Dmel* bzw. Base 445/*Dvir*. Innerhalb dieses Bereiches besteht eine 78%ige Übereinstimmung zwischen den Sequenzen. Des Weiteren wurden Sequenzbereiche innerhalb dieses Abschnittes der *D. melanogaster* Sequenz festgestellt, welchen keine entsprechenden Basen innerhalb der *D. virilis* Sequenz zugeordnet werden konnten (5 %). Auf den ersten homologen Bereich der beiden *cas*-Sequenzen folgt ein Sequenzbereich von 479 (*D. melanogaster*) bzw. 206 (*D. virilis*) Basen, innerhalb dessen keine signifikante Übereinstimmung der beiden Sequenzen besteht. Der zweite homologe Bereich startet bei den Basen 961/*Dmel* bzw. 651/*Dvir* und endet bei den Basen 1983/*Dmel* bzw. 1679/*Dvir*. Es besteht eine 81%ige Übereinstimmung zwischen diesen beiden Sequenzabschnitten. Die abweichenden Sequenzabschnitte belaufen sich hier auf 2 %. Des Weiteren wurden im vorliegenden Sequenzabgleich auffällige CAG-Triplettwiederholungen innerhalb der *D. melanogaster* Sequenz (Query) grau unterlegt. Auf diese wird in Abschnitt 3.9 und 4.5 Bezug genommen. Eine Konservierung der beiden Abschnitte in *D. virilis* scheint nicht vorzuliegen. Nur im zweiten Abschnitt, welcher in *D. melanogaster* aus 7 Triplettwiederholungen besteht, sind in *D. virilis* ebenfalls CAG-Triplettwiederholungen zu finden (4 CAG-Wiederholungen- grau unterlegt in Sbjct). Dann folgen, nach einer Unterbrechung durch zwei CAA-Wiederholungen, 5 CAG-Triplets.

```

Query  187  CACAAAAATGTCCAACCAAATGGAGTTTATTATGCAACTCTACATGATGAAGTTGATGAA
      ||| | ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
SBJCT  157  CAC-AAAATGTCAAATCAAATGGAATTTATGATGCAGCTTTATATGATGAACCTGCTGCA

QUERY  247  GCAGCAGCAGCAAATGCAGCTCCAGCTTCCGCA---GCAGCAACAGCAGCAGCAGCTGGC
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
SBJCT  216  GCAACAACAACAACAGCAGCAGCAGCAACAGCAACCGCAACAACAACAACAACAGCTGTC

QUERY  304  TGGATACACTTACACACAGAACGAGGATATCTCTAGCAGCA-CATCCGTGCAGCAGCAAC
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
SBJCT  276  AAGCTTTTCCTACACACAGAAAGAGGATATC---AGCAGCAGCA--CATGC--CTGCAAC

QUERY  363  AGCAGCAGCAGCAGGAGCAACTGCAGCAGCCACAGCCAGATCTCCGCAAGACAAGAACGC
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
SBJCT  329  AGCAGCAGCAGCA--A-CAACAGCAGCAGCAGCAGCAACATCAACACAAAACAAGAACGC

QUERY  423  ACAAGCGCATTAGCTCGCAAAACACCAACTGTAGTAGTAGCCGTAGTTGTAGTCCCAATA
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
SBJCT  386  AGAAAAGAACAATTCGCAAAACACGAACTGTAGTAGTAGCCGTAGTTGTAGTCCCAATA

```

-- Keine Sequenzübereinstimmung für 479 Basen (*D. melanogaster*) bzw. 206 Basen (*D. virilis*) --

```
Query 961 CACCAACGCCAGCTCCGAGAAGCTG---CTGTTGTCCGGGCGTCCATCCGCTGGAG--T-C
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 651 CACCAGCGCCAGCACCGAGAAGCTGCTCCTGTTGTCCGGCATAACAGCCGCTGGAGAGTAC

Query 1015 -A--ACCACCGACAGCCTAGACTCACCCAGCATGTATACGCCCGTCAAGCAGCCGGCGGA
      | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 711 GAGCACCACCGACAGCAACGACTCGCCCAGCATGTACAGCCCGTCAAGCAGCCAGCGGA

Query 1072 CTCATCGTACGGACTCATCACACCCGTCGACAGTGATCTGACCCCCAACACACCCCTCCA
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 771 CTCCTCCTACAATGTCGTCACCAGCATCGATAATGAGGCCACATTGAGCACGCCCTGGT

Query 1132 ACCGACCCAAACAATATCCCTGCTG--A-CGCCCGCTCGAGTGAGCAGAGCAAGAGCCT
      || | ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 831 AC--A---AAGCAA-CTCGCTGCTGACACCGCCCGCTCCAGTGATCAGGGCAAGGGCAT

Query 1189 GGTGAGCCTCTCGG--CGGCCAGCGCCTGGATGCTCTGCTCCAGAACGAGGAGGTA-CT
      || || ||| | ||||| || ||||| || ||||| || ||||| ||||| |||
Sbjct 885 TGTGAG--TCTGAGCACGGCCAGCAGCTTGGATGCCTTTCTGCAGAACGAGGA-TAATCT

Query 1246 GAAGAACCTGCGGAAAGTGTCTCTACCTGGAGTGCGAGAACAGCCTGTGCAGGCAGGA
      ||||| ||||| || ||||| || ||||| ||||| || ||||| ||||| |||||
Sbjct 942 AAAGAATCTGCGCAAGGTGTCTCTGATCTGGAGTGCGAGAATACGCTGTGTGCCAGGA

Query 1306 GAACCTGCGGGAGCACTTCCATTGCCACGAGGAGCCCTGCCAGGGCAAGATCCTGAGCAA
      || ||||| ||||| ||||| ||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1002 GACGCTGCGCGAGCATTTCCACTGCTACGATGAGCCCTGCCAGGGCAAGATATTAAGCAA

Query 1366 GAAGGACGACATCATCCGGCACCTGAAGTGGCACAAGAAGCGCAAGGAAAGCCTCAAGCT
      ||||| ||||| || ||| || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||
Sbjct 1062 AAAGGATGACATCATACGCCATCTAAAGTGGCACAAGAAGCGCAAGGAGAGCCTCAAACT

Query 1426 GGGCTTTGCCCGCTTCTCCTCCTCGGACGACTGTGCACCAGCCTACGGAGAGGGTTGCGC
      ||||| ||||| || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1122 GGGCTTTGCACGGTCTCCTCCGCGATGACTGCGCGCCCGCCTATGGCGATGGCTGTGC

Query 1486 CTACAACCTGGAACAGACCCACTACCACTGCGTCTACGAGCACTGTCCCAAGGTGTATGT
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1182 CTACAATTGGAAGCAGACCCACTATCACTGCGTCTACGAGCACTGTCCCAAGGTCTATGT

Query 1546 GAGCACCAGTGACGTCCAGATGCATGCCAATTTCCACCGCAAGGACTCCGAGATCGTGAA
      ||||| ||||| || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1242 GAGCACCAGCGATGTGCAGATGCATGCCAACTTCCATCGCAAGGACTCCGAGATTGTGAA

Query 1606 CGAGGGCTTCCGGCGCTTCCGGGCGCACGAGACCTGCCGCATCGAGGATTGCCCTTTTT
      ||||| ||||| || ||| || ||||| || ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1302 CGAGGGTTTCCGGCGTTTTTCGCGCCACGAGAATTGTCGCATTGAGGATTGCCCTTCTA

Query 1666 CGGCAAGAAGATCTCCCACTACCACTGCTGTGCGGAGGGATGCACCCACACCTTCAAGAA
      ||||| ||||| || ||||| || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1362 CGGCAAGAAGATATCGCACTATCATTTGTTGTGCGGAGGGCTGCAACCACACCTTCAAGAA

Query 1726 CAAGGCCGATATGGACAAGCACAACAACTTACCATCTGAAGGACCACCAGCTGAAGATGGA
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1422 CAAGGCCGATATGGACAAGCACAAGACGTATCATTTGAAGGACTATCAGCTGACGCAGGA

Query 1786 CGGCTTCAAGAAGATCCTGAAGACCGAGGTATGTCCCTTCGACGCCTGCAAGTTCCTCCAC
      ||||| ||||| || ||| || ||||| || ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1482 TGGCTTCAAGAAGATACTCAAACCGAGCAGTGTCCTTTCGAGTCTGCAAGTTCCTCCAC
```

```

Query 1846 CGTCTGCAACCACATCCACTGCGTCCGCGAGGGCTGCGACTACATCCTGCACTCCAGCAG
          || ||||| || || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1542 GGTGTGCAATCATATACACTGCGTTCGCGAGAAGTCAACTACATCCTGCACTCGAGCAG

Query 1906 CCAGATGATCAGCCACAAGAGAAAGCACGATCGTCAGGACGGAGAGCAGGCGTACCAGCA
          ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1602 CCAAATGATTAGCCACAAGCGCAAGCACGATCGCCAGGATGGCGAACAGGCCTATCAGCA

Query 1966 GTTAAAGATCAAGCAGGA 1983
          ||| |||| ||| |||||
Sbjct 1662 GTTCAAGAGCAAACAGGA 1679

```

Die folgende Abb. 3.22 zeigt den Bereich innerhalb der *cas*-Sequenz, welcher das dImp-Bindemotiv enthält. Hierbei ist der Sequenzbereich in *D. melanogaster* (Query) im direkten Vergleich zu GJ23287 aus *D. virilis* (Sbjct) dargestellt. Das Sequenzmotiv befindet sich im zweiten größeren Bereich der beiden konservierten Abschnitte zwischen *D. melanogaster* und *D. virilis*. Es wird deutlich, dass das dImp-Sequenzmotiv teilweise konserviert ist. Der erste Teil des vorderen Sequenzmotivs (CGGAC) ist zu 100 % konserviert, beim zweiten Teil des Motivs (ACACCC) stimmen 3 der 6 Basen überein. Beim ersten Teil des hinteren Sequenzmotivs hingegen stimmt nur eine Base mit dem dImp-Sequenzmotiv überein; im zweiten Teil des Sequenzmotivs sind 5 aus 6 Basen identisch zum ermittelten Sequenzmotiv in *D. melanogaster*. Insgesamt besitzen beide Sequenzmotive zusammengenommen 22 Basen, mit 5 Basen im ersten und 6 Basen im zweiten Teil. In *D. virilis* stimmen 14 der insgesamt 22 Basen mit dem dImp-Sequenzmotiv aus *D. melanogaster* überein. Dies entspricht einem prozentualen Anteil von 64 %. Betrachtet man außerdem die einzelnen Teile der beiden Motivwiederholungen, so fällt auf, dass die beiden mittleren Teile (Teil 2 des vorderen Motivs und Teil 1 des hinteren Motivs) nicht so gut konserviert sind wie die beiden äußeren (Teil 1 des vorderen Motivs und Teil 2 des hinteren Motivs). Diese besitzen eine Übereinstimmung von 10 aus 11 Basen. Dies entspricht einem prozentualen Anteil von 91 %.

```

Query 1015 -A--ACCACCGACAGCCTAGACTCACCCAGCATGTATACGCCCGTCAAGCAGCCGGCGGA
          | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 711 GAGCACCACCGACAGCAACGACTCGCCAGCATGTACACGCCCGTCAAGCAGCCAGCGGA

Query 1072 CTCATCGTACGGACTCATCACACCCGTCGACAGTGATCTGACCCCCAACACACCCCTCCA
          ||| || ||| || |||| | |||| | ||| || || |||||
Sbjct 771 CTCTCCTACAATGTCGTCACCAGCATCGATAATGAGGCCACATTGAGCACGCCCTGGT

```

Abb. 3.22: Der Zipcode ist innerhalb der *cas*-Sequenz von *D. virilis* teilweise konserviert. Query: *cas*-Transkript *D. melanogaster*, Subject (Sbjct): GJ23287 Transkript *D. virilis*. Rot markiert: dImp Zipcode. Teil 1 des vorderen Zipcodes stimmt zu 100 % (CGGAC) überein, Teil 2 zu 50 % (ACCAGC). Teil 1 des hinteren Zipcodes ist zu 20 % konserviert (CAATG), Teil 2 stimmt zu 83,3 % überein (ACGCC).

3.7.2 Die Deletion des dImp-Motives stört die *cas* mRNA-Kernrückhaltung

In Anschluss an die Analyse der *cas*-Sequenz in Bezug auf das dImp-Motiv, sollte getestet werden, ob die Deletion des dImp-Sequenzmotivs ausreichend ist zur Entlassung der *cas* mRNA aus dem Zellkern. Hierfür wurde eine 60 Bp lange In-frame Deletion durchgeführt, welche den Gesamtbereich des sich wiederholenden Zipcodes einschließt. Anschließend wurde das UAS-Deletionskonstrukt mit enGal4 in der Epidermis getrieben. Abb. 3.23 zeigt

das Ergebnis des durchgeführten Experiments. Hierbei ist in A-A'' die ektopische Expression des UAScas-Kontrollkonstrukts dargestellt. A zeigt die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, A' die Lamin Antikörperfärbung und A'' die farbige Zusammensetzung der beiden Kanäle mit der *cas* mRNA in-situ Hybridisierung in rot und der Lamin Antikörperfärbung in grün. Kernständige *cas* mRNA wurde durch die Pfeilköpfe, cytoplasmatische *cas* mRNA durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die ektopische Expression des UAScasDelzip Konstrukts ist in B-B'' dargestellt. Hier zeigt Spalte 1 (B) die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, Spalte 2 (B') eine PI-Färbung und Spalte 3 (B'') die farbige Zusammensetzung der beiden Kanäle. In dieser ist die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung in rot und die PI-Färbung in grün dargestellt. Wie in A'' wurde die cytoplasmatische *cas* mRNA durch Pfeile gekennzeichnet. Die *cas* mRNA-Färbung in B und B'' ist deutlich zu unterscheiden von der *cas* mRNA-Kontrollfärbung in A und A''. Die Färbung ist nicht im Zellkern lokalisiert. Die Deletion der 60 Bp, welche die beiden dImp-Motive einschließt, ist also ausreichend für den frühzeitigen Export der *cas* mRNA aus dem Zellkern. Ob die Deletion der 60 Bp auch hinreichend für einen frühzeitigen Export der *cas* mRNA ist, kann anhand des vorliegenden Experiments nicht belegt werden.

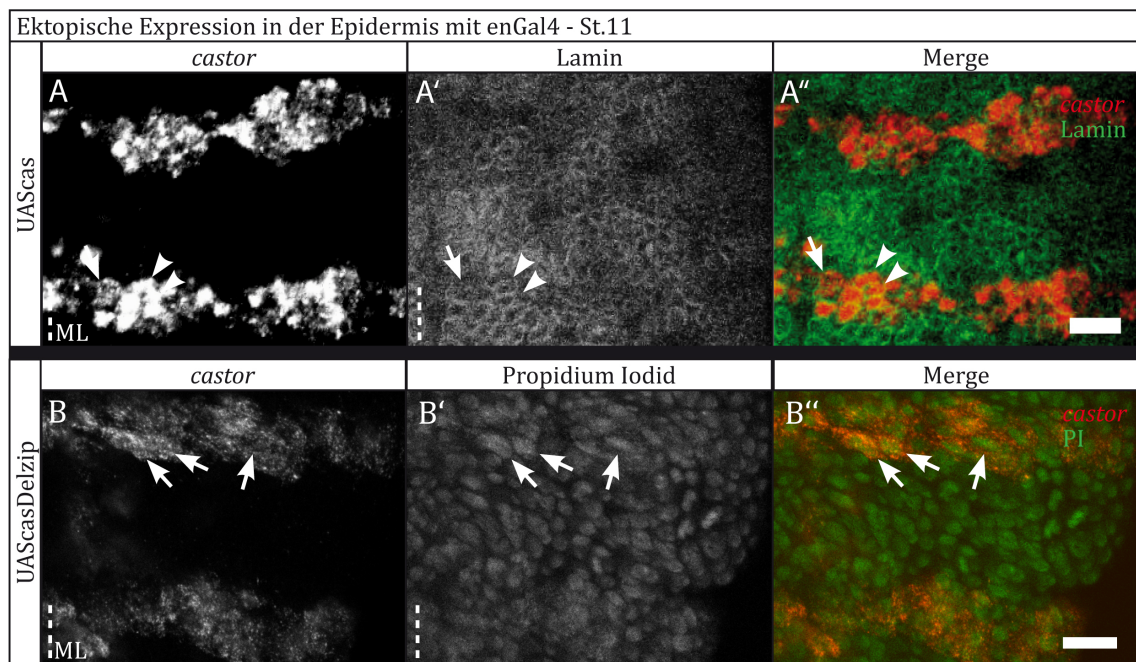


Abb. 3.23: Die Deletion der beiden dImp-Motive ist ausreichend zum frühzeitigen *cas* mRNA-Kernexport. Ektopische Expression des UAScasDelzip Deletionskonstrukts in der Epidermis mit enGal4; embryonales St. 11; anterior oben, posterior unten, ML: Mittellinie, Maßstab: 20 μ m, A-A'': enGal4xUAScas; B-B'': enGal4xUAScasDelzip. In A-A'' zeigt die erste Spalte die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, Spalte 2 die Lamin Antikörperfärbung und Spalte 3 die zusammengesetzte farbige Darstellung beider Kanäle. B-B'': Spalte 1 zeigt die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, Spalte 2 die PI-Färbung und Spalte 3 eine zusammengesetzte farbige Darstellung der beiden Kanäle. Pfeil: *cas* mRNA außerhalb des Zellkerns, Pfeilkopf: *cas* mRNA im Zellkern. Zur besseren Orientierung wurden die Pfeilköpfe/Pfeile auch in A' und B' eingefügt. A-A'': Das UAS-Konstrukt mit der gesamten *cas* CDS ist kernlokalisiert. Abb. B-B'' zeigt, dass die Deletion der beiden dImp-Sequenzmotive ausreichend ist zur frühzeitigen Entlassung der *cas* mRNA aus dem Zellkern.

3.7.3 Die Zerstörung des dImp-Motivs mittels Basenaustausch stört die *cas* mRNA-Kernrückhaltung

Die Deletion eines 60 Basenpaarbereiches, inklusive der beiden dImp-Motive, zeigt die Notwendigkeit desselben für die Zellkernretention der *cas* mRNA. Durch die Eingrenzung des Retentionssignals auf die dImp-Sequenzmotive eröffnete sich die Möglichkeit eines gezielten Basenaustausches. Es wurde daher ein Konstrukt hergestellt, in welchem gezielt Basen innerhalb der dImp-Sequenzmotive ausgetauscht wurden, ohne dabei die Aminosäuresequenz des Cas Proteins zu verändern (Abb. 3.24). Dies war wichtig, um sicherzustellen, dass das ektopisch exprimierte UAS*cas*AtZipcode Konstrukt fehlerfrei in Protein translatiert werden und der Import in den Zellkern korrekt vonstattengehen kann.

GCG GAC TCA TCG TAC GGA CTC ATC ACA CCC GTC GAC AGT GAT CTG ACC CCC AAC ACA CCC
 GCC GAT TCA TCG TAT GGT CTC ATC ACT CCG GTC GAC AGT GAT CTG ACC CCC AAC ACT CCG

Abb. 3.24: Der gezielte Austausch einzelner Basen unter Beibehaltung der endogenen Aminosäuresequenz von Cas. In der oberen Zeile ist die wildtypische *cas*-Sequenz abgebildet. Die untere Zeile zeigt die veränderte Basensequenz im Konstrukt UAS*cas*AtZipcode in rot markiert. Es wurden insgesamt 8 Basen innerhalb der beiden Zipcodes ausgetauscht. Um ein funktionales Cas Protein zu erhalten, wurde die endogene Aminosäuresequenz von Cas nicht verändert. Sie wird in beiden Konstrukten zu der Aminosäuresequenz ADSSYGLITPVDSLTPNTP translatiert.

Abb. 3.25 zeigt das Ergebnis der durchgeführten ektopischen Expression des Konstrukts UAS*cas*AtZipcode mit enGal4 in der Epidermis eines Stadium 11 Embryos. In A-A'' ist die ektopische Expression des UAS*cas*-Kontrollkonstrukts dargestellt. A zeigt die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, A' die Lamin Antikörperfärbung und A'' die farbige Zusammensetzung der beiden Kanäle mit der *cas* mRNA in-situ Hybridisierung in rot und der Lamin Antikörperfärbung in grün. Kernständige *cas* mRNA wurde durch die Pfeilköpfe, cytoplasmatische *cas* mRNA durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die ektopische Expression des UAS*cas*AtZipcode Konstrukts ist in B-B'' dargestellt. In B ist die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, in B' die Cas Antikörperfärbung und in B'' die farbige Überlagerung der beiden Kanäle abgebildet. Hierbei ist die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung rot und die Cas Antikörperfärbung in grün dargestellt. In B'' markieren die Pfeile die cytoplasmatische *cas* mRNA. Bei Auswertung der Färbungen wird ersichtlich, dass der Austausch einiger weniger Basen innerhalb der dImp-Sequenzmotive ausreichend ist zur vorzeitigen Entlassung der *cas* mRNA aus dem Zellkern. In B'' ist deutlich zu sehen, dass nur in Ausnahmefällen eine Überlagerung der beiden Färbungen vorhanden ist. Bei diesen handelt es sich vermutlich um Zellen, welche sich gerade geteilt haben. Die Cas Antikörperfärbung im Zellkern zeigt, dass der Transport des Cas Proteins in diesen funktional ist.

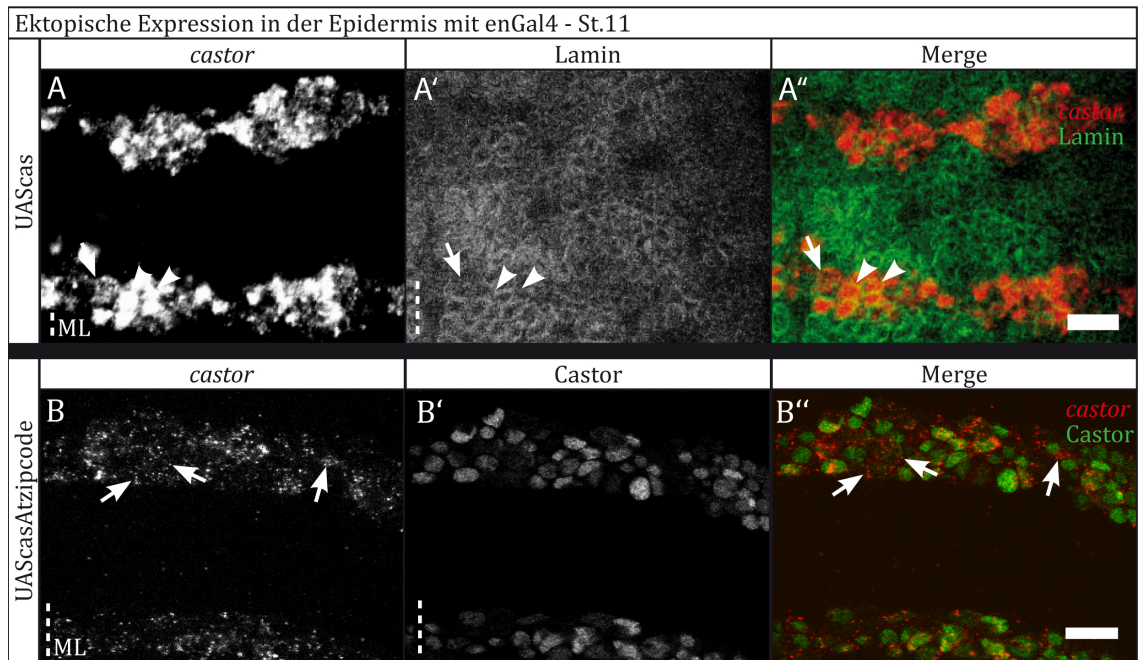


Abb. 3.25: Der Basenaustausch innerhalb der dImp-Motive ist ausreichend zum frühzeitigen *cas* mRNA-Kernexport. Ektopische Expression des UAS*cas*Atzipcode-Deletionskonstrukts in der Epidermis mit enGal4; embryonales St. 11; anterior oben, posterior unten, ML: Mittellinie, Maßstab: 20 μ m, A-A'': enGal4xUAS*cas*; B-B'': enGal4xUAS*cas*Atzipcode. In A-A'' zeigt die erste Spalte die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, Spalte 2 die Lamin Antikörperfärbung und Spalte 3 die zusammengefügte farbige Darstellung beider Kanäle. B-B'': Spalte 1 zeigt die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, Spalte 2 die Cas Antikörperfärbung und Spalte 3 eine zusammengesetzte farbige Darstellung der beiden Kanäle. Pfeil: *cas* mRNA außerhalb des Zellkerns, Pfeilkopf: *cas* mRNA im Zellkern. Zur besseren Orientierung wurden die Pfeilköpfe/Pfeile auch in A' eingefügt. A-A'': Das UAS-Konstrukt mit der gesamten *cas*-CDS ist im Kern lokalisiert. B-B'': Es zeigt sich, dass der gezielte Austausch einiger Basen der dImp-Sequenzmotive, ausreichend ist zur frühzeitigen Entlassung der *cas* mRNA aus dem Zellkern. Hierbei ist zu beachten, dass durch den Basenaustausch keine Veränderung in der Aminosäuresequenz des Cas Proteins erfolgt ist. Der Import des Cas Proteins in den Zellkern ist nicht gestört (B').

3.7.4 Eine Kolokalisation der *cas* mRNA mit dImp ist nicht nachzuweisen

Aufgrund der vorhergehenden Ergebnisse wurde im Folgenden eine mögliche Kolokalisation der *cas* mRNA und dImp untersucht. Hierfür wurde eine fluoreszente *cas* mRNA in-situ Hybridisierung mit anschließender dImp Antikörperfärbung an wildtypischen L3-Wanderlarven kombiniert. Für diesen Versuch wurde, aufgrund der besseren Übersichtlichkeit des Larvenghirns im Gegensatz zum embryonalen ZNS und der Durchführung des RNAi-Versuchs in der Larve (3.7.5), die L3-Larve als Untersuchungsobjekt gewählt. Zum Nachweis der Kernlokalisierung der *cas* mRNA wurde der Zellkern durch eine DAPI Färbung sichtbar gemacht. In dem in Abb. 3.26 dargestellten Bereich des zentralen Nervensystems liegen die Typ I Neuroblasten. Die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung ist in rot und die dImp Antikörperfärbung in grün dargestellt. Des Weiteren ist die *cas* mRNA durch die Pfeilköpfe und das dImp Protein durch die Pfeile markiert (A'-B'''). Eine Kolokalisation von *cas* mRNA und dImp Protein konnte nicht nachgewiesen werden. Die *cas* mRNA liegt in den GMZs kernlokalisiert vor. Die GMZs sind durch ihre direkte Nähe zum NB, in B-B''' weiß umrandet, zu erkennen und ihre Anzahl ist auf 2-6 Zellen pro NB beschränkt. Die dImp Antikörperfärbung beschränkt sich im Gegensatz zur *cas*-Expression nicht auf die GMZs. Sie ist auf die GMZ-Nachkommen beschränkt. Das dImp Protein befindet sich hier ausschließlich im cytoplasmatischen

Bereich der Zellen. Hierbei kann es sich um Neurone oder Glia handeln. Ob die Expression auf eine der beiden Zelltypen beschränkt oder in beiden vertreten ist, lässt sich anhand der vorliegenden Färbung nicht sagen. Der NB selbst ist *cas* und *dImp* negativ.

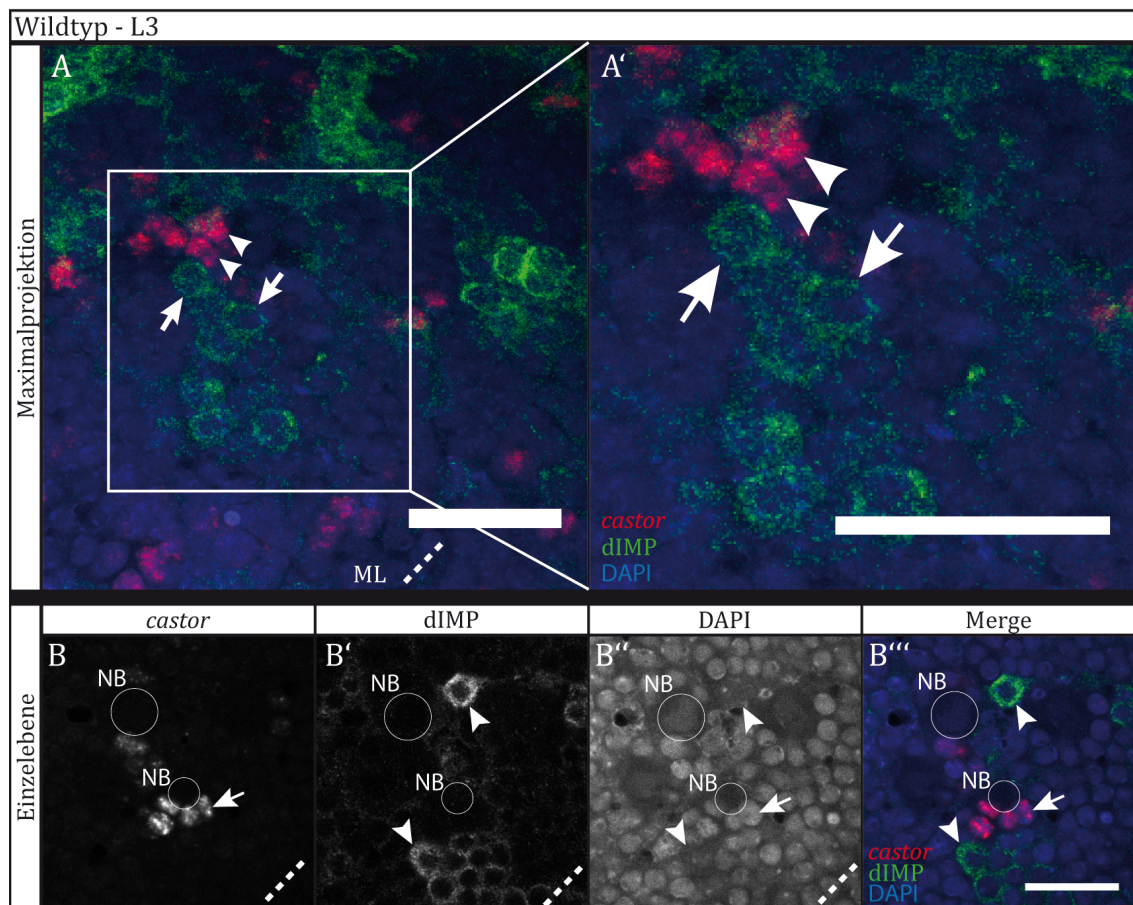


Abb. 3.26: *Cas* mRNA in-situ Hybridisierung und *dImp* Antikörperfärbung an wildtypischer L3-Larve, Typ I. L3-Wanderlarve, anterior rechts oben, posterior links unten, ML: Mittellinie, Maßstab: 20µm, Maximalprojektion zusammengesetzt aus 18 Ebenen. NB: Neuroblast, gekennzeichnet durch weiße Umrandung. A-A': Maximalprojektion, A: Übersicht, A': entspricht weiß umrandeten Segmenten in A. B-B''': Einzelebene, B: *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, B': *dImp* Antikörperfärbung, B'': DAPI, B''': zusammengesetzte farbige Darstellung der Kanäle B-B''. Pfeil: *cas* mRNA im Zellkern, Pfeilkopf: *dImp* Antikörperfärbung. Zur besseren Orientierung wurden die Pfeilköpfe/Pfeile auch in B'' eingefügt. Es besteht keine Kolo-kalisation der beiden Färbungen. Dies wird in B''' noch einmal deutlich hervorgehoben. Der Neuroblast (Typ I) ist weiß umrandet dargestellt. Er ist *cas* und *dImp* negativ. Bei den *cas* positiven Zellen (Pfeil) in direkter Nähe zum Neuroblasten handelt es sich um die GMZs. Daran angrenzend liegen *dImp* positive Zellen (Pfeilköpfe). Die *dImp*-Expression überlappt nicht mit der *cas*-Expression.

Wie auch in der vorhergehenden Abb. ist in Abb. 3.27 ein Teil des zentralen Nervensystems der wildtypischen L3-Larve abgebildet. Hierbei handelt es sich um die Typ II Neuroblasten. Sie unterscheiden sich in Aufbau und Größe ihres Neuroblastenstammbaumes erheblich von den Typ I Neuroblasten (3.26). Durch die INPs besitzt der Typ II Neuroblast eine Zellart, welche dem Typ I NB gänzlich fehlt und damit einen erheblich größeren Zellstammbaum. In Abb. 3.27 sind die *cas* mRNA durch die Pfeilköpfe und die *dImp* Antikörperfärbung durch die Pfeile gekennzeichnet. In der Maximalprojektion A und A' ist deutlich zu erkennen, dass die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung und die *dImp* Antikörperfärbung nicht kolo-kalisieren. Die *cas* mRNA befindet sich weiterhin zum größten Teil im Zellkern lokalisiert. Hierbei beschränkt sich

diese Expression auf eine Anzahl an Zellen in direkter Nähe zum Neuroblasten. Es handelt es sich vermutlich um die INPs. Bei einzelnen Zellen lässt sich eine gleichzeitige *cas*- und dImp-Färbung erkennen, diese überlappen jedoch nicht, da sich die dImp Färbung ausschließlich im cytoplasmatischen Bereich der Zellen befindet. Auch in den repräsentativen Fokusebenen B-B''' lässt sich gut die fehlende Kolokalisation der beiden Färbungen erkennen. B zeigt die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, B' die dImp Antikörperfärbung, B'' die DAPI Färbung und B''' die farbige Darstellung der drei Kanäle. Hierbei markieren die Pfeilköpfe wiederum die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung in rot und die Pfeile die dImp Antikörperfärbung in grün. Ein Typ II Neuroblast ist durch eine weiße Umrandung hervorgehoben. An dem NB finden sich mehrere *cas* positive Zellen. Hierbei könnte es sich um INPs handeln. Dies kann alleinig anhand der Lage jedoch nicht genau bestimmt werden.

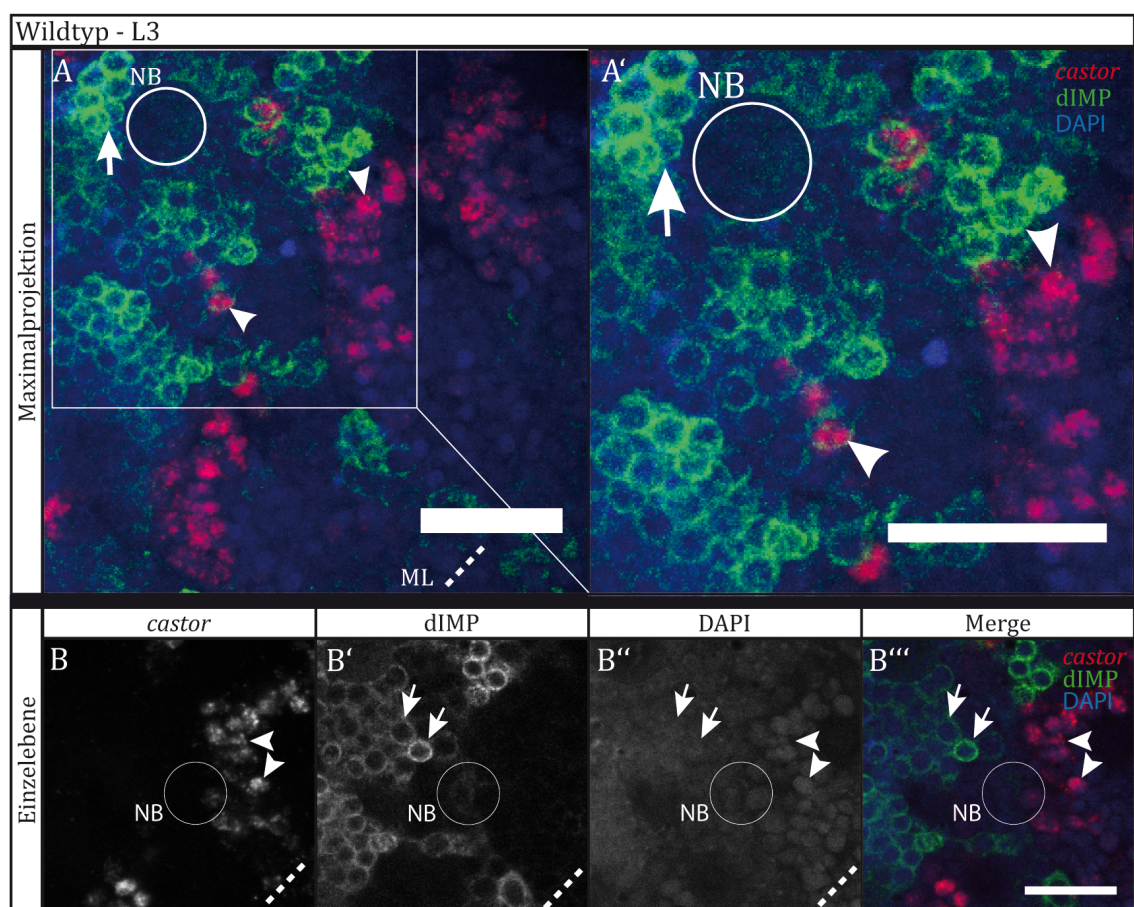


Abb. 3.27: *cas* mRNA in-situ Hybridisierung und dImp Antikörperfärbung an wildtypischer L3-Larve, Typ II. L3-Wanderlarve, anterior rechts oben, posterior links unten, ML: Mittellinie, Maßstab: 20µm, Maximalprojektion zusammengesetzt aus 24 Ebenen. A-A': Maximalprojektion, A: Übersicht, A': entspricht weiß umrandeten Segmenten in A. NB: Neuroblast, gekennzeichnet durch weiße Umrandung. Pfeilkopf: *cas* mRNA im Zellkern, Pfeil: dImp Antikörperfärbung. Zur besseren Orientierung wurden die Pfeilköpfe/Pfeile auch in B'' eingefügt. B-B''': Einzelebene, B: *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, B': dImp Antikörperfärbung, B'': DAPI, B''': zusammengesetzte farbige Darstellung der Kanäle B-B''. In Ausschnitt A' ist die kernlokalisierte *cas* mRNA durch Pfeilköpfe markiert, die dImp Antikörperfärbung durch die Pfeile. Es besteht keine Kolokalisation der beiden Färbungen. Dies wird in B''' noch einmal deutlicher hervorgehoben. Ein Neuroblast (Typ II) ist weiß umrandet dargestellt. Er ist *cas* negativ. Die dImp positiven Zellen um den NB zeigen eine im Cytoplasma lokalisierte Färbung (Pfeile).

3.7.5 Der dImp Knock-down mittels RNAi zeigt keinen Phänotyp

Um festzustellen, ob dImp einen Einfluss auf die Kernlokalisierung der *cas* mRNA hat, wurde ein RNAi Experiment an der Larve durchgeführt. Hierfür wurde der RNAi Stamm KK107199 mit dem Fliegenstamm InscGal4 verkreuzt. Dies führt zu einem Abbau von *dImp* und folglich zu einer Unterbindung der *dImp* Translation. Anhand einer *cas* mRNA in-situ Hybridisierung wurde anschließend untersucht, ob eine vorzeitige Entlassung der *cas* mRNA aus dem Kern ins Cytoplasma erfolgte. In Abb. 3.28 ist das Ergebnis dieses Experimentes dargestellt. A und A' zeigen eine Maximalprojektion des Gehirns einer L2-Larve. Die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung ist in rot und die dImp Antikörperfärbung in grün dargestellt. Zur Kenntlichmachung des Zellkerns wurde zusätzlich eine DAPI Färbung, in blau dargestellt, durchgeführt. In Abb. A' lässt sich die Kernrückhaltung der *cas* mRNA beobachten. Deutlicher wird es in den Teilabb. B-B'''. Hier ist in B die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, in B', die als Kontrolle dienende, dImp Antikörperfärbung, in B'' die DAPI Färbung und in B''' die zusammengesetzte farbige Darstellung der 3 Kanäle abgebildet. Die repräsentative Fokusebene zeigt in B''' die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung mit der zentriert im Zellkern vorliegenden *cas* mRNA. Diese ist in rot dargestellt und durch Pfeilköpfe markiert. Außerhalb des Zellkerns auftretende *cas*-Färbung ist durch Pfeile markiert. Weiterhin ist der NB weiß umrandet dargestellt. Er verbleibt wie auch in der wildtypischen Larve *cas* und dImp negativ. Anhand der Abb. lässt sich sagen, dass die Unterbindung der dImp-Translation keinerlei Einfluss auf die Kernretention der *cas* mRNA zu haben scheint. Sie bleibt weiterhin im Kern lokalisiert. Da es nahezu keinerlei Überlappung der *cas* mRNA in-situ Hybridisierung und dImp Antikörperfärbung gab (vergleiche 3.26 und 3.27), war dieses Ergebnis zu erwarten.

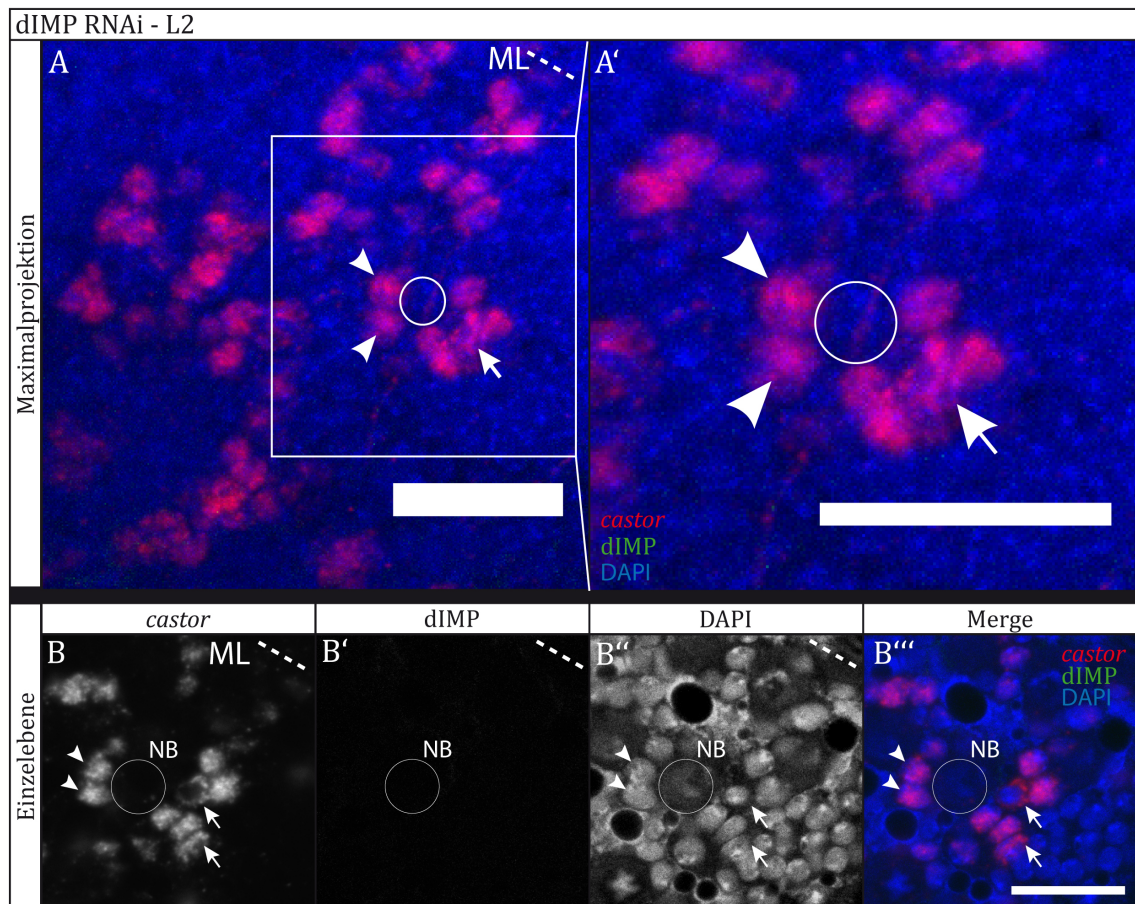


Abb. 3.28: dImp Knock-down mittels RNAi zeigt bezüglich der *cas* mRNA keinen Phänotyp. L2-Larve, anterior links oben, posterior rechts unten, ML: Mittellinie, Maßstab: 20µm, Maximalprojektion zusammengesetzt aus 48 Ebenen. NB: Neuroblast, hervorgehoben durch weiße Umrandung. A-A': Maximalprojektion, A: Übersichtsdarstellung der linken Hirnhemisphäre, A': entspricht weiß umrandeten Segmenten in A. Pfeilkopf: *cas* mRNA im Zellkern, Pfeil: *cas* mRNA außerhalb des Zellkerns. Zur besseren Orientierung wurden die Pfeilköpfe/Pfeile auch in B'' eingefügt. B-B''': Einzelebene, B: *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, B': dImp Antikörperfärbung, B'': DAPI, B''': zusammengesetzte farbige Darstellung der Kanäle B-B''. In A' und B''' ist die kernlokalisierte *cas* mRNA durch Pfeilköpfe und die cytoplasmatische *cas* mRNA durch die Pfeile markiert. Der Neuroblast (Typ I) ist weiß umrandet dargestellt. Er ist *cas* und dImp negativ. Verglichen mit der endogenen *cas* mRNA-Expression lässt sich durch den dImp Knock-down kein Unterschied im *cas*-Expressionsmuster feststellen (B''').

3.8 Der *grk* mRNA-Lokalisationskomplex scheint nicht an der *cas* mRNA-Lokalisation beteiligt zu sein

Im folgenden Ergebnisteil wurde der Frage nachgegangen, ob ein bereits bekannter RNA-Bindekomplex an der Kernlokalisierung der *cas* mRNA beteiligt sein könnte. Erste Hinweise auf eine Beteiligung lieferte das in der *cas*-CDS lokalisierte dImp-Sequenzmotiv. Neben dImp als Komplexpartner sind die Proteine Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein at 27C (Hrb27C, auch Hrp48), Squid (Sqd) und Syncrip (Syp) Teile dieser Maschinerie. Es ist bereits bekannt, dass dieser Komplex die Lokalisation der *grk* mRNA am dorso-anterioren Pol der Oozyte vermittelt. Anhand von Antikörperfärbungen wurde eine Koexpression der *cas* mRNA und den oben genannten Kandidaten untersucht. Eine Kolo-kalisation spräche für die Involvierung der Kandidaten in die Kernretention der *cas* mRNA.

3.8.1 Antikörperfärbungen der Komplexbeteiligten

Es wurde durch eine *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, in Verbindung mit Antikörperfärbungen der jeweiligen Kandidaten (Hrp48, Sqd und Syp) untersucht, ob eine Kolokalisation der beiden Faktoren vorliegt. Alle Färbungen wurden in der L3-Larve durchgeführt. Der Pfeilkopf markiert in allen Fällen die kernlokalisierte *cas* mRNA und der Pfeil die jeweilige Antikörperfärbung der Kandidaten. Zum besseren Vergleich der Färbungen ist in Abb. 3.29 auch die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung in Verbindung mit einer Cas Antikörperfärbung dargestellt (A-A''). In A und A' ist deutlich die Kernlokalisation von *cas* mRNA und Cas Protein zu erkennen. Diese befinden sich jedoch in unterschiedlichen Zelltypen. Die Expression von *cas* beschränkt sich auf die neben dem Neuroblasten liegenden GMZs, während das Cas Protein auf die Nachkommen der GMZs beschränkt ist. Dies lässt sich deutlich in A''' erkennen. Hierbei handelt es sich um eine zusammengesetzte farbige Darstellung der Kanäle A-A''. Die *cas* mRNA ist in rot und das Cas Protein in grün dargestellt. Zur Hervorhebung des Zellkerns wurde dieser mit DAPI gefärbt und ist in blau abgebildet. Der Neuroblast ist *cas* mRNA und Cas Protein negativ. In den GMZs ist deutlich die kernlokalisierte *cas* mRNA zu erkennen (Pfeilkopf). Hier liegt noch kein Cas Protein vor, da die mRNA im Kern zurückgehalten und nicht translatiert wird. In den Nachkommen der GMZs befindet sich Cas Protein im Zellkern (markiert durch den Pfeil). In Zeile B ist die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung in Kombination mit einer Antikörperfärbung gegen Hrp48 dargestellt. Deutlich ist in B''' die kernlokalisierte *cas* mRNA, in rot dargestellt, in den GMZs zu erkennen (Pfeilkopf). Das Hrp48 Protein ist in grün (Pfeil), die PI-Färbung in blau dargestellt. Der Neuroblast verbleibt wie erwartet *cas* negativ. Er ist jedoch positiv für das Hrp48 Protein, welches sich im Cytoplasma des Neuroblasten befindet (weiß umrandet). Auch die Nachkommenzellen des Neuroblasten (GMZs und Neurone/Glia) verbleiben Hrp48 positiv. Da es sich jedoch immer im cytoplasmatischen Bereich der Zelle befindet, liegt keine Kolokalisation mit der *cas* mRNA vor. Dies wird vor allem in den GMZs deutlich. Ein ähnliches Bild zeigt sich in den Abb. C-C'''. Hier wurde neben der *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, eine Sqd Antikörperfärbung durchgeführt (*cas* in rot, Sqd in grün und PI in blau). Auch hier ist die *cas* mRNA durch die Pfeilköpfe und die Sqd Antikörperfärbung durch einen Pfeil gekennzeichnet. Der NB (weiß umrandet) ist wie im vorherigen Beispiel negativ für *cas* und positiv für Sqd. Umgekehrtes gilt für die GMZs. Diese sind positiv für *cas*, aber negativ für Sqd. Auch im Falle von Sqd ist keine Kolokalisation mit der *cas* mRNA vorhanden. Ein weiteres Mitglied des *grk* Komplexes ist das Protein Syncrip. Daher wurde auch eine mögliche Kolokalisation des Syp Proteins mit der *cas* mRNA in Betracht gezogen und untersucht. Abb. D-D''' zeigt die durchgeführten Färbungen. In D''' ist die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung in rot, die Syp Antikörperfärbung in grün und PI in blau dargestellt, wobei die *cas* mRNA-Färbung durch die Pfeilköpfe und die Syp Antikörperfärbung durch die Pfeile markiert wurden. Der Neuroblast verbleibt *cas* negativ, ist jedoch positiv für das Syp Protein. Die an den NB angrenzenden GMZs sind positiv für *cas* und Syp, wobei sich Ersteres im Zellkern und Zweites im Cytoplasma befindet. Aufgrund der Kernständigkeit der *cas* mRNA und der cytoplasmatischen Lokalisation des Syp Proteins liegt keine Kolokalisation der beiden Faktoren in den GMZs vor. Die aus den GMZs entstandenen Neurone/Glia sind negativ für die *cas* mRNA und positiv für Syp. Anhand der dargelegten Ergebnisse wird eine Involvierung der Kandidaten (Hrp48, Sqd und Syp) in die Kernrückhaltung der *cas* mRNA

als unwahrscheinlich betrachtet. Auf weitere Experimente in dieser Richtung wurde daher verzichtet.

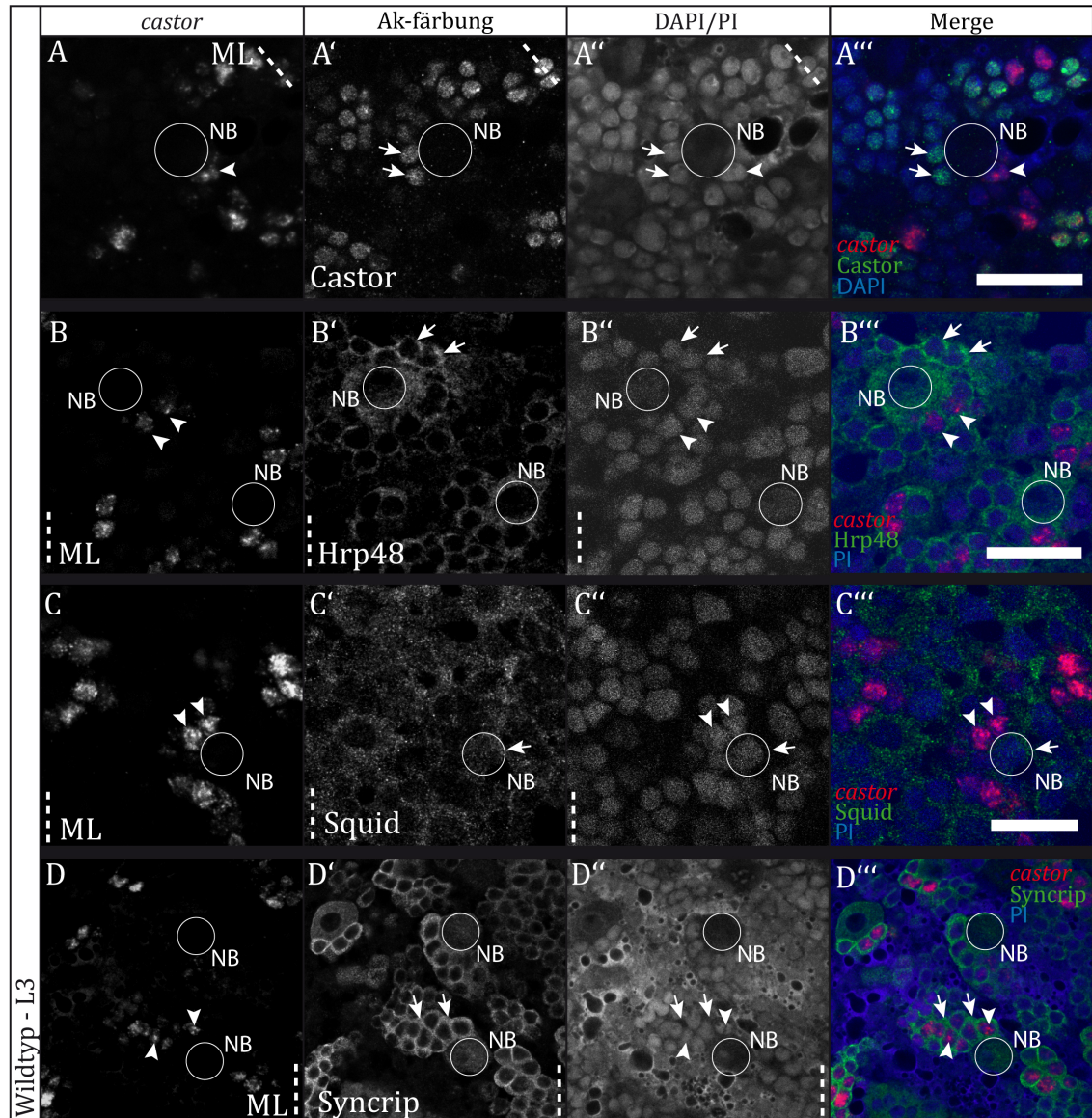


Abb. 3.29: Es besteht keine Kollokalisierung zwischen der *cas* mRNA und den Antikörperfärbungen der Kandidaten. L3-Wanderlarve, ML: Mittellinie, Maßstab: 20µm, Einzelebene. A-A''': anterior links oben, posterior rechts unten. NB: Neuroblast, hervorgehoben durch weiße Umrandung. A: *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, A': Cas Antikörperfärbung, A'': DAPI, A''': zusammengesetzte farbige Darstellung der Kanäle A-A''. B-B''': anterior oben, posterior unten, B: *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, B': Hrp48 Antikörperfärbung, B'': PI, B''': zusammengesetzte farbige Darstellung der Kanäle B-B''. C-C''': anterior oben, posterior unten, C: *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, C': Squid Antikörperfärbung, C'': PI, C''': zusammengesetzte farbige Darstellung der Kanäle C-C''. D-D''': anterior oben, posterior unten, D: *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, D': Syncrip Antikörperfärbung, D'': PI, D''': zusammengesetzte farbige Darstellung der Kanäle D-D''. Pfeilkopf: *cas* mRNA, Pfeil: Antikörperfärbung des jeweiligen Kandidaten. Zur besseren Orientierung wurden die Pfeilköpfe/Pfeile auch in A'', B'', C'' und D'' eingefügt. A''': *cas* mRNA in rot, Cas in grün, DAPI in blau. Der NB ist *cas* und Cas negativ. GMZs sind *cas* positiv und Cas negativ. GMZ Nachkommen sind *cas* negativ und Cas positiv. Beide Faktoren sind kernständig. Es besteht keine Kollokalisierung zwischen der *cas* mRNA und dem Cas Protein. B''': *cas* mRNA in rot, Hrp48 in grün, PI in blau. Der Neuroblast ist *cas* negativ und Hrp48 positiv. GMZs sind *cas* und Hrp48 positiv, wobei die *cas* mRNA im Kern vorliegt und sich das Hrp48 Protein im Cytoplasma befindet. GMZ Nachkommen sind *cas* negativ und Hrp48 positiv. Auch wenn beide Faktoren zum Teil in den gleichen Zellen exprimiert werden, liegt aufgrund der *cas* Kernständigkeit und der cytoplasmatischen Lokalisation des Hrp48 Proteins keine Kollokalisierung vor. C''': *cas* mRNA in rot, Sqd in grün, PI in blau. Der Neuroblast ist *cas* negativ und Sqd positiv. GMZs sind *cas* positiv und Sqd negativ. GMZ Nachkommen sind *cas* negativ. In allen

vorhandenen *cas* negativen Zellen ist eine leichte Sqd Färbung zu erkennen. Es besteht keine Kolokalisation zwischen der *cas* mRNA und dem Sqd Protein. D^{'''}: *cas* mRNA in rot, Syp in grün, PI in blau. Der Neuroblast ist *cas* negativ und Syp positiv. GMZs sind *cas* und Syp positiv, wobei die *cas* mRNA im Kern vorliegt und sich das Syp Protein im Cytoplasma befindet. GMZ Nachkommen sind *cas* negativ und Syp positiv. Auch wenn beide Faktoren zum Teil in den gleichen Zellen exprimiert werden, liegt aufgrund der Kernständigkeit der *cas* mRNA und der cytoplasmatischen Lokalisation des Syp Proteins keine Kolokalisation vor.

3.9 Eine Triplet-Wiederholung innerhalb der *cas* mRNA könnte in die Kernretention involviert sein

Es ist allgemein bekannt, dass ausgedehnte Triplet-Wiederholungen in mRNAs wichtige Faktoren in der Entwicklung verschiedenster Krankheiten sein können, wie beispielsweise Huntington und Myotone Dystrophie. Bei Myotone Dystrophie handelt es sich um eine autosomal-dominante neuromuskuläre Krankheit, welche durch eine extreme Expansion des Triplets CTG bzw. CUG in der 3'UTR der Myotone Dystrophie Proteinkinase (DMPK) hervorgerufen wird. Die mutanten Transkripte werden nicht ins Cytoplasma entlassen, sondern bilden stabile Cluster im Zellkern (nuclear foci), welche an die nukleare Matrix gekoppelt sind (Davis *et al.*, 1997; Taneja *et al.*, 1995). In Patienten konnte gezeigt werden, dass diese stabilen Cluster neben dem CUG-wiederholenden Transkript, das Protein Muscleblind-like (MBNL) enthalten (Ho *et al.*, 2004). Houseley *et al.* konnten dies 2005 auch in *Drosophila* nachweisen. Wie im Patienten formen ausgedehnte CUG Wiederholungen nukleare Cluster welche mit Muscleblind (Mbl) kolokalisieren (Houseley *et al.*, 2005). Bei Mbl handelt es sich um ein RNA-Bindeprotein, welches in die Prozesse des alternativen Spleißens und der Transkriptlokalisierung involviert ist. Die Formation der nuklearen Cluster könnte einen Mechanismus zur Verhinderung des Exports fehlerhafter Transkripte darstellen (Davis *et al.*, 1997). Dieser Mechanismus wurde auch für die vorliegende Kernretention der *cas* mRNA in Erwägung gezogen. Anhand von Sequenzanalysen konnte in der *cas* mRNA eine auffällige Anzahl an CAG-Triplet-Wiederholungen festgestellt werden (siehe auch 3.7.1). Die CAG-Wiederholungen finden sich vermehrt innerhalb der ersten 700 Bp. Hier konnten zwei Sequenzbereiche mit einmal sechs und einmal sieben aufeinanderfolgenden CAG-Wiederholungen ermittelt werden. Beide Abschnitte werden nach den ersten beiden CAGs von einem CAA-Triplett unterbrochen. Des Weiteren befindet sich im Bereich der Basenpaare 1.900-2.300 ein Sequenzabschnitt mit zehn aufeinanderfolgenden CAG-Triplet-Wiederholungen. Mit insgesamt 126 CAG-Wiederholungen in der gesamten *cas* mRNA ist deren Anzahl gegenüber zufällig ausgewählten Triplet-Wiederholungen um das dreifache erhöht. Im Weiteren wurde anhand von Antikörperfärbungen und RNAi Experimenten eine mögliche Involvierung von Mbl in die Kernretention der *cas* mRNA untersucht.

3.9.1 Es besteht eine Kolokalisation zwischen Cas und Mbl

Zunächst wurde eine mögliche Koexpression von *cas* und *mbl* untersucht. Hierfür wurden an wildtypischen L3-Wanderlarven Cas und Mbl Antikörperfärbungen durchgeführt und das Expressionsmuster ausgewertet. Abb. 3.30 zeigt ein wildtypisches Larvengehirn, an welchem neben den Cas (rot) und Mbl (grün) Antikörperfärbungen zusätzlich eine DAPI Färbung (blau) durchgeführt wurde. Die Teilabb. A und A' zeigen Maximalprojektionen, welche aus 27 Ebenen zusammengesetzt wurden. Bei dem gezeigten Ausschnitt handelt es

sich um den medialen Bereich der linken Hirnhemisphäre. Hier befinden sich die Typ I Neuroblasten. A' entspricht dem weißumrandeten Bereich aus A. Cas positive Zellen sind durch die Pfeilköpfe markiert und Mbl positive Zellen durch die Pfeile. Teilabb. A' zeigt eine Kolokalisation der beiden Antikörperfärbungen. Erkennbar ist dies an der orangefarbenen Färbung der durch die Pfeilköpfe markierten Zellen. Die orangefarbene Färbung ergibt sich durch die Überlagerung der in rot dargestellten Cas und der in grün dargestellten Mbl Antikörperfärbungen. Ausgenommen von dieser Koexpression ist der NB, welcher nur Mbl positiv ist. Deutlicher wird dies in den gezeigten Einzelebenen (B-C'''). B-B''' zeigen eine Einzelebene aus dem Bereich der Typ I Neuroblasten, C-C''' repräsentieren eine Einzelebene aus dem Bereich der Typ II Neuroblasten. In beiden Fällen lassen sich überlappende Expressionsbereiche feststellen. Hiervon ausgeschlossen ist, wie bereits beschrieben, der NB. Dieser ist Cas negativ und Mbl positiv (B''' und C'''). Es wurden exemplarisch zwei (B''') bzw. ein (C''') NB weiß umrandet.

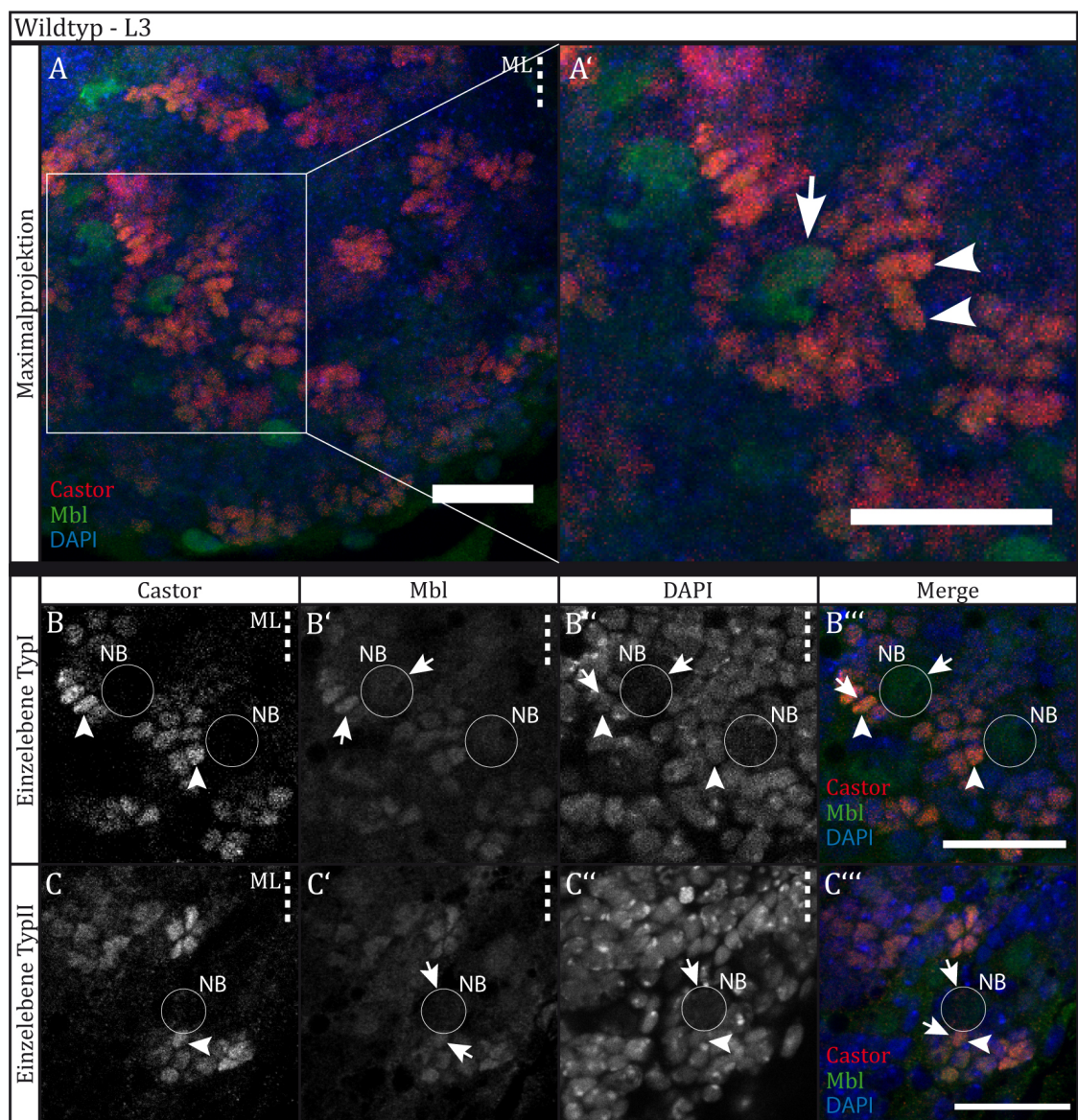


Abb. 3.30: Cas und Mbl Antikörperfärbungen zeigen eine teilweise Überlappung. L3-Wanderlarve, anterior oben, posterior unten, ML: Mittellinie, Maßstab: 20µm, Maximalprojektion zusammengesetzt aus 27 Ebenen. NB: Neuroblast, hervorgehoben durch weiße Umrandung. A-A': Maximalprojektion, A: Übersicht linke Hirnhemisphäre, A': entspricht weiß umrandeten Bereich in A. Pfeilkopf: Cas Antikörperfärbung, Pfeil: Mbl

Antikörperfärbung. Zur besseren Orientierung wurden die Pfeilköpfe/Pfeile auch in B'' und C'' eingefügt. B-B''': Einzelebene Typ I NB, B: Cas Antikörperfärbung, B': Mbl Antikörperfärbung, B'': DAPI, B''': zusammengesetzte farbige Darstellung der Kanäle B-B''. C-C''': Einzelebene Typ II, C: Cas Antikörperfärbung, C': Mbl Antikörperfärbung, C'': DAPI, C''': zusammengesetzte farbige Darstellung der Kanäle C-C''. Cas und Mbl Antikörperfärbungen zeigen eine teilweise Überlappung ihrer Expressionsbereiche. Auffälliger Unterschied ist die Expression von Mbl im NB (Pfeil). Dieser ist Cas negativ.

3.9.2 Mbl Knock-down in L3-Larven

Im folgenden Versuch wurde mithilfe der RNAi Technik ein Mbl Knock-down in L3-Larven durchgeführt. Die RNAi Linie KK105486 wurde hierfür mit der Gal4 Linie InscGal4 getrieben. Die Auswirkungen des Knock-downs auf die Retention der *cas* mRNA im Zellkern und das allgemeine Expressionsmuster von *cas* wurden durch eine *cas* mRNA in-situ Hybridisierung untersucht. In Abb. 3.31 ist der zentrale Bereich der linken Hirnhemisphäre einer Mbl Knock-down L3-Larve abgebildet. Hier befinden sich die Typ I Neuroblasten. Die Teilabb. A und A' zeigen eine aus 38 Ebenen zusammengesetzte Maximalprojektion, in welcher die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung in grün und die PI Färbung in rot dargestellt sind. Bei dem in A' abgebildeten Ausschnitt handelt es sich um den in A weiß umrandeten Bereich. Die Pfeilköpfe markieren im Zellkern lokalisierte *cas* mRNA, während die Pfeile *cas* mRNA aufzeigen, welche sich außerhalb des Zellkerns befindet. Wie auch in der wildtypischen Larve, lokalisiert in den meisten Nachkommenzellen des Neuroblasten die *cas* mRNA im Zellkern. Die Teilabb. B-B'' zeigen eine repräsentative Einzelebene der Hirnhemisphäre. B zeigt die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, B' die PI Färbung und B'' die zusammengesetzte farbige Darstellung der beiden Kanäle B und B'. In C-C'' ist ein Ausschnitt einer Hirnhemisphäre einer wildtypischen L3-Larve abgebildet. Auch hierbei handelt es sich um eine repräsentative Einzelebene. C zeigt die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, C' die DAPI Färbung und C'' die zusammengesetzte farbige Darstellung der beiden Kanäle (*cas* mRNA in-situ Hybridisierung in rot und DAPI in grün). Vergleicht man die Abbildung des Mbl RNAi Knock-downs mit der Wildtypfärbung, so fällt im Knock-down die erhöhte Anzahl an *cas* positiven NB Nachkommenzellen auf. Des Weiteren sind diese *cas* positiven Zellen im Knock-down in einer auffälligen perlenkettenartigen Form angeordnet. Diese Anordnung der *cas* positiven Zellen ist in der wildtypischen L3-Larve nicht vorhanden. Die Besonderheit der Zellanordnung ist in der dargestellten Einzelebene B bzw. B'' besonders gut zu erkennen. In der Mitte des abgebildeten Bereiches befinden sich fünf *cas* positive Zellen, welche wie eine Perlenkette angeordnet sind. In den beiden am anteriorsten gelegenen Zellen befindet sich die *cas* mRNA im Cytoplasma was darauf hinweisen könnte, dass sich die Zelle zuvor geteilt hat (Pfeil). In den restlichen drei *cas* positiven Zellen der Perlenkette lokalisiert die *cas* mRNA im Zellkern (Pfeilkopf).

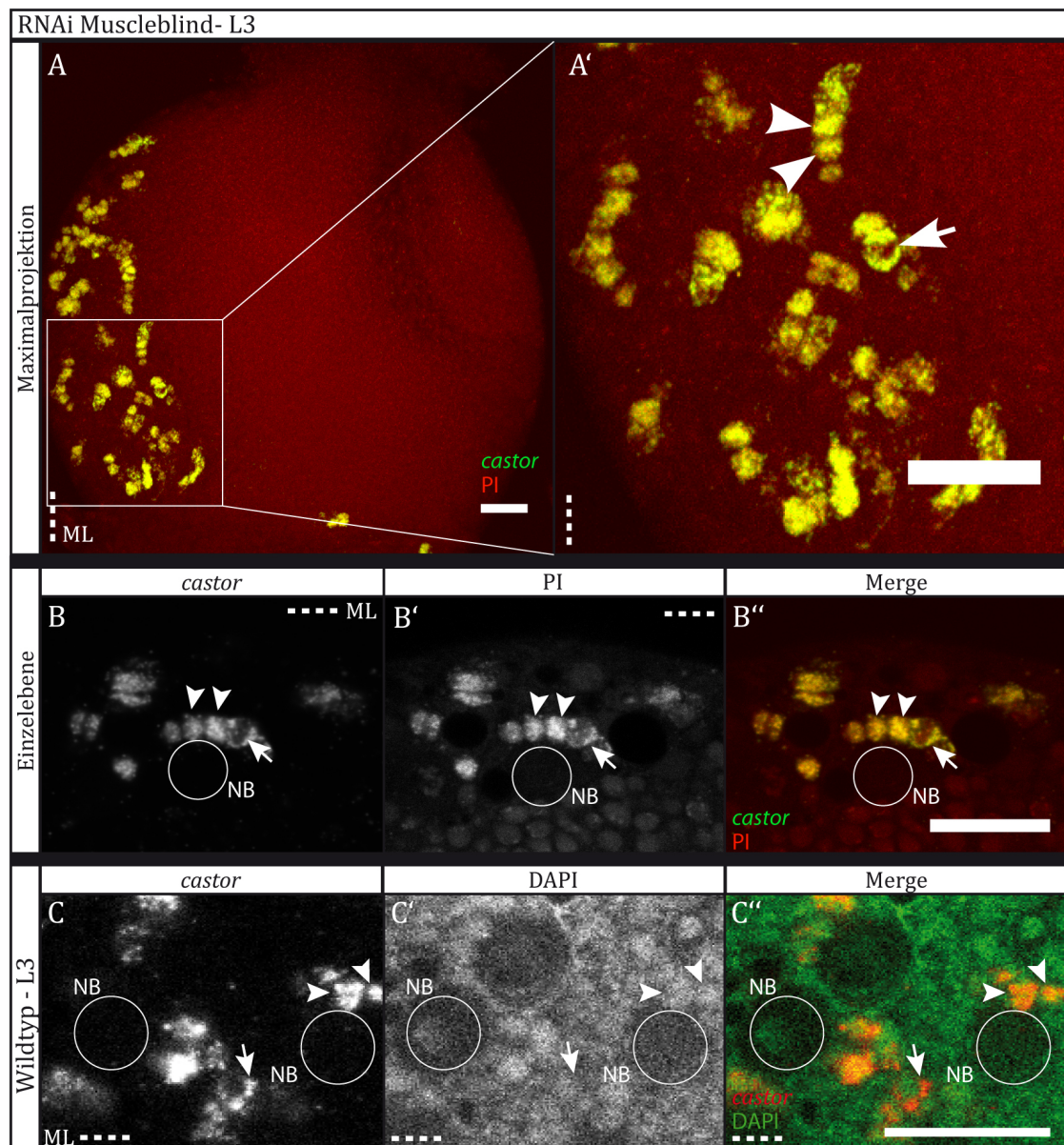


Abb. 3.31: Mbl Knock-down mittels RNAi zeigt eine erhöhte Anzahl an *cas* positiven Zellen in kettenförmiger Anordnung, Typ I. L3-Wanderlarve, Typ I NB. A-A' anterior oben, posterior unten; B-C'': anterior links, posterior rechts. ML: Mittellinie, Maßstab: 20µm, Maximalprojektion zusammengesetzt aus 38 Ebenen. NB: Neuroblast, hervorgehoben durch weiße Umrandung. Pfeilkopf: *cas* mRNA im Zellkern, Pfeil: *cas* mRNA außerhalb des Zellkerns. Zur besseren Orientierung wurden die Pfeilköpfe/Pfeile auch in B' und C' eingefügt A-A': Mbl RNAi Knock-down, Maximalprojektion, A: Übersicht linke Gehirnhemisphäre, A': entspricht weiß umrandeten Bereich in A. B-B'': Mbl RNAi Knock-down, Einzelebene, B: *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, B': PI, B'': zusammengesetzte farbige Darstellung der Kanäle B und B'. C-C'': wildtypische L3-Larve, Einzelebene. C: *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, C': DAPI, C'': zusammengesetzte farbige Darstellung der Kanäle C und C'. Verglichen mit der endogenen *cas*-Expression (C-C'') kann man beim Knock-down (B-B'') eine erhöhte Anzahl an *cas* positiven Zellen feststellen. Auffällig ist auch die vermehrt kettenförmige Anordnung dieser Zellen.

In Abb. 3.32 ist der Bereich der linken Hirnhemisphäre einer L3-Larve gezeigt, in welchem sich die Typ II Neuroblasten befinden. Sie zeichnen sich durch einen großen Zellstammbaum aus. Bei den Maximalprojektionen A und A' handelt es sich um die Hirnhemisphäre einer Mbl Knock-down Larve. Sie wurde aus 15 Ebenen zusammengesetzt. Neben einer *cas* mRNA in-situ Hybridisierung wurde auch eine PI-Färbung durchgeführt. Bei der Abb. A' handelt es sich um den weiß umrandeten Bereich in A. Deutlich sind hier die großen Stammbäume der Typ II Neuroblasten mit ihren *cas*

positiven Nachkommenzellen zu erkennen. Der Pfeilkopf markiert im Zellkern lokalisierte *cas* mRNA, der Pfeil hingegen eine Zelle, in welcher sich die *cas* mRNA außerhalb des Zellkerns befinden. Dies gilt auch für die Teilabb. B". In den meisten Nachkommenzellen lokalisiert die *cas* mRNA im Zellkern. Die Teilabb. B-B" zeigen eine repräsentative Einzelebene der Hirnhemisphäre. B zeigt die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, B' die PI-Färbung und B" die zusammengesetzte farbige Darstellung der beiden Kanäle B und B'. Die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung ist in grün, die PI-Färbung ist in rot dargestellt. C-C" zeigt eine repräsentative Einzelebene der rechten Hirnhemisphäre einer wildtypischen L3-Larve. C zeigt die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, C' die DAPI Färbung und C" die zusammengesetzte farbige Darstellung der beiden Kanäle. Hierbei ist die *cas* mRNA in-situ Hybridisierung in rot und die DAPI Färbung in grün dargestellt. In B" ist deutlich zu sehen, dass der Großteil der *cas* mRNA im Zellkern lokalisiert. Auch im Falle der Typ II Neuroblasten scheint der Knock-down von *Mbl* zu einer vermehrten Anzahl an *cas* positiven Neuroblastennachkommenzellen zu führen. Dies zeigt der direkte Vergleich des Knock-downs (B-B") mit dem Wildtyp (C-C"). Hier befinden sich im distalen Bereich der Hemisphäre auch wildtypisch aussehende Zellstambäume. Diese besitzen eine geringere Anzahl an *cas* positiven Zellen.

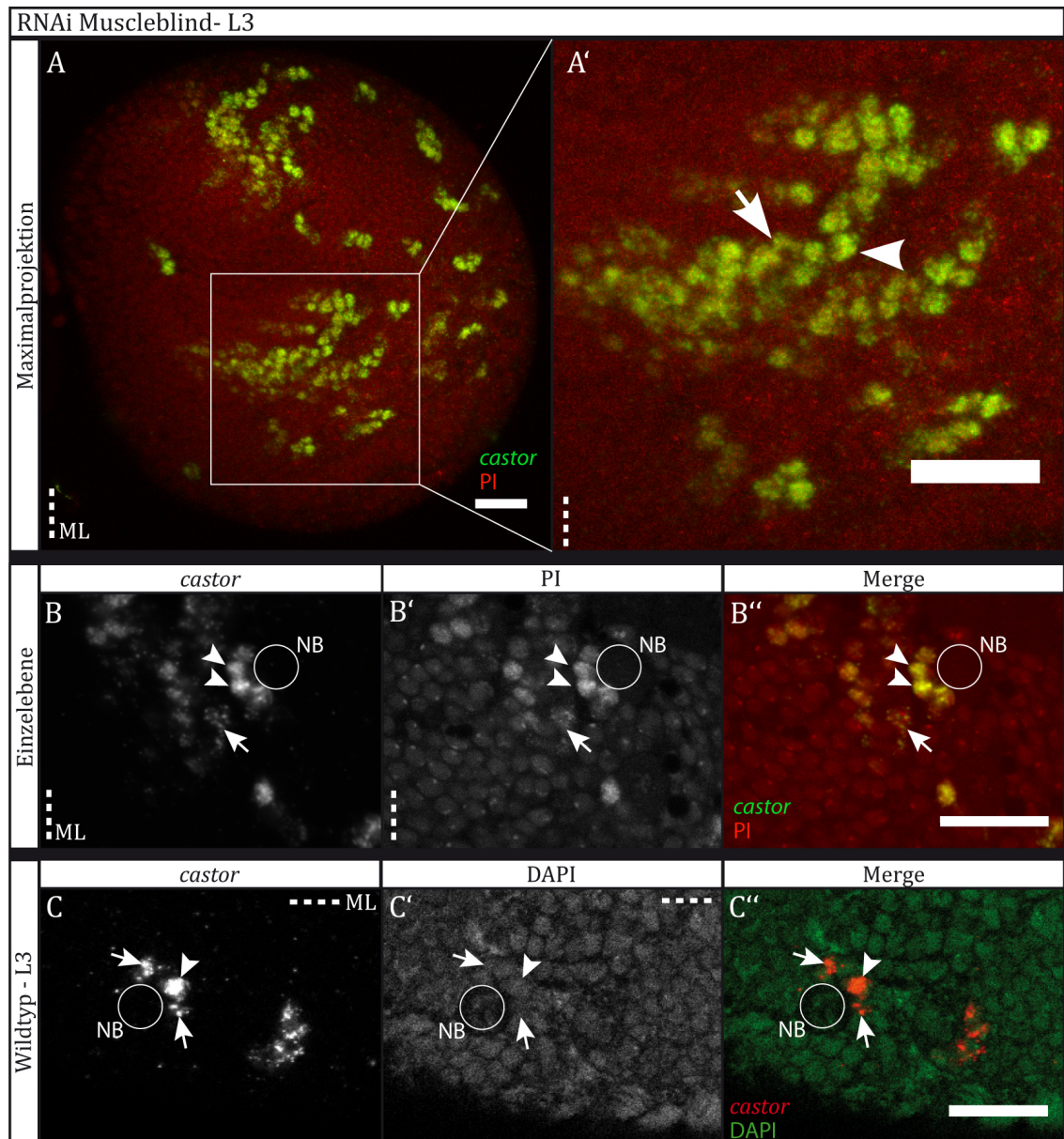


Abb. 3.32: Mbl Knock-down mittels RNAi zeigt eine erhöhte Anzahl an *cas* positiven Zellen, Typ II. L3-Wanderlarve, Typ II NB. A-B'': anterior oben, posterior unten; C-C'': anterior links, posterior rechts. ML: Mittellinie, Maßstab: 20µm, Maximalprojektion zusammengesetzt aus 15 Ebenen. NB: Neuroblast, hervorgehoben durch weiße Umrandung. Pfeilkopf: *cas* mRNA im Zellkern, Pfeil: *cas* mRNA außerhalb des Zellkerns. Zur besseren Orientierung wurden die Pfeilköpfe/Pfeile auch in B' und C' eingefügt. A-A': Mbl RNAi Knock-down, Maximalprojektion, A: Übersicht linke Hirnhemisphäre, A': entspricht weiß umrandeten Bereich in A. B-B'': Mbl RNAi Knock-down, Einzelebene, B: *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, B': PI, B'': zusammengesetzte farbige Darstellung der Kanäle B und B'. C-C'': Wildtypische L3-Larve, Einzelebene. C: *cas* mRNA in-situ Hybridisierung, C': DAPI, C'': zusammengesetzte farbige Darstellung der Kanäle C und C'. Verglichen mit der endogenen *cas*-Expression (C-C'') kann man beim Knock-down (B-B'') eine erhöhte Anzahl an *cas* positiven Zellen feststellen.

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Dissertation wurde anhand des embryonalen und larvalen Nervensystems von *Drosophila melanogaster* die nukleare Retention der mRNA des temporalen Spezifizierungsgens *castor* untersucht. Die im vorherigen Kapitel dargelegten Ergebnisse sollen zuerst in Hinblick auf die mögliche biologische Relevanz der *cas* mRNA Kernretention diskutiert werden. Da die Entlassung der *cas* mRNA an die mitotische Teilung des Neuroblasten gebunden ist, könnte die nukleare Retention einen neuen Mechanismus zur zeitlichen Kontrolle der Proteinsynthese darstellen. Anschließend werden denkbare Mechanismen zur Kernretention der *cas* mRNA dargelegt. Hierbei wird im Speziellen auf die mögliche Involvierung von dIMP und Mbl eingegangen und der Einfluss der mRNA-Sekundärstruktur behandelt.

4.1 Biologische Relevanz nuklearer RNA-Retention

Die asymmetrische Verteilung und lokale Distribution spezifischer mRNAs konnte schon früh nachgewiesen werden (Capco und Jeffery, 1987; Jeffery und Capco, 1978; Jeffery *et al.*, 1983; Lawrence und Singer, 1986). Das Lecuyer und Kollegen in 71 % aller untersuchten embryonalen Gene in *Drosophila* eine Lokalisation der mRNA feststellen konnten, zeigt, dass es sich hierbei um einen Kernmechanismus zur Kontrolle der Zellarchitektur und Zellfunktion handelt (Lécuyer *et al.*, 2007). Warum es für die Zelle Sinn macht mRNA, anstatt das fertige Protein, zu lokalisieren wurde bereits in der Einleitung angeschnitten; soll hier jedoch in Analyse der möglichen biologischen Relevanz der *cas* mRNA-Kernretention noch einmal aufgegriffen werden. Durch die Lokalisation von mRNA anstelle des entsprechenden Proteins spart die Zelle Transportkosten, da die mRNA am Zielort beliebig oft translatiert werden kann (Johnston, 1995). Der Transport erfolgt hierbei meist in RNA-Proteinkomplexen. Dies erlaubt der Zelle, zum Beispiel durch Hitchhiking mehr als eine Kopie der mRNA an den Lokalisationsort zu bringen. Im Falle der Lokalisation von *osk* mRNA am posterioren Pol der Oozyte kann es sich um bis zu 100 Kopien in einem RNP handeln (Hachet und Ephrussi, 2004; Glotzer *et al.*, 1997). Dieser Mechanismus ist auch im Falle der *cas* mRNA denkbar. Die *cas* mRNA könnte im Nukleus gesammelt, in RNPs verpackt, bei Mitose ins Cytoplasma entlassen und zur Translation bereitgestellt werden. Mit jeder Zellteilung wird also durch die vorhergehende Kernrückhaltung der *cas* mRNA eine stoßartige Anhäufung des Cas Proteins erzielt, welches dann wiederum als Transkriptionsfaktor in den Zellkern importiert wird. Kathrin Fischer diskutiert in ihrer Diplomarbeit „Analysen zur nukleären Lokalisation der *castor*-mRNA im zentralen Nervensystem von *Drosophila melanogaster*“ die hierdurch entstehende Möglichkeit einer oszillierenden Proteinkonzentration im NB. Sie führt an, dass *svp* auf ähnliche Art und Weise reguliert wird (Mettler *et al.*, 2005). Eine Oszillation der Cas-Proteinkonzentration könnte für einen intrinsischen Mechanismus sprechen, welcher abhängig von der Anzahl der durchlaufenen NB-Teilungen, unterschiedliche temporale Identitäten an die im Cas-Zeitfenster entstehenden NB-Nachkommen vermittelt. Um dies herauszufinden, müsste die stoßweise Freisetzung des Cas-Proteins unterbunden und mögliche Änderungen in der Zellspezifizierung des Cas-Zeitfensters untersucht werden (Fischer, 2009).

Ein anderer Aspekt der nuklearen Retention wäre seine mögliche Pufferfunktion zellulärer mRNA Level. Anhand einer RNA-Seq Studie an einer MIN6 Pankreas-Beta-Zelllinie und Mausleberzellen wurde eine große Anzahl an gepleißten und polyadenylierten Proteinkodierenden mRNAs gefunden, welche im Zellkern in höherer Konzentration vorliegen als im Cytoplasma (Bahar Halpern *et al.*, 2015; Miyazaki *et al.*, 1990). Hierzu zählen unter anderem die Gene ChREBP, Nlrp6, Glucokinase und der Glucagon Rezeptor. Es sei erwähnt, dass Nlrp6 und ChREBP (Mlxipl) im Zellkern mit MALAT1 lokalisieren, einem Marker für nukleare Speckles. Eine Verankerung oder Verbindung der Nlrp6 und ChREBP mRNA mit den nuklearen Speckles könnte die Retention der mRNA im Zellkern fördern (Bahar Halpern *et al.*, 2015). Bahar Halpern und Kollegen konnten zeigen, dass die Retention dieser beiden mRNAs im Zellkern für eine Verringerung der cytoplasmatischen mRNA-Schwankung führt. Diese Schwankungen an Transkriptionsleveln im Cytoplasma isogenetischer Zellen wird als „gene expression noise“ bezeichnet (Eldar und Elowitz, 2010; Raj und van Oudenaarden, 2008). In einer Vielzahl an Organismen konnte gezeigt werden, dass die Transkription ein pulsartiger Prozess ist, bei welchem sich einzelne mRNA-Produktionsausbrüche mit Perioden abwechseln, in welchen keine Produktion von mRNA stattfindet und der Promotor inaktiv ist (Bahar Halpern *et al.*, 2015; Battich *et al.*, 2015; Dar *et al.*, 2012; Darzacq *et al.*, 2007; Larson *et al.*, 2011; Suter *et al.*, 2011; Senecal *et al.*, 2014). Bei aktivem Promoter akkumuliert mRNA in der Zelle und wird er abgeschaltet gehen die mRNA-Level zurück. Die Kompartimentierung von mRNA könnte diese Fluktuationen in cytoplasmatischer mRNA-Konzentration und damit auch die möglichen Schwankungen im Proteinlevel reduzieren. Wird die mRNA im Kern zurück gehalten ist die cytoplasmatische Fluktuation, im Vergleich zum direkten Export, gedämpft. Dies gründet auf einen reduzierten Koeffizienten an Variation (CV: coefficient of variation) der cytoplasmatischen Transkripte, wenn die nukleare Exportrate geringer ist als die cytoplasmatische mRNA-Abbaurrate. Eine reduzierte mRNA-Exportrate kann die cytoplasmatische Fluktuation reduzieren, ohne das durchschnittliche cytoplasmatische mRNA-Level zu ändern, indem mehr Transkript im Zellkern akkumuliert (Bahar Halpern *et al.*, 2015). Ein möglicher Vorteil der nuklearen Retention könnte also die Abschwächung der „gene expression noise“ im Cytoplasma sein, welche durch die periodische mRNA-Produktion entsteht (Bahar Halpern *et al.*, 2015; Singh und Bokes, 2012; Xiong *et al.*, 2010). Das von Battich *et al.* entwickelte Model unterstützt diese Theorie. Sie zeigen, dass die zelluläre Kompartimentierung, also die Trennung des Nukleus vom Cytoplasma, ein effizienter Mechanismus zur Abschwächung der transkriptionellen Fluktuationen ist. Eine Entlassung der mRNA direkt und in vollem Umfang ins Cytoplasma, entsprechend der An- und Abschaltung des Promotors, würde zu einer starken Schwankung der mRNA und damit der Proteinmenge im Cytoplasma führen. Durch die vom Promotor unabhängige, verlangsamte Entlassung der mRNA aus dem Nukleus wird diese starke Fluktuation verhindert. Da die untersuchten Gene in Säugerzellen eine nukleare Retentionszeit zwischen 5-90 min besitzen, schließen die Autoren auf einen Mechanismus, welcher die nukleare Retentionszeit mit der transkriptionellen Dynamik verbindet (Battich *et al.*, 2015). Sprechen Battich *et al.* von nuklearer Retention der mRNA so ist lediglich die Zeitspanne von der Transkription des Gens bis zum Export aus dem Zellkern gemeint. Dies beinhaltet den Aufschluss des Chromatins, die nukleare Diffusion, die Prozessierung der RNA, Verpackung in RNPs und/oder die Bindung und den Transport durch die nuklearen Poren. Die nukleare Retention der *cas* mRNA stellt natürlich eine Besonderheit dar, da die Freisetzung der mRNA ins Cytoplasma an die Zellteilung gebunden ist. Auch wird vor der

Zellteilung die *cas* mRNA nur in sehr geringen Mengen ins Cytoplasma entlassen. Bei Zellteilung wird dann die im Zellkern retenierte mRNA mit einem Mal ins Cytoplasma entlassen.

Durch eine mRNA-Lokalisation und den einhergehenden Translationsstop wird außerdem sichergestellt, dass das benötigte Protein erst an seinem Zielort aktiv wird (Besse und Ephrussi, 2008; Bullock, 2011). Dadurch wird zum Beispiel die Aktivierung eines Signalwegs an der falschen Stelle der Zelle verhindert. Cas wirkt vornehmlich als Transkriptionsfaktor im Inneren des Zellkerns. Seine Aktivität wird also durch den verhinderten Kernexport vor allem zeitlich eingeschränkt. Erst wenn der NB sich geteilt hat und die entlassene *cas* mRNA translatiert wurde, kann Cas in den Kern importiert und aktiv werden. Ob die zeitliche Einengung der Cas Aktivität regulatorisch an die Mitose gekoppelt ist und welcher Sinn dahinter steckt, gilt es noch zu klären.

Diese Mutmaßungen sind an die Voraussetzung gekoppelt, dass Cas nur als Protein regulatorische Aufgaben übernimmt und die Kernretention der *cas* mRNA, als Verzögerung der Cas-Aktivität wirkt. Es sollte jedoch auch in Betracht gezogen werden, dass während der Aufenthaltsdauer der *cas* mRNA im Kern diese dort regulatorische Funktionen übernimmt. Dass spezifische RNAs, sogenannte nrRNAs, im Nukleus zurückgehalten werden, um dort zum Beispiel als Regulatoren wirksam zu sein, konnte bereits gezeigt werden (Prasanth und Spector, 2007; Wilusz *et al.*, 2009). Ein gut erforschtes Beispiel hierfür ist die Poly(A)⁺ RNA, welche in Speckles und perichromatinen Fibrillen im Nukleus lokalisiert (Carter *et al.*, 1991; Carter *et al.*, 1993; Herman *et al.*, 1976; Huang *et al.*, 1994). Die Lokalisierung der Poly(A)⁺ RNA in nuklearen Speckles besteht auch bei Inhibierung der Transkription durch die Polymerase II weiterhin. Dies lässt vermuten, dass die Poly(A)⁺ RNA funktionelle Rollen im Nukleus übernimmt.

Eine weitere Funktion eines Mitglieds der Poly(A)⁺ Familie ist die Freisetzung der im Kern zurückgehaltenen CTN-RNA (cationic amino acid transporter 2 RNA), als Antwort der Zelle auf plötzlich auftretenden physiologischen Stress. Wird eine hohe Anzahl an im Kern retenierte mRNA mit einem Mal ins Cytoplasma entlassen, kann viel Protein in kürzester Zeit translatiert werden (Johnston, 1995). Dieser Mechanismus kann beim plötzlichen Auftreten von physiologischem Stress in der Zelle eingesetzt werden um mögliche Zellschädigungen zu bekämpfen. Zeigen konnten dies Prasanth *et al.* an der im Zellkern zurückgehaltenen CTN-RNA, welche in den im Zellkern vorliegenden und mit Speckles assoziierten Paraspeckles lokalisiert (Prasanth *et al.*, 2005). Bei auftretendem Stress in der Zelle wird die CTN-RNA durch die Entfernung der 3'UTR zur Proteinkodierenden mCAT2 mRNA (Mouse Cationic Amino Acid Transporter 2) (Prasanth *et al.*, 2005; Nicholson *et al.*, 2001). Das hieraus entstehende Proteinprodukt ist an der zellulären Aufnahme kationischer Aminosäuren beteiligt (Macleod, 1991). Diese werden unter Zugabe von O₂ zur Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) und Citrullin benötigt. Der NO Signalweg wird von Zellen unter verschiedensten Stresssituationen induziert und ist Teil eines zellulären Abwehrmechanismus (Lowenstein *et al.*, 2004). Wie die CTN-RNA im Kern zurückgehalten wird konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Prasanth *et al.* vermuten eine Kombination der spezifischen Faltung der RNA, sowie eine A-zu-I-Editierung in der 3'UTR der CTN-RNA (Prasanth *et al.*, 2005). Der posttranskriptionelle Austausch eines Adenosins gegen ein Inosin scheint mit der nuklearen Retention von RNA in Verbindung zu stehen (Bass, 2002). Es konnte für mehrere Inosin-Reste in editierten RNAs eine Interaktion mit einem Komplex hergestellt werden, welcher unter anderem das Protein p54^{nrb} (54 kDa nukleares RNA- und DNA-Bindeprotein) enthält (Prasanth *et al.*, 2005; Zhang und

Carmichael, 2001). Dass dieses Protein in Paraspeckles nachgewiesen werden konnte, erhöht die Wahrscheinlichkeit einer Involvierung von p54^{nrb} und damit einer A-zu-I-Editierung in die Kernrückhaltung der CTN-RNA. Des Weiteren enthält das CTN-RNA Transkript drei inverted repeats in seiner 3'UTR. Diese Wiederholungen können Stem-loops bilden, welche als charakteristische Ziele von ADAR (Adenosine deaminase acting on RNA) Enzymen bekannt sind (Bass, 2002; Prasanth *et al.*, 2005). Die nukleare Retention von RNA und die damit verbundene schnelle Generierung von hohen Mengen an Protein bei auftretendem Stress in der Zelle sollen noch an einem weiteren Beispiel diskutiert werden. Während der frühen Embryonalentwicklung von *Drosophila* sorgt die Kernrückhaltung bestimmter RNAs dafür, dass diese Zellkerne während der Entwicklungsphase des syncytialen Blastoderms eliminiert werden. Es wird vermutet, dass es sich bei den sogenannten „fallout nuclei“ um einen Sicherheitsmechanismus handelt, der die weitere reibungslose Entwicklung des Embryos sicherstellt (Lécuyer *et al.*, 2007). Die betroffenen Zellkerne fallen scheinbar aus dem Blastoderm in den darunter liegenden Dotter. Dadurch wird deren Integration in das embryonale Epithelium verhindert (Sullivan *et al.*, 1993; Takada *et al.*, 2003). Da der „nuclear fallout“ meist paarweise erfolgt, könnte er die Konsequenz fehlgeschlagener nuklearer Teilung sein, welcher durch genotoxischen Stress induziert wird (Iampietro *et al.*, 2014; Sullivan *et al.*, 1993; Rothwell *et al.*, 1998; Sibon *et al.*, 2000). Iampietro und Kollegen zeigten, dass wildtypische Embryonen, die verschiedenen DNA-Replikationsinhibitoren und DNA-Strangbruchreagenzien ausgesetzt wurden, eine Erhöhung der nuklearen Retention von *histone h3* und *kuk* mRNA aufweisen. Die behandelten Embryonen zeigten in 50-70 % aller Fälle Zellen mit „nuclear fallout“, wohingegen dieser nur in 20 % in unbehandelten Embryonen auftraten (Iampietro *et al.*, 2014). Der Prozess der nuklearen Akkumulation ist abhängig von der Funktion des Gens *loki*, auch bekannt als Chk2 (Checkpoint kinase 2). Im Falle der Histon mRNAs ist der Rückgang des SLBPs (Stem-loop binding protein) verantwortlich für die Kernretention. SLBP reguliert die Reifung der Histon-Transkripte und deren nuklearen Export (Iampietro *et al.*, 2014). Im Falle der *cas* mRNA kann von einer Stressantwort der Zelle nicht die Rede sein, jedoch könnte der Mechanismus an sich vom NB genutzt werden, um in kürzester Zeit eine große Menge an Protein herzustellen. Möglich wäre, dass der NB zum Zeitpunkt der Mitose eine größere Menge an Cas benötigt, die bei herkömmlichem bzw. direktem Export der *cas* mRNA nicht erreicht werden kann. Man könnte sich vorstellen, dass durch die erhöhte Translationsrate der frei gewordenen *cas* mRNA ein Cas Schwellenwert überschritten wird, mit einer bisher unbekanntem regulatorischen Funktion.

4.2 Der dImp Zipcode scheint notwendig zur Retention der *cas* mRNA

Das *Drosophila* Insulin-like Growth-Faktor-II mRNA-Bindeprotein (dImp) gehört in eine Familie von RNA-Bindeproteinen, welche neben den humanen IMP1-3, auch das Zipcodebindeprotein-1 (ZBP-1) im Hühnchen und das Vg1 RNA-Bindeprotein (Vg1RBP) aus *Xenopus* enthält (Deshler *et al.*, 1998; Havin *et al.*, 1998; Nielsen *et al.*, 1999; Nielsen *et al.*, 2000; Ross *et al.*, 1997). Diese Familie der RNA-Bindeproteine wird unter der Bezeichnung VICKZ (Vg1RBP/Vera, IMP, CRD-BP, KOC und ZBP-1) zusammengefasst (Yaniv und Yisraeli, 2002; Yisraeli, 2005). Während der embryonalen Entwicklung von *Drosophila* gibt es zwei Phasen der dImp Expression. Zum Zeitpunkt des zellulären Blastoderms wird es in der gesamten Zellschicht apikal lokalisiert. Während der

embryonalen Entwicklung des Nervensystems findet es sich im Gehirn, dem ventralen Nervenstrang und dem peripheren Nervensystem und ist unabdingbar für die neurale Stammzellentwicklung (Adolph *et al.*, 2009; Nielsen *et al.*, 2000). Später in der Larve findet sich dImp innerhalb der RNPs von Axonen und Synapsen (Boylan *et al.*, 2008). Schaut man in der adulten Fliege, so wurde die dImp Expression in den Nähr- und den Keimzellen der Testis und der sich entwickelnden Oozyte nachgewiesen, wo es abhängig von der *osk* mRNA am posterioren Pol lokalisiert (Fabrizio *et al.*, 2008; Geng and Macdonald, 2006; Munro *et al.*, 2006).

Die Mitglieder der VICKZ Familie teilen sich eine Reihe von RNA-Bindedomänen. So besitzen alle VICKZ-Angehörigen der Vertebraten zwei RNA-Erkennungsmotive (RRM: RNA recognition motif) und vier hnRNP K-Homologdomänen (KH) (Buckanovich und Darnell, 1997; Dejgaard und Leffers, 1996; Deshler *et al.*, 1998; Nielsen *et al.*, 1999; Ross *et al.*, 1997). Der VICKZ-Vertreter dImp in *Drosophila* weist ebenfalls die vier KH-Domänen auf, die beiden RRMs fehlen ihm jedoch. Im Gegenzug besitzt es einen Glutamin reichen C-Terminus, welcher in den VICKZ-Angehörigen der Vertebraten nicht vorhanden ist (Adolph *et al.*, 2009; Git und Standart, 2002; Nielsen *et al.*, 2000). Erstmals konnte innerhalb der β -Aktin mRNA des Hühnchens eine Nukleotidsequenz ermittelt werden, welche für die Lokalisation der mRNA durch ein Mitglied der VICKZ-Familie notwendig ist. Hierbei handelt es sich um eine 54 Bp lange Sequenz innerhalb der 3'UTR (Kislauskis *et al.*, 1993; Kislauskis *et al.*, 1994). Sie enthält mehrere notwendige Motive zur Lokalisation von β -Aktin. Zwei Motive, GGACT und AATGC, wurden einmal in dem 54 Bp langen Zipcode und ein zweites Mal in einer weiteren zusätzlichen 43 Bp langen Region gefunden (Kislauskis *et al.*, 1994). Des Weiteren ist eine besonders AC-reiche Region zwischen den beiden Motiven essenziell für die Aktivität der Bindung (Kislauskis *et al.*, 1997). Innerhalb dieser AC-reichen Region ist zweimal die Sequenz ACACCC eingebettet, an welcher die dritte und vierte KH-Domäne von ZBP-1 an β -Aktin binden (Chao *et al.*, 2010; Farina *et al.*, 2003; Ross *et al.*, 1997). Das ACACCC Motiv findet sich in β -Aktin Sequenzen unterschiedlicher Spezies und Yaffe *et al.* konnten zeigen, dass sie innerhalb der 3'UTR von β -Aktin im Menschen, Hühnchen und der Ratte konserviert vorliegt (Yaffe *et al.*, 1985). Dass die Sequenzen GGACT und ACACCC innerhalb der 3'UTR von β -Aktin notwendig und ausreichend zur RNA-Lokalisation sind, konnte bereits in Fibroblasten, dendritischen Filopodien und axonalen Wachstumskegeln gezeigt werden (Eom *et al.*, 2003; Kislauskis *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2001). Des Weiteren ist ZBP-1 nicht das einzige RNA-Bindeprotein, welches an den genannten Zipcode bindet. So bindet auch das ELAV ähnliche HuD Protein in der Ratte an einen besonders U-reichen Bereich (Kim *et al.*, 2015). Kim *et al.* konnten außerdem zeigen, dass die Bindung von ZBP-1 insbesondere abhängig ist von einem Stem-loop im Bereich des Zipcodes. Für dessen korrekte Ausbildung sind das U-reiche Element und das ACACCC Motiv unabdingbar.

Durch Sequenzanalysen konnte innerhalb der *cas* mRNA der Zipcode (CGGAC und ACACCC) in zweifacher Ausführung festgestellt werden. Die Involvierung von dImp als möglicher Kandidat für die Kernretention der *cas* mRNA konnte jedoch nicht bestätigt werden. Auch wenn die Zerstörung des dIMP-Bindemotivs durch einen Basenaustausch für die vorzeitige Entlassung der *cas* mRNA aus dem Kern sorgt, konnte anhand der durchgeführten Antikörperfärbungen keine Kolokalisation der *cas* mRNA mit dImp nachgewiesen werden (Abb. 3.26 und 3.27), da dImp im Cytoplasma vorliegt. Dies konnte bereits von Adolph und Kollegen gezeigt werden (Adolph *et al.*, 2009). Auch das humane IMP zeigte in Gewebs- und Zellkulturzellen eine vornehmlich cytoplasmatische

Lokalisierung (Nielsen *et al.*, 1999). Nichtsdestotrotz konnten Doyle und Kollegen zeigen, dass das CRD-BP (coding region determinant-binding protein), ein β -Aktin verwandtes Gen, ein nukleares Lokalisationssignal (NLS) besitzt (Doyle *et al.*, 1998). Für ZBP-1 konnten ebenfalls zwei NLS ermittelt werden (Zhang *et al.*, 2001). In humanem IMP1 konnte zwar keine NLS nachgewiesen werden, gleichwohl wurde gezeigt, dass bei kurzzeitiger Expression hoher Konzentrationen an GFP-IMP1, dieses im Zellkern akkumuliert (Nielsen *et al.*, 1999). Des Weiteren konnte für IMP3 eine Kernlokalisierung in einer humanen, embryonalen Krebszelllinie nachgewiesen werden. IMP3 bindet im Zellkern an die mRNAs der Cycline D1, D3 und G1 und ist für deren post-transkriptionelle Regulation unabdingbar (Boudoukha *et al.*, 2010; Rivera Vargas *et al.*, 2013).

Auch der Knock down von dImp via RNAi generiert in L3-Larven keinen sichtbaren *cas*-Phänotyp (Abb. 3.28). Die Kernretention und das Expressionsmuster von *cas* in dImp Knock down Larven entsprechen weitestgehend dem endogenen *cas*-Muster. Dies schließt eine Involvierung von dImp in die Lokalisation der *cas* mRNA jedoch nicht aus. So ist dImp erwiesenermaßen an der Lokalisation von *grk* und *osk* mRNA in der Oozyte beteiligt. dImp wird zusammen mit *grk* und *osk* mRNA am posterioren Pol der Oozyte lokalisiert und eine Störung der *grk* oder *osk* Lokalisation verändert auch die Verteilung von dImp (Geng und Macdonald, 2006; Munro *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu hat die Mutation von dImp keine Auswirkung auf die Lokalisation von *osk* oder *grk* mRNA in der Oozyte (Geng und Macdonald, 2006; Munro *et al.*, 2006). Bei Überexpression von dImp kann interessanterweise ein abnormales Verzweigungsmuster des Intersegmentalnervs b (ISNb) festgestellt werden. Dieser verlässt den ISN an abweichender Stelle und innerviert den falschen Muskel (Kraut *et al.*, 2001). Die Auswirkungen einer Überexpression von dImp auf die Kernretention der *cas* mRNA wurden in dieser Arbeit nicht untersucht. Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit zwar gezeigt werden, dass der Zipcode zur Kernrückhaltung der *cas* mRNA notwendig ist (Abb. 3.25), ausreichend scheint er im vorliegenden Fall jedoch nicht zu sein. Zumindest reichen die ersten 1035 Basenpaare der *cas* mRNA einschließlich des Zipcodes nicht aus, ein GFP-Fusionskonstrukt im Zellkern zurückzuhalten (Abb. 3.17). Woran dies liegt, konnte nicht abschließend geklärt werden. Dass der 54 Bp lange Zipcode in β -Aktin notwendig und ausreichend zur Lokalisierung von Reporter-RNAs ist, konnte bereits gezeigt werden. Ein Fusionskonstrukt zeigte, dass der Zipcode innerhalb der ersten 54 Bp der 3'UTR von β -Aktin ausreicht, um β -Galaktosidase in Fibroblasten zu lokalisieren. Nichtsdestotrotz konnte die Deletion dieser Sequenz aus einem Konstrukt mit der vollständigen β -Aktin Sequenz die Lokalisation nur reduzieren, nicht vollständig beenden. Zur vollständigen Unterbindung der β -Galaktosidase Lokalisation musste neben der 54 Basenpaar langen Sequenz auch der zweite 43 Basenpaar lange Zipcode deletiert werden (Kislauskis *et al.*, 1994). Man kann spekulieren, ob für die Kernretention des Fusionskonstrukts aus GFP und *cas*, neben den ersten 1035 Bp, welche bei Deletion ausreichen die Kernrückhaltung der *cas* mRNA zu stören, eine weitere Sequenz notwendig ist. Ob es sich bei diesem zweiten Signal um einen weiteren Zipcode oder eine Sekundärstruktur handelt, bleibt offen.

Wie bereits beschrieben ist neben dem zweiteiligen β -Aktin Zipcode (CGGAC und ACACCC) eine besonders AC-reiche Region zwischen den beiden Motiven essenziell für die Aktivität der Bindung (Kislauskis *et al.*, 1997). In einem an MCF7 und HeLa Zellen durchgeführten Screen, konnte eine 42 Basenpaar lange Sequenz identifiziert werden, welche die nukleare Lokalisation in lncRNAs und mRNAs fördert (Lubelsky und Ulitsky, 2018). Das 42 Bp lange Fragment, enthält drei Abschnitte mit mindestens sechs Pyrimidinen (C/T), wobei zwei

dieser Abschnitte in ihrer Sequenz übereinstimmen (RCCTCCC: R steht hierbei wahlweise für A/G). Das vollständige 42 Bp Fragment wird als SIRLOIN (SINE-derived nuclear RNA localization) bezeichnet (Lubelsky und Ulitsky, 2018). Es leitet sich ab von den sogenannten Alu-Sequenzen, eine Familie repetitiver DNA-Sequenzen, welche zu den SINEs (short interspersed nucleotide elements) gehören (Chen und Carmichael, 2008; Häsler und Strub, 2006). Alu-Sequenzen sind Primatenspezifisch und nehmen hier ca. 10 % des Genoms für sich ein (Batzer und Deininger, 2002; Versteeg *et al.*, 2003). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass SIRLOIN Sequenzen vom Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (HNRNPK) gebunden werden (Lubelsky und Ulitsky, 2018). HNRNPK gehört zu der Familie der hnRNPs und ist ein nukleares RNA-Bindeprotein, welches eine wichtige Rolle in spezifischen lncRNAs spielt z.B. lincRNA-p21 (Chu *et al.*, 2015; Dimitrova *et al.*, 2014). Die Bindung von HNRNPK an C-reiche Motive und die Beziehung derselben zu der nuklearen Anreicherung von lncRNAs (long nuclear-retained regulatory RNA) und mRNAs ist über verschiedene Spezies hinweg konserviert. So besitzt der im Kern zurückgehaltene und in nuklearen Speckles lokalisierte Transkriptionsfaktor *MLXIPL* (auch ChREBP) mehrere HNRNPK Bindestellen. Die nukleare Ansammlung von *MLXIPL* konnte in der Mausleber und -darm, und verschiedenen humanen Zelllinien, unter anderem MCF7, nachgewiesen und durch einen HNRNPK Knock-down unterbunden werden (Bahar Halpern *et al.*, 2015). Der zugrunde liegende Mechanismus, durch welchen HNRNPK die nukleare Retention der lncRNAs und mRNAs vermittelt, ist jedoch unklar. Wie bereits beschrieben sind Alu-Sequenzen spezifisch für das Primatengenom. In *Drosophila* konnten sie bisher nicht nachgewiesen werden, jedoch gibt es auch hier transposable Elemente, z.B. SINEs und LINEs (long interspersed nuclear elements) (Gonzalez und Petrov, 2009; McCullers und Steininger, 2017). Des Weiteren gibt es in *Drosophila*, neben dem HNRNPK Ortholog HnRNP-K, mehrere HNRNPK Orthologe, welche für die Bindung und nukleare Retention der *cas* mRNA in Frage kommen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Involvierung einiger RNA-Bindeproteine aus der Familie der hnRNPs in die nukleare Retention der *cas* mRNA untersucht. Sie gehören zu der bekannten Maschinerie des *grk* Lokalisationskomplexes (4.3).

4.3 Spielt die Sekundärstruktur des Zipcodes eine Rolle in der Kernrückhaltung?

Neben der Sequenz kann auch die Sekundärstruktur der RNAs bei der Lokalisierung eine wichtige Rolle spielen. Wie bereits in der Einleitung beschrieben ist es der RNA möglich durch Faltung einzigartige sekundäre und tertiäre Strukturen auszubilden, welche funktionelle Eigenschaften besitzen (Adams *et al.*, 1969; Dixon und Hillis, 1993; Erdmann *et al.*, 1984; Noller, 1984; Schellman und Schellman, 1997; Steitz, 1969; Wheeler und Honeycutt, 1988). RNA-Bindeproteine erkennen bereits im Kern spezifische Zipcodes und charakteristische Sekundärstrukturen innerhalb der zu lokalisierenden RNA und verpacken sie in Ribonukleoproteinkomplexe. In diesen wird die RNA an ihren Zielort transportiert (Ainger *et al.*, 1993; Besse und Ephrussi, 2008; Knowles *et al.*, 1996; Wilhelm und Vale, 1993). Wie bereits dargelegt beruhen Transport und Lokalisation von β -Aktin auf die Erkennung eines Zipcodes in der 3'UTR durch ZBP-1 (Eom *et al.*, 2003; Kislauskis *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2001). Wie diese Bindung zwischen ZBP-1 und β -Aktin aussehen könnte, wurde mit unterschiedlichen Methoden untersucht (Kim *et al.*, 2015; Ross *et al.*,

1997). Das Model von Ross und Kollegen wurde anhand eines Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA), UV-crosslinking und Immunopräzipitationen verfasst und postuliert einen Proteinwechsel bei der Bindung von ZBP-1 an die 3'UTR von β -Aktin (Abb. 4.1). In dem vorgeschlagenen Model befindet sich eine der beiden ACACCC Sequenzen am Ende eines Stem-loops und ist somit gut zugänglich für ZBP-1. Mutiert man diese Sequenz reduziert sich die Bindung an β -Aktin um 95 % bzw. 60 %, abhängig vom verwendeten Assay. Die Mutationen an dem Motiv GGACU und der ersten ACACCC Sequenz haben einen schwächeren Effekt. Kim *et al.* erarbeiteten mithilfe der Mfold Software Modelle für β -Aktin in der Ratte/Maus und dem Hühnchen (Kim *et al.*, 2015). In beiden Fällen ergab sich ein definierter Stem-loop mit zwei bzw. drei Ausbuchtungen und dem ACACCC Motiv in der terminalen Schlaufe.

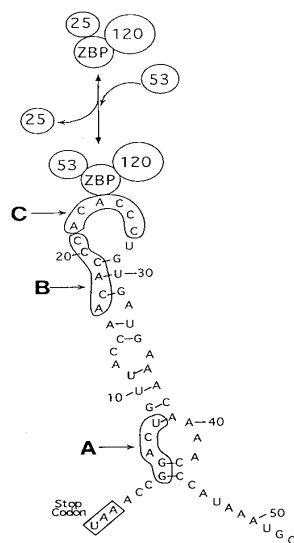


Abb. 4.1 Hypothetisches Modell der Bindung von ZBP-1 an β -Aktin. Die dargestellte Sekundärstruktur zeigt den Sequenzbereich von β -Aktin, in welchem sich der Zipcode befindet. Des Weiteren ist der mögliche Bindungsbereich von ZBP an β -Aktin abgebildet. A-C markieren die von Ross *et al.* durchgeführten Mutationsstellen. Die Mutation an A hatte einen geringen Effekt auf die Bindung. Die Mutation an B reduzierte die Bindung um 50 % und die Mutation an C reduzierte die Bindung um 95 %. Die Mutation beider ACACCC Elemente führte zur vollständigen Verhinderung der Bindung (Ross *et al.*, 1997).

Anhand des RNAfold Web Servers der Universität Wien wurde die Sekundärstruktur des *cas*-Transkripts berechnet und die Lage des Zipcodes in Bezug auf prominente Stem-loops ermittelt (siehe Abb. 4.2). Anders als bei β -Aktin befindet sich der *cas*-Zipcode in der CDS, nicht in der 3'UTR. Auch die Lage des Zipcodes unterscheidet sich wesentlich von der Platzierung des Zipcodes am Ende eines Stem-loops, wie es für β -Aktin berechnet wurde. Das *cas*-Transkript enthält zweimal die Zipcodesequenz CGGAC und zweimal die Sequenz ACACCC innerhalb eines 58 Basenpaar langen Bereiches. Die ersten drei Sequenzen befinden sich innerhalb eines Astes, welcher sich in drei kleinere Stem-loops aufspaltet (4.2 a). Die zweite ACACCC Sequenz liegt an der Basis eines benachbarten Stammes, welcher sich ebenfalls in mehrere Stem-loops aufteilt (4.2 b). Keine der Zipcodesequenzen innerhalb der *cas* mRNA befindet sich an einer vergleichbar prominenten Position wie in die Zipcodesequenz in β -Aktin und sind somit nicht so gut zugänglich für RNA-bindende Proteine. Es ist jedoch zu bedenken, dass sich durch den Spleißvorgang die sekundäre Struktur der *cas* mRNA verändern kann. Außerdem können weitere RNA-Bindeproteine an andere, Signal gebende Sequenzen der *cas* mRNA binden und daraus resultierende Konformationsänderungen die Zipcodesequenz in eine zugängliche Position bringen. Dieser Mechanismus wurde für IMP nachgewiesen. Die beiden Domänen KH3 und KH4, welche an Sequenzen innerhalb der ersten 28 Nukleotide des Zipcodes binden, falten sich in eine antiparallele pseudodimere Konformation. Dies bringt die beiden RNA-bindenden Bereiche der KH-Domänen an die gegenüberliegenden Seiten des Moleküls und verlangt

von der zu bindenden RNA einen 180° Richtungswechsel zur Bindung beider Motive. Durch den Richtungswechsel werden auseinanderliegende Bereiche der RNA in Nachbarschaft gebracht und zusätzliche RNA-Proteinbindestellen geschaffen (Chao *et al.*, 2010). Auf diese Weise könnten IMP1/ZBP-1 und andere Mitglieder der VICKZ Familie die Bindung anderer Proteine an RNA-Sequenzen vermitteln, ohne selbst in Protein-Protein-Komplexen involviert zu sein.

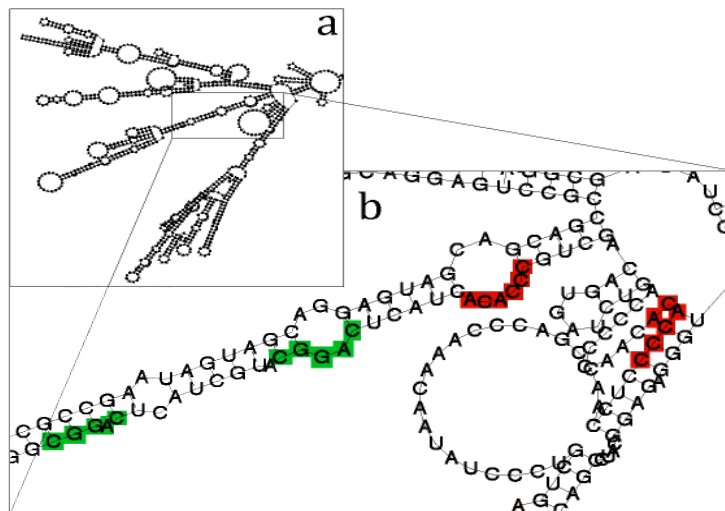


Abb. 4.2: Sekundärstruktur des *cas*-Transkripts im Bereich des Imp Zipcodes. A) Übersichtsabbildung eines Teilbereiches der *cas*-Sekundärstruktur. B) Vergrößerung des umrandeten Ausschnitts aus a. Die vier Teilsequenzen des Zipcodes in *cas* befinden sich innerhalb eines 58 Bp langen Sequenzbereichs. Die beiden CGGAC-Sequenzen sind in grün, die beiden ACACCC-Sequenzen sind in rot unterlegt. Im Unterschied zu β -Aktin, in welchem sich die zweite ACACCC-Sequenz am Ende eines Stem-loops befindet, liegen in *cas* die Sequenzen des Zipcodes innerhalb zweier längerer Äste, welche sich in weitere Stem-loops aufteilen. Die beiden mittleren Sequenzen, jeweils einmal CGGAC und ACACCC, befinden sich innerhalb des gleichen Astes in zwei aufeinanderfolgenden Ausbuchtungen. Das Modell wurde mithilfe des RNAfold Web Servers der Universität Wien berechnet (Gruber *et al.*, 2008).

Ein weiteres Gen, welches anhand eines Stem-loops in der 3'UTR erkannt und lokalisiert wird, ist *osk* (Jambor *et al.*, 2011). *osk* mRNA wird in den frühen Stadien der Oogenese in der Oozyte angereichert und ab dem embryonalen Stadium 9 strikt am posterioren Pol der Oozyte lokalisiert (Ephrussi *et al.*, 1991; Kim-Ha *et al.*, 1991; Lehmann und Nüsslein-Volhard, 1986). Der Kinesin abhängige Transport von *osk* zum posterioren Pol verläuft entlang des Mikrotubuliskeletts. Voraussetzung hierfür ist das Spleißen des ersten Introns (Brendza *et al.*, 2000; Hachet und Ephrussi, 2004; Jambor *et al.*, 2011; Zimyanin *et al.*, 2008). Hierdurch bildet sich ein kurzer Stem-loop, das SOLE (spliced oskar localization element), welches aus 18 Nukleotiden des ersten und 10 Nukleotiden des zweiten Exons besteht (Ghosh *et al.*, 2012; Simon *et al.*, 2015). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass der Exon-Junction-Complex (EJC) notwendig zur Lokalisierung der *osk* mRNA ist (Hachet und Ephrussi, 2001; Hachet und Ephrussi, 2004; Newmark und Boswell, 1994; Mohr *et al.*, 2001; Palacios *et al.*, 2004; van Eeden *et al.*, 2001). Der EJC bindet während des Spleißens in einem Abstand von 20-24 Nukleotiden upstream der Exon-Exon Grenze an die mRNA (Le Hir *et al.*, 2000; Tange *et al.*, 2004). Mit dem EJC wird auch Stau (Stau) rekrutiert, welches während der gesamten Oogenese zusammen mit der *osk* mRNA am posterioren Pol assoziiert bleibt und für die translationelle Aktivierung und die Verankerung von *osk* notwendig ist (Micklem *et al.*, 2000; St Johnston *et al.*, 1991; Zimyanin *et al.*, 2008). Interessanterweise konnte auch die Lokalisierung eines Fusionskonstrukts aus lacZ und

der *osk* 3'UTR am posterioren Pol der Oozyte nachgewiesen werden (Kim-Ha *et al.*, 1993). Dies ist jedoch abhängig von endogener *osk* mRNA. Hierbei ermöglicht ein weiterer in der 3'UTR lokalisierter Stem-loop die Dimerisierung ungespleißter und gespleißter *osk* mRNA (Jambor *et al.*, 2011). Die direkte RNA-RNA-Interaktion erlaubt die Mitnahme von ungespleißtem *osk* „auf dem Rücken“ von gespleißtem *osk* (hitchhiking). Während die gespleißte *osk* mRNA also aktiv entlang des Mikrotubuliskeletts zum posterioren Pol transportiert wird, wird die ungespleißte *osk* mRNA als Anhalter mitgenommen (Hachet und Ephrussi, 2004; Jambor *et al.*, 2011).

Auch das Segmentpolaritätsgen *wingless* (*wg*) wird als mRNA in Embryonen unterschiedlichster *Drosophila* Spezies lokalisiert (dos Santos *et al.*, 2008). Der Dynein abhängige Transport von *wg* zum apikalen Bereich des Embryos verläuft, wie im Falle von *osk*, entlang des Mikrotubuliskeletts (Wilkie und Davis, 2001). Die Lokalisation wird von drei Elementen in der *wg* 3'UTR vermittelt, den *wg* Lokalisationselementen (WLE) 1, 2 und 3 (Simmonds *et al.*, 2001; dos Santos *et al.*, 2008). Das WLE3 sticht besonders hervor, da es notwendig und ausreichend für die apikale Lokalisation der *wg* mRNA scheint. Die für dieses Element berechnete Sekundärstruktur zeigt einen unter verschiedenen *Drosophila* Spezies hoch konservierten Stem-loop. Er besteht aus einem distalen und einem proximalen Stamm, welcher von einer variablen Region unterbrochen wird (dos Santos *et al.*, 2008). Hierbei scheint die Nukleotidsequenz des terminalen Loops nicht maßgebend zu sein, da auch bei Austausch des gesamten Bereichs die Lokalisierung weiterhin funktioniert. Demgegenüber konnte gezeigt werden, dass Änderungen an kleineren Ausbuchtungen im distalen Stamm des Stem-loops eine weitaus größere Auswirkung auf die Lokalisation haben. Dies ist ungewöhnlich, da meist die im terminalen Loop gelegenen Nukleotide wichtige Erkennungsstellen für RNA-Bindeproteine sind (Cilley und Williamson, 2003; Cugusi *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 1997; Thapar *et al.*, 2015; Zanier *et al.*, 2002). Da der distale Stamm viel schwieriger zugänglich ist als die terminale Schlaufe, vermuten dos Santos und Kollegen, dass für die Erkennung der Lokalisationssequenz oder -struktur eine Entwindung des Stem-loops stattfinden muss. Dies könnte durch RNA-Helikasen ausgeführt werden. RNA-Helikasen katalysieren unter anderem die Auflösung von RNA-Sekundärstruktur und die Strangseparation (Lüking *et al.*, 1998). DEAD-box Helikasen, wie die eukaryotischen Translationsinitiationsfaktoren 4A und 4B (eIF4A und eIF4B) oder Vasa (Vas) aus *Drosophila*, beugen und entwinden doppelsträngige RNA und ermöglichen Ribosomen den Zugang zu Sequenzen, welche vorher unzugänglich waren (Gingras *et al.*, 1999; Pause und Sonenberg, 1992; Pause *et al.*, 1993; Rogers *et al.*, 1999; Rogers *et al.*, 2001; Rozen *et al.*, 1990; Schmid und Linder, 1991; Sengoku *et al.*, 2006). Des Weiteren sind sie nachweislich in die RNA-Lokalisierung involviert (Irion und Leptin, 1999; Liang *et al.*, 1994; Palacios *et al.*, 2004; Tinker *et al.*, 1998). Vas zum Beispiel ist notwendig für die Lokalisation und Translation von *grk* während der Oogenese (Tinker *et al.*, 1998). Dass der in der *cas* mRNA vorhandene Zipcode nicht an einem Stem-loop Ende liegt, muss also nicht bedeuten, dass er für lokalisierende RNA-Bindeproteine nicht zugänglich gemacht werden kann. Ein möglicher Kandidat zur Entwindung der *cas* mRNA im Nukleus ist die ubiquitär im Embryo vorliegende Helikase at 25E (Hel25E oder UAP56) (Eberl *et al.*, 1997). Hel25E ist essenziell für den Export gespleißter und ungespleißter mRNA. Außerdem unterstützt es durch die Freisetzung der mRNA von ihrem Transkriptionsort die Öffnung der Chromatinstruktur (Eberl *et al.*, 1997; Fleckner *et al.*, 1997; Gatfield *et al.*, 2001; Meignin und Davis, 2008).

4.4 Sind die Mitglieder des *grk* mRNA-Bindekomplex in die Kernrückhaltung der *cas* mRNA involviert?

Ein gut untersuchtes Beispiel eines mRNA-Bindekomplexes ist der *grk* Lokalisationskomplex. *Grk* gehört zu der Familie der TGF- β Signalliganden (Gonzalez-Reyes *et al.*, 1995; Neuman-Silberberg und Schüpbach, 1994). Während der Oogenese wird *grk* in den Follikelzellen produziert und über das mikrotubuläre System in das sich entwickelnde Ei transportiert (MacDougall *et al.*, 2003). Hier nimmt es eine Schlüsselrolle in der Spezifizierung der anterior-posterioren und dorso-ventralen Achse ein (Gonzalez-Reyes und St. Johnston, 1994). Der Transport von *grk* aus den Follikelzellen in die Oozyte erfolgt in den bereits beschriebenen RNP-Komplexen. Ein in der *grk* mRNA vorhandenes Lokalisationssignal sorgt hierbei dafür, dass *grk* erkannt, gebunden und in die Oozyte transportiert wird. Das *grk* Lokalisationssignal (GLS) wurde als eine 64 Bp lange Nukleotidsequenz im kodierenden Bereich von *grk* identifiziert (Van De Bor *et al.*, 2005). Die 64 Basen bilden einen konservierten Stem-loop, welcher notwendig und ausreichend zur apikalen Lokalisation von *grk* ist (Van De Bor *et al.*, 2005; Zuker, 2003). Der 64 Basenpaar große Stem-loop befindet sich in einem insgesamt 400 Basenpaar großen Fragment in der kodierenden Region von *grk*, von welchem bereits gezeigt werden konnte, dass es zur Lokalisation von *grk* notwendig ist (Saunders und Cohen, 1999; Thio *et al.*, 2000). Nur mit den um die GLS benachbarten Sequenzen kann injizierte *grk* mRNA mit voller Effizienz lokalisiert werden (Van De Bor *et al.*, 2005). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die *grk* Lokalisation in zwei Abschnitte geteilt werden muss. Sequenzen in der 5'UTR und der kodierenden Region werden in frühen Stadien der Oozyte zur Lokalisation von *grk* benötigt, während Sequenzen innerhalb der 3'UTR für die *grk* Lokalisation in mittleren bis späten Stadien der Oozytenentwicklung von Bedeutung sind (Saunders und Cohen, 1999; Thio *et al.*, 2000). Es scheint, die Lokalisation von *grk* unterliegt neben räumlichen auch zeitlichen Aspekten und je nach Zeitpunkt bzw. Lokalisationsort der mRNA werden unterschiedliche Sequenzen benötigt. Van De Bor *et al.* konnten mehrere Proteine identifizieren, die spezifisch an die GLS binden (Van De Bor *et al.*, 2005). Hierbei ermittelten sie die bereits bekannten Proteine Sqd, dImp und Hrb27c/Hrp48 (Goodrich *et al.*, 2004; Geng und Macdonald, 2006; Munro *et al.*, 2006). Sqd ist ein RNA-Bindeprotein und Mitglied der hnRNP Familie und ist im *grk* Transportkomplex für dessen translationale Repression und Lokalisation, als auch für die Verankerung der *grk* mRNA unabdingbar (Cáceres und Nilson, 2005; Delanoue *et al.*, 2007; Kelley, 1993; Neuman-Silberberg und Schüpbach, 1993; Norvell *et al.*, 1999). Hrp48 ist ein mRNA-Bindeprotein, wie Sqd ein Mitglied der hnRNP Familie, und interagiert zusammen mit Sqd in der Lokalisation von *grk* und *osk* mRNA (Goodrich *et al.*, 2004; Huynh *et al.*, 2004; Norvell *et al.*, 1999; Norvell *et al.*, 2005; Yano *et al.*, 2004). Das RNA-Bindeprotein dImp wurde bereits im ersten Kapitel der Diskussion behandelt. Des Weiteren konnte als neue Komponente das RNA-Bindeprotein Syp identifiziert und dessen Assoziation mit Sqd und Hrb27C/Hrp48 gezeigt werden (McDermott *et al.*, 2012). Syp ist notwendig für die korrekte Lokalisierung und Translation der *grk* und *osk* mRNA und involviert in mRNA-Spleißvorgänge (Herold *et al.*, 2009; McDermott *et al.*, 2012).

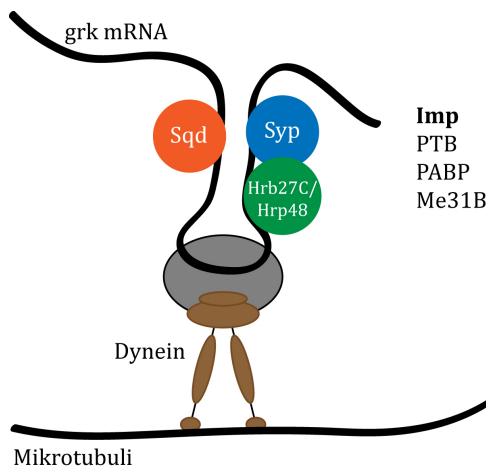


Abb. 4.3: Der grk mRNA-Lokalisationskomplex.
grk: gurken; Sqd: Squid, Syp: Syncrip, Hrb27C/Hrp48: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein at 27C, Imp: IGF-II mRNA-binding protein, PTB: Polypyrimidine tract binding protein, PABP: Poly(A) binding protein, Me31B: Maternal expression at 31B. (verändert nach McDermott *et al.*, 2012).

Eine eindeutige Aussage über die Involvierung der Mitglieder des mRNA-Bindekomplexes in die *cas* mRNA-Lokalisation kann anhand der durchgeführten Antikörperfärbungen nicht getroffen werden. Dies scheint jedoch eher nicht der Fall zu sein. Es konnte keine Kolo­kalisierung der Faktoren nachgewiesen werden (Abb. 3.29). Dies ist im Falle von Hrp48 und Syp zurückzuführen auf die Kernlokalisierung der *cas* mRNA. Die drei Faktoren, Hrp48, Syp und *cas*, werden zwar zeitgleich in den GMZs exprimiert, sind jedoch durch die Nuklearmembran räumlich voneinander getrennt. Dies überrascht, konnten doch Hrp48 und Sqd bereits im Nukleus nachgewiesen werden (Matunis *et al.*, 1992; Matunis *et al.*, 1992; Norvell *et al.*, 1999). Die Autoren vermuteten, dass die beiden Faktoren dort mit der zu lokalisierenden mRNA binden und weitere Faktoren im Cytoplasma rekrutieren. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht nachgewiesen werden.

4.5 Muscleblind könnte eine Rolle in der Kernretention von *cas* mRNA spielen

Das RNA-Bindeprotein Mbl spielt in der Entwicklung von *Drosophila* eine wichtige Rolle in der Photorezeptor- und Muskeldifferenzierung (Artero *et al.*, 1998; Begemann *et al.*, 1997). Des Weiteren sind unter anderem die Spleißvorgänge der Gene α -Aktin und *tungus* (*tun*) von Mbl abhängig und Wang und Kollegen postulieren sogar mehrere Hundert Mbl-abhängige Spleißvorgänge identifiziert zu haben (Machuca-Tzili *et al.*, 2006; Vicente *et al.*, 2007; Vicente-Crespo *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012). Wie bereits kurz zusammengefasst, führen ausgedehnte CTG- bzw. CUG-Triplettwiederholungen in spezifischen mRNAs zur Retention derselben im Zellkern. Hier bilden sie zusammen mit Mbl stabile, an die nukleare Matrix gekoppelte Cluster (Davis *et al.*, 1997; Houseley *et al.*, 2005; Taneja *et al.*, 1995). Diese Ansammlungen aus mRNA und Mbl sind unter anderem Kennzeichnung der humanen Krankheit Myotoner Dystrophie. Man unterscheidet zwei Formen der Krankheit, die gemeinsam haben, dass sich die Wiederholungen in den betroffenen mRNAs in doppelsträngige Stem-loops falten, welche von Mbl erkannt und gebunden werden. Durch die Bindung kann Mbl nicht seiner eigentlichen Aufgabe, dem alternativen Spleißen, nachkommen und es wird vermutet, dass dies zum Phänotyp der Myotonen Dystrophie beiträgt (Dere *et al.*, 2004; Fardaei *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2004; Kanadia *et al.*, 2003;

Kanadia *et al.*, 2006; Mankodi *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2000; Mooers *et al.*, 2005; Napierala und Krzyzosiak, 1997; Vicente-Crespo *et al.*, 2008).

Andere ausgedehnte Triplettwiederholungen wie CGG oder CAG sind ursächlich für Krankheiten wie Huntington (HD) oder spinocerebrale Ataxie (SCA) (Nakamori und Thornton, 2010; Nalavade *et al.*, 2013; Todd und Paulson, 2010). Die durch CAG-Wiederholungen ausgelösten Krankheitsbilder werden in zwei Gruppen eingeteilt: die Polyglutaminkrankheiten und die Krankheiten, in welchen die CAG-Wiederholungen in nicht kodierenden Bereichen der betroffenen Gene liegen. Polyglutaminkrankheiten zeichnen sich durch im kodierenden Bereich liegende CAG-Wiederholungen aus, welche bei Translation in ausgedehnte Glutaminabschnitte übersetzt werden (Nalavade *et al.*, 2013; Orr und Zoghbi, 2007). Diese ausgedehnten Abschnitte resultieren dann in einer Konformationsänderung des Proteins und toxischer Aggregatformation (Luheshi und Dobson, 2009; Orr und Zoghbi, 2007). Hierbei ist die ununterbrochene Wiederholung der CAG-Sequenz entscheidend. In einem *Drosophila* Model für SCA Typ 3 (SCA3) konnten Li *et al.* durch den Einbau eines einzelnen CAA-Triplets die Minderung der Toxizität bewirken. Wie auch bei langen Triplettwiederholungen in nicht kodierenden UTR-Bereichen der RNA, führen ungewöhnlich lange CAG-Wiederholungen in nicht translatierter RNA ebenfalls zu der in SCA3 typischen neuronalen Degeneration (Li *et al.*, 2008). Die durch die CAG-Abfolge induzierte Toxizität korreliert mit der Anzahl der Triplettwiederholungen. Je höher die Anzahl an Triplets, desto schwerwiegender die neuronalen Störungen. Li *et al.* konnten weiterhin zeigen, dass bei Hochregulation von *mbl* die Polyglutamintoxizität zunimmt. Dass humanes MBNL1 nicht nur mit CUG, sondern auch mit CAG-Triplettwiederholungen interagiert, konnte bereits bewiesen werden (Ho *et al.*, 2005; Kino *et al.*, 2004). Wie auch andere Mitglieder der Polyglutaminproteinfamilie (PolyQ-Proteinfamilie), aggregiert toxisches Ataxin-3 in bestimmten Hirnarealen zu intranuklearen Inklusionen (NI), deren Bildung beschleunigt wird durch erhöhte Level an PolyQ-RNA und PolyQ-Protein. (Davis *et al.*, 1997; Paulson *et al.*, 1997). Verantwortlich für die Erhöhung der PolyQ-Protein- und RNA-Level scheint unter anderem Mbl. Die durch CAG-Wiederholungen gebildeten RNA-Inklusionen befinden sich in einer limitierten Anzahl an Zellen und sind kleiner als die durch CUG-Wiederholungen gebildeten Inklusionen (Li *et al.*, 2008).

Aufgrund der vorliegenden Fakten schien eine Involvierung von Mbl in die Kernrückhaltung der *cas* mRNA möglich und wurde in der vorliegenden Arbeit anhand von Antikörperfärbungen und RNAi-Experimenten untersucht. Die Antikörperfärbungen an L3-Larvengehirnen zeigen eine Koexpression von Mbl und Cas in den Neuroblastennachkommen (Abb. 3.30). Der NB selbst ist nur Mbl, nicht jedoch Cas positiv. Der Knock down von Mbl in L3-Larvengehirnen resultiert in einer auffälligen *cas*-Expression in den NB-Nachkommen. Anstatt in einer Art Traube um den NB, formieren sich die *cas* positiven NB-Nachkommen zu einer untypischen Perlenkettenanordnung (Abb. 3.31 und 3.32). Die Analyse der CAG-Wiederholungen innerhalb des *cas*-Transkripts ergab eine Anzahl von insgesamt 126 Triplets. Somit ist deren Anzahl verglichen mit anderen zufällig gewählten Triplettwiederholungen um das Dreifache erhöht. Es fällt weiterhin auf, dass die Wiederholungen innerhalb der kodierenden Sequenz unregelmäßig verteilt sind. Ein Abschnitt mit unverhältnismäßig vielen Wiederholungen findet sich innerhalb der ersten 700 Bp des *cas*-Transkripts, ein weiterer Abschnitt innerhalb der Bp 1.900-2.300. Diese beiden Abschnitte enthalten zusammengefasst 70 CAG-Wiederholungen und damit mehr als die Hälfte aller in *cas* enthaltenen CAG-

Wiederholungen. Im vorderen Abschnitt finden sich einmal sechs und einmal sieben zusammenhängende CAG-Wiederholungen, welche jeweils von einem CAA-Triplett an dritter Stelle unterbrochen werden (siehe 3.7.1). Des Weiteren findet sich im hinteren Abschnitt eine Aneinanderreihung von zehn CAG-Triplettwiederholungen. Obwohl diese Wiederholungen auffällig erscheinen, stehen sie in keinem Verhältnis zu der Anzahl an Wiederholungen in Genen erkrankter Individuen. So wurden in SCA-Patienten 61-84 aufeinanderfolgende CAG-Triplets gefunden (Paulson *et al.*, 1997). In Huntington Patienten wurden toxische CAG-Wiederholungen zwischen 35 und 180 gefunden. Die Anzahl der Wiederholungen korreliert hierbei mit Stärke und Eintreten der Krankheitssymptome (Bates *et al.*, 1997; Davis *et al.*, 1997). Die ungewöhnlich langen CAG-Wiederholungen bestimmen nachhaltig die Sekundärstruktur der betroffenen Gene. Am Lokalisationsort der CAG-Wiederholungen bildet sich eine Haarnadelformation bestehend aus einer Basis, einem Stamm und einer abschließenden Schleife (Galvao *et al.*, 2001; Sobczak und Krzyzosiak, 2005; Sobczak *et al.*, 2003). Die Schlaufengröße variiert in Abhängigkeit von der Anzahl der CAG-Wiederholungen zwischen vier und sieben Nukleotiden. Der Stamm besteht aus sich wiederholenden G-C bzw. C-G Paaren, die von einer Fehlpaarung durch die dazwischen liegenden As unterbrochen werden, und er wird durch eine an der Basis liegende G-C Bindung stabilisiert (Sobczak und Krzyzosiak, 2005; Sobczak und Krzyzosiak, 2004; Sobczak *et al.*, 2003). Die Analyse der Sekundärstruktur des *cas*-Transkripts bestätigt die beschriebenen Haarnadelstrukturen. Innerhalb der zwei auffälligen Abschnitte mit gehäuftem Auftreten der CAG-Triplets finden sich zwei, der von Sobczak *et al.* beschriebenen, Haarnadelformationen (Abb. 4.4a und b). Eine weitere Haarnadel ähnliche Struktur wird durch zwei Triplets unterbrochen, entspricht aber in ihren Grundzügen der ermittelten Formation (Abb. 4.4c). Ein interessanter Aspekt der gezeigten Haarnadelstrukturen ist das vermehrte Auftreten des Triplets CAA in denselben und den benachbarten Stem-loops. Teilabbildung 4.3a zeigt neben der betreffenden Haarnadelformation inklusive des CAA-Triplett in der Schleife zwei weitere Stem-loops mit ähnlicher Positionierung des CAA-Triplets. Die Besonderheit und mögliche Auswirkung eines CAA-Triplett innerhalb der CAG-Wiederholungen wurde bereits dargelegt.

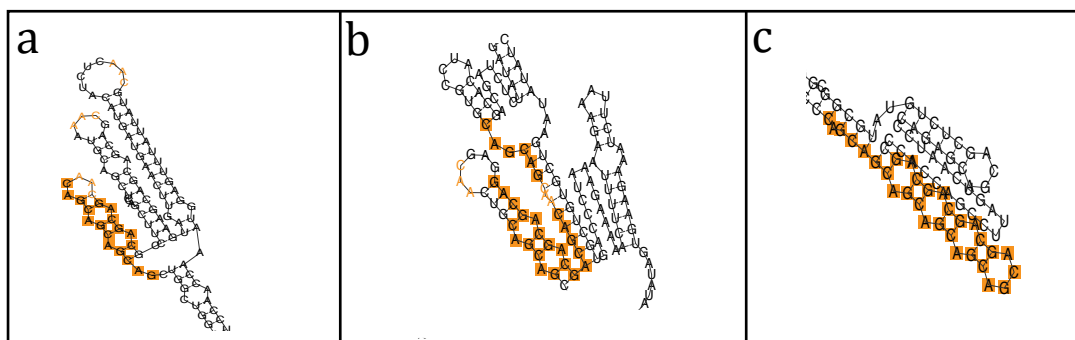


Abb. 4.4: Auffällige Haarnadelstrukturen im *cas*-Transkript. Farbige unterlegte Nukleotide: CAG-Triplettwiederholung; Farbige Nukleotide: CAA-Triplettwiederholungen. a) Farbige unterlegte Nukleotidsequenz: CAGCAGCAACAGCAGCAGCAG b) entsprechend: CAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCAG c) entsprechend: CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG. Das Modell wurde mithilfe des RNAfold Web Servers der Universität Wien berechnet (Gruber *et al.*, 2008).

Eine weitere Aufgabe von MLP1/MBLL/MBNL2 - eines von drei humanen Orthologen von Mbl - ist die RNA-abhängige Lokalisation von Integrin $\alpha 3$. Adereth und Kollegen konnten

die gemeinsame Lokalisation der beiden Faktoren in größeren Protein-RNA-Komplexen nachweisen und zeigen, dass MLP1 spezifisch an die 3' UTR von Integrin $\alpha 3$ bindet, welche das Sequenzmotiv ACACCC enthält (Adereth *et al.*, 2005). Dieses Sequenzmotiv ist bereits als wichtige Lokalisationssequenz in der β -Aktin 3' UTR in Erscheinung getreten und könnte ein weiterer Hinweis auf die Involvierung von Mbl in die nukleare Retention der *cas* mRNA sein, den es zu untersuchen gilt.

4.6 RNA-bindende Strukturen im Zellkern

In vorherigen Experimenten konnte anhand embryonaler Neuroblastenanalysen gezeigt werden, dass die Freisetzung der *cas* mRNA aus dem Zellkern während der Ana- bzw. Telophase des Mitosezyklusses erfolgt. Anhand der Neuroblastenstammbäume NB6-1 und NB 2-4 konnte durch *cas* mRNA in-situ Hybridisierungen in Kombination mit PH3 Färbungen der genaue Zeitpunkt der Freigabe der *cas* mRNA aus dem Kern ermittelt werden. Vor der Mitose ist die *cas* mRNA ubiquitär im Zellkern verteilt. Während der Prometa- bzw. Metaphase verbleibt die bereits aus dem Zellkern freigesetzte *cas* mRNA in Chromosomennähe und verteilt sich erst während der Ana- bzw. Telophase auf die beiden Tochterzellen (Fischer, 2009). Diese Beobachtung seitens Fischer könnte auf eine Beteiligung oder Verankerung der *cas* mRNA an einem im Zellkern vorliegenden Komplex hinweisen. Bei diesem Komplex könnte es sich um einen der dort befindlichen nuklearen Subkompartimente oder nuklearen Zellkörper handeln. Es gibt z.B. die Cajal Körper, die Gems (Gemini der Cajal Körper), die Promyelozytenleukämiekörperchen (PML), die Paraspeckles und Speckles. Letztere sind im gesamten interchromatinen Raum des Nukleus verteilt und in ihrer Struktur sehr dynamisch. Neben vielen prä-mRNA Spleißfaktoren enthalten sie auch Transkriptionsfaktoren und strukturelle Proteine (Fu, 1995; Jagatheesan *et al.*, 1999; Larsson *et al.*, 1995; Mortillaro *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 2010; Spector und Lamond, 2011). Bei Abnahme der Transkriptionsrate kommt es zu Morphologieänderungen der Speckles. Dies könnte auf eine Funktion der Speckles in der Lagerung und Verteilung von prä-mRNA und dazu notwendigen Spleißingfaktoren zu Transkriptions- und Spleißorten hinweisen (Hall *et al.*, 2006; Huang und Spector, 1991; Melcak *et al.*, 2000; Misteli *et al.*, 1997a; Misteli und Spector, 1997b; Spector *et al.*, 1991). Die mRNA Lokalisation in Verbindung mit nuklearen Speckles wurde außerdem in der Entwicklung von Mikrosporen in *Marsilea vestita*, einem Wasserfarn, beschrieben. Die Sporen von *M. vestita* trocknen und ruhen bis zu ihrer Rehydratation. Während dieser Ruhephase verbleiben sie transkriptionell untätig und erst mit ihrer Rehydratation startet die Translation gespeicherter mRNAs. Diese werden auch als getarnte (masked) mRNAs bezeichnet, welche für ihre Translation enttarnt werden müssen (Sommerville und Lodomery, 1996). Die Speicherung der mRNAs erfolgt in Speckles im Nukleus der getrockneten Spore (Deeb *et al.*, 2010). Teilt sich der Gametophyt nach der Rehydratation das erste Mal, verlässt auch die in den Speckles gespeicherte RNA den Zellkern und deren Translation kann beginnen (Boothby und Wolniak, 2011). Speckles sind außerdem in die Kernrückhaltung der gut untersuchten Poly(A)⁺ RNA involviert. Dies beschrieben Carter und Kollegen anhand von In-situ Hybridisierungen bereits 1991 (Carter *et al.*, 1991; Carter *et al.*, 1993). Weiterführende Experimente zeigten, dass auch bei inhibierter Transkription, große Mengen an Poly(A)⁺ RNA im Nukleus verbleiben und an interchromatine Cluster gebunden sind (Huang *et al.*, 1994). Eine mögliche Involvierung der Speckles in die Kernrückhaltung der *cas* mRNA, könnte durch eine Doppelfärbung von

cas und MALAT1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1), einem Marker für nukleare Speckles, getestet werden.

4.7 Die mögliche Rolle des Spleißvorgangs bei der Kerlokalisation der *cas* mRNA

Das Spleißen ist ein hochkonservierter regulatorischer Prozess im Zellkern von Eukaryoten und einer von drei großen Schritten der prä-mRNA Verarbeitung zur Generierung der finalen mRNA. Beim Spleißen werden die Introns entfernt und die kodierenden Bereiche der mRNA zusammengefügt. Die mRNA-Prozessierung besteht des Weiteren aus dem Anfügen einer Cap-Struktur am 5'-Ende der mRNA und der Polyadenylierung des 3'-Endes. Die 5' und 3'UTR beinhalten wichtige regulatorische Sequenzen wie Translationsinitiationssequenzen, Bindestellen für Proteine oder die Polyadenylierungssequenz (Soller, 2006). Viele Zipcodes finden sich, unabhängig vom untersuchten Organismus, vorwiegend in den UTR-Bereichen der transportierten mRNA (Deshler *et al.*, 1997; Gavis *et al.*, 1996; Kim-Ha *et al.*, 1993; Kislauskis *et al.*, 1993; Kislauskis *et al.*, 1994; Macdonald und Kerr, 1997; Martin und Ephrussi, 2009; Zhou and King, 1996). Die apikale Lokalisation von *bicoid* (*bcd*) aus *Drosophila* benötigt zum Beispiel ein 437 Bp langes Element bestehend aus 3 konservierten Stämmen, welche in der 3'UTR lokalisiert sind (Macdonald, 1990; Snee *et al.*, 2005). Auch das Transport- und Lokalisationssignal (TLS) des *K10* Transkripts besteht aus einem 44 Nukleotid langen Stem-loop in der 3'UTR (Serano and Cohen, 1995). Die TLS ist ausreichend zur apikalen Lokalisation ektopisch exprimierter *K10* mRNA in Follikelzellen und synzytialen Embryonen (Bullock und Ish-Horowicz, 2001; Cohen *et al.*, 2005; Karlin-McGinness *et al.*, 1996).

Die genannten Beispiele verdeutlichen, dass die Länge der Lokalisationssignale, zwischen fünf oder sechs, bis hin zu mehreren Hundert Nukleotiden variieren kann. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass aufgrund ihrer Variabilität in Sequenz und Struktur die Zipcodes nicht immer auf ihre minimal notwendige Länge reduziert werden können. Hinzu kommt, dass sie in ihrer Position innerhalb der mRNA nicht alleinig auf die UTR's beschränkt, sondern durchaus auch in kodierenden Bereichen zu finden sind. Des Weiteren können in den UTR's lokalisierte Zipcodes, auch bei Verlagerung in den kodierenden Bereich der mRNA oder vice versa noch funktional sein (Chartrand *et al.*, 1999; Cohen *et al.*, 2005; Gonzalez *et al.*, 1999; Hachet und Ephrussi, 2004; Jambhekar und Derisi, 2007; Shepard *et al.*, 2003). Obwohl keine allgemeingültigen Regeln für Lokalisationssequenzen unter den verschiedenen Zelltypen existieren, gibt es Zipcodes, die in unterschiedlichen Zelltypen funktional sind. Dies lässt vermuten, dass universelle Zipcodes existieren, die von gemeinsamen RNA-Bindeproteinen erkannt werden (Bullock und Ish-Horowicz, 2001; Martin und Ephrussi, 2009). Dies könnte im Falle des in *cas* gefundenen Zipcodes vorliegen. Erstmals wurde der Zipcode in der 3'UTR von β -Aktin gefunden. In *cas* liegt er jedoch in doppelter Ausführung im kodierenden Bereich der mRNA vor. Aufgrund der Tatsache das Lokalisationssequenzen in der CDS eher ungewöhnlich sind, wurde in vorhergehenden Experimenten vermehrt Augenschein auf die UTR's und Introns von *cas* gelegt. Hier konnte Melanie Homberg zeigen, dass trotz Deletion der UTR's und Introns die in der Epidermis exprimierten *cas* mRNA-Konstrukte weiterhin im Nukleus zurückgehalten werden. Eine Involvierung von Sequenzen innerhalb der Intron- und UTR'-

Bereiche können daher ausgeschlossen werden. Anhand von zwei unterschiedlich konstruierten Sonden, welche gezielt an Intron- bzw. Exonbereiche der *cas* mRNA binden, konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass es sich bei dem im Kern zurückgehaltene endogene *cas* mRNA um die bereits gespleißte *cas* mRNA handelt. Das Signal der Intronsonde ist auf die zwei Transkriptionspunkte von *cas* reduziert, wohingegen das Signal der Exonsonde eine im Kern verteilte Ansammlung der *cas* mRNA zeigt. Dies spricht ebenfalls dafür, dass sich in den Intronbereichen von *cas* keine direkten Lokalisationssequenzen enthalten sind. Eine Involvierung des Spleißvorgangs kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Dass mRNA-Prozessierung, die Erkennung der Zipcodesequenz und die anschließende Lokalisierung der mRNA zusammenhängen, ist Gegenstand aktueller Forschung.

Wird in Embryonen, welche kein endogenes *osk* besitzen, ein intronloses Transkript des Gens exprimiert, findet keine Lokalisation am posterioren Pol der Oozyte statt. Für die korrekte Lokalisation von *osk* am posterioren Pol der Oozyte ist das Herausspleißen des ersten Introns von *osk* essenziell. Hierbei ist die eigentliche Sequenz des Introns nicht von Bedeutung, sondern der Spleißvorgang an sich (Hachet und Ephrussi, 2004). Hachet und Ephrussi konnten des Weiteren zeigen, dass die posteriore Lokalisation von lacZ durch die *osk* 3'UTR abhängig von endogener *osk* mRNA ist. Das lacZ-*osk*3'UTR-Fusionskonstrukt wird vermutlich durch den bekannten Mechanismus des Hitchhikers mit endogener *osk* mRNA lokalisiert. Die Entstehung endogener *osk*-Lokalisationskomplexe ist hierbei abhängig vom Spleißvorgang und die *osk* 3'UTR vermittelt die Assoziation der RNA in Ribonukleinkomplexe. Des Weiteren ist das Spleißen des ersten Introns notwendig zur Kolokalisation der *osk* mRNA mit Y14, einer Komponenten des Exon-Junction-Complex (EJC), und zusammen mit Mago nashi (Mago) essenziell für die *osk* Lokalisation (Hachet und Ephrussi, 2001; Hachet und Ephrussi, 2004; Le Hir *et al.*, 2000; Mohr *et al.*, 2001; Newmark und Boswell, 1994; Palacios, 2002). Auf der anderen Seite lokalisieren manche, in Oozyten injizierte RNAs inklusive einer Lokalisationssequenz, ohne prozessiert zu werden (Glotzer *et al.*, 1997). Dasselbe gilt für lokalisierte nichtkodierende RNAs, welche höchstwahrscheinlich keiner RNA-Prozessierung ausgesetzt sind. Hier sind als Beispiele *Xenopus laevis* short interspersed repeat transcripts (*Xlsirt*) aus *Xenopus* und die lncRNA MALAT1 aus der Maus zu nennen (Kloc *et al.*, 1993; Prasanth und Spector, 2007; Hutchinson *et al.*, 2007). Nichtkodierende RNAs übernehmen außerdem funktionelle Rollen in der Dosiskompensation von *Drosophila*. In der männlichen Fliege wird das X-Chromosom hochreguliert, um einen transkriptionellen Ausgleich zur weiblichen Fliege mit zwei X-Chromosomen zu erreichen. Dieser Prozess ist abhängig von der Assoziation des MSL-Komplexes (male-specific-lethal) mit dem X-Chromosom. Zur Funktionalität der Dosiskompensation sind außerdem die beiden *RNA on the X* RNAs (*roX1/2*) nötig, welche zusammen mit dem MSL Proteinkomplex an spezifische Chromatinstellen binden und Gene des X-Chromosoms hochregulieren (Amrein und Axel, 1997; Franke und Baker, 1999; Kelley *et al.*, 1999; Meller *et al.*, 1997; Meller *et al.*, 2000; Prasanth und Spector, 2007). Mit Hilfe biochemischer und genetischer Analysen in Säugertierzellen wurden in den letzten Jahren weitere nrRNAs (nuclear retained RNA) entdeckt die unter anderem Funktionen in Chromatinregulation haben (Huang *et al.*, 1994; Tripathi *et al.*, 2014).

4.8 RNPs und Kernexport

RNA-Prozessierung und Kernexport sind eng miteinander verbunden und vor Abschluss der RNA-Prozessierung ist ein Austritt der RNA aus dem Nukleus nicht möglich. So verhindern Spleißsignale und Introns den Export der prä-mRNA (Chang und Sharp, 1989; Legrain und Rosbash, 1989; Nakielny *et al.*, 1997). Die 5'-Cap-Struktur und der am 3'-Ende angebrachte Poly(A)-Schwanz fördern den mRNA-Export, sind jedoch nicht notwendig (Eckner *et al.*, 1991; Hamm und Mattaj, 1990; Huang und Carmichael, 1996; Jarmolowski *et al.*, 1994; Nakielny *et al.*, 1997). Es ist außerdem wichtig zu betonen, dass der Export der mRNA nicht als nackter Nukleotidstrang erfolgt, sondern vielmehr als verflochtener RNP (Nakielny *et al.*, 1997; Izaurralde und Mattaj, 1995; Quimby und Corbett, 2001). Inwieweit hnRNPs in den RNA Export involviert sind, ist noch nicht eindeutig geklärt, jedoch gibt es einige Hinweise zu deren Beteiligung. Obwohl sie sich vornehmlich im Nukleus befinden pendeln einige Vertreter dieser Familie zwischen dem Kern und dem Cytoplasma (Krecic und Swanson, 1999; Pinol-Roma und Dreyfuss, 1991,1992). Hierbei assoziieren sie im Nukleus mit mRNAs und schleusen sie aus diesem heraus. Im Cytoplasma rekrutieren sie dann weitere Proteine, die zum Beispiel an der Lokalisation der exportierten mRNA beteiligt sind (Jambhekar und Derisi, 2007; Kress *et al.*, 2004; Lall *et al.*, 1999). Manche hnRNPs sind während der Interphase an das Zellkerninnere gebunden (Pinol-Roma und Dreyfuss, 1992; Visa *et al.*, 1996). Sie besitzen eine nukleare Retentionssequenz (NRS), die die Funktion der nuklearen Exportsequenz außer Kraft setzt und ein Freisetzen der gebundenen RNPs ins Cytoplasma verhindert. Dieser Mechanismus verhindert ein verfrühtes Freisetzen unfertig prozessierter Transkripte (Nakielny und Dreyfuss, 1996, 1997).

Dies verdeutlicht, dass die Zusammensetzung des RNPs genauestens reguliert werden muss. Es ist für das Schicksal der mRNA entscheidend, welches RNA-Bindeprotein anfänglich bindet und welche weiteren Proteine es rekrutiert. Der EJC spielt hierbei durch seinen Eingriff in den Spleißvorgang eine tragende Rolle in der Kopplung nuklearer und cytoplasmatischer Genexpression (Boehm und Gehring, 2016; Tange *et al.*, 2004). Der EJC ist ein ca. 335 kDa großer RNP, der während des Spleißens an die mRNA bindet (Kataoka *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001; Le Hir *et al.*, 2000). Bindungsort ist hierbei immer ca. 20-24 Nukleotide upstream einer Exon-Exon Schnittstelle an die frisch gespleißte mRNA (Glisovic *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2001; Le Hir *et al.*, 2000). Zuerst bindet im Nukleus die DEAD box RNA-Helikase eIF4AIII (eukaryotic initiation factor 4A-III) zusammen mit dem IBP160 (Intron-Bindeprotein 160) an die prä-mRNA (Andersen *et al.*, 2006; Bono *et al.*, 2006; Gehring *et al.*, 2009; Ideue *et al.*, 2007; Shibuya *et al.*, 2004). Im Nukleus binden des Weiteren Mago (Mago homolog) und Y14 (Boswell *et al.*, 1991; Hachet and Ephrussi, 2001; Kataoka *et al.*, 2000; Le Hir *et al.*, 2000; Mohr *et al.*, 2001). Metastatic lymph node 51 (MLN51; Barentsz (Btz) in *Drosophila*), das vierte Protein des EJC-Kernkomplexes, kommt nach dem Export aus dem Nukleus hinzu (Degot *et al.*, 2004; Gehring *et al.*, 2009; Herold *et al.*, 2009). Im Falle der *osk* mRNA in *Drosophila* verbleiben diese vier EJC-Kernproteine bis zu dessen Lokalisation im Cytoplasma mit ihr verbunden (Dostie und Dreyfuss, 2002; Glisovic *et al.*, 2008; Hachet und Ephrussi, 2001; Mohr *et al.*, 2001; Eeden *et al.*, 2001). Dies demonstriert den möglichen Einfluss der RNPs auf mRNA-Lokalisation und wie die Rekrutierung spezifischer Proteine im Nukleus diese auch im Cytoplasma steuern können. Ein Einfluss des EJC im Falle der Kernretention der *cas* mRNA scheint kann nicht ausgeschlossen und sollte untersucht werden. Hierfür könnte ein Knock down von Mago oder Y14 durchgeführt und die Kernretention der *cas* mRNA überprüft werden.

Zusätzlich muss bedacht werden, dass auf dem Weg der prozessierten mRNA ins Cytoplasma, weitere wichtige Komplexe in den verhinderten Kernexport der *cas* mRNA involviert sein können. Hier ist vor allem der TREX (TRAnscription-EXport) Komplex zu nennen. Hierbei handelt es sich um einen evolutionär hochkonservierten Proteinkomplex, der in die Transkription und den nuklearen Export von mRNAs involviert ist. Während der Transkription folgt der TREX-Komplex der RNA Polymerase II und vermittelt die Bindung assoziierter Faktoren und RNPs an die mRNA in Vorbereitung auf den nuklearen Export (Katahira, 2012; Reed und Cheng, 2005; Rondon *et al.*, 2010; Strässer *et al.*, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass der TREX-Komplex an die 5'-Region gespleißter mRNAs bindet. Dies wird wahrscheinlich durch den nuklearen Cap-bindenden Komplex (CBC) vermittelt, welcher dem TREX-Komplex als eine Art Wegweiser dient und die korrekte Positionierung des TREX-Komplexes an die mRNA vorgibt (Cheng *et al.*, 2006). Durch die Positionierung des TREX-Komplexes am 5'-Ende der mRNA könnte deren Translokation durch die sogenannten Kernporen (nuclear pore complex, NPC) vermittelt werden (Björk und Wieslander, 2011). Bei den NPCs handelt es sich um Kanäle in der Kernmembran durch welche Moleküle aus dem Kern ins Cytoplasma (oder umgekehrt) passieren können (Fahrenkrog und Aebi, 2003; Fried und Kutay, 2003; Quimby und Corbett, 2001). Kleine Moleküle bis zu 60 kDa können durch den NPC diffundieren, während größere Moleküle aktiv hindurch transportiert werden müssen (Dimaano und Ullman, 2004; Pemberton und Paschal, 2005; Terry und Went, 2007; Quimby und Corbett, 2001). Die Freisetzung der *cas* mRNA aus dem Zellkern erfolgt größtenteils bei Zellteilung, was die Möglichkeit offenlegt, dass die in RNPs verpackte *cas* mRNA daran gehindert wird, durch den NPC ins Cytoplasma zu gelangen. Ob dies aufgrund seiner räumlichen Ausdehnung durch gebundene Proteine oder an Signalen innerhalb dieser Proteine liegt, kann nur vermutet werden. So könnten Mitglieder des an die *cas* mRNA gebundenen Proteinkomplexes Sequenzen enthalten, welche einen Export der mRNA aus dem Zellkern verhindern. Ein Kandidat wäre hier das Gen *small bristles (sbr)*, das Drosophila-Ortholog zum humanen NXF-1 (Nuclear RNA export factor 1) und Mex67 (mRNA export factor) aus der Hefe. NXF-1 ist ein zellulärer Co-faktor, der für den nuklearen Export von mRNAs benötigt wird (Grüter *et al.*, 1998; Pasquinelli *et al.*, 1997; Wilkie *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass *sbr* in *Drosophila* essenziell für den nuklearen Export vieler mRNAs ist und eine Mutation die Akkumulation verschiedener mRNAs im Kern mit sich zieht. Die Blockierung des Exports ist nicht zurückzuführen auf Defekte im Spleißen, Fehler im nuklearen Proteinimport oder einer abnormen nuklearen Struktur. Die mRNA scheint kompetent für den nuklearen Export zu sein, kann jedoch den NPC nicht passieren (Wilkie *et al.*, 2001). Eine Involvierung von *sbr* in die Retention der *cas* mRNA durch die Blockierung der NPCs sollte daher in Betracht gezogen und durch Analysen der *cas* mRNA-Lokalisierung in *sbr* Mutanten untersucht werden.

4.9 Das temporale Spezifizierungsgen *svp*

Auf die Entstehung von Neuronen und Glia im embryonalen Neuroblasten wurde bereits in der Einleitung dieser Arbeit eingegangen. Der NB teilt sich auf stammzellartige Weise und generiert eine Reihe von GMZs, welche sich wiederum einmal teilen und zwei postmitotische Zellen, Neuronen und/oder Glia, hervorbringen. Durch die Expression temporaler Spezifizierungsgene ändert sich die zeitliche Identität des Neuroblasten und es resultiert die Entstehung unterschiedlicher GMZs und deren Nachkommen. Am Ende eines

definierten Zeitfensters werden die Spezifizierungsgene im NB abgeschaltet; in der GMZ und deren Nachkommen jedoch beibehalten. Bei den sequenziell exprimierten Genen handelt es sich um die Transkriptionsfaktoren Hb, Kr, Pdm1/Pdm2, Cas und Grh (Brody und Odenwald, 2000; Grosskortenhaus *et al.*, 2005; Isshiki *et al.*, 2001; Kambadur *et al.*, 1998; Mettler *et al.*, 2005; Novotny *et al.*, 2002). Hb und Kr sind notwendig und ausreichend für die Spezifizierung der frühen Neuroblasten und eine verlängerte Expression von *hb* hält den NB, bis zu dessen Abschaltung, in einem multipotenten Stadium (Isshiki *et al.*, 2001; Novotny *et al.*, 2002; Pearson und Doe, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass der Wechsel der Hb/Kr Expression in Abhängigkeit der NB-Teilung und dem nuklearen Rezeptor *seven-up* (*svp*) steht (Grosskortenhaus *et al.*, 2005; Isshiki *et al.*, 2001; Kanai *et al.*, 2005). Innerhalb etlicher Stammbäume bewirkt der Verlust des Transkriptionsfaktors Svp eine Erhöhung der Hb-positiven Zellen. Eine frühzeitige Expression hingegen führt zu einem Verlust der Hb-positiven Nachkommen (Kanai *et al.*, 2005). Mit der Teilung des Neuroblasten und der Verteilung der *svp* mRNA auf dessen Nachkommenzellen wird im NB die Hb-Expression abgeschaltet. In der entstehenden GMZ bleibt die Expression von Hb jedoch weiter bestehen (Kanai *et al.*, 2005). Dies beruht auf die asymmetrische Verteilung des Zellschicksal bestimmenden Faktors Prospero (Pros). Pros ist ein Homeodomain-Transkriptionsfaktor, welcher vor der NB-Teilung basal in diesem lokalisiert. Bei der Teilung wird er ausschließlich an die neu geformte GMZ abgegeben, inhibiert in dieser die Svp Aktivität und verhindert somit, dass die *hb* Expression abgeschaltet wird (Chu-Lagraff *et al.*, 1991; Doe *et al.*, 1991; Hirata *et al.*, 1995; Knoblich *et al.*, 1995; Mettler *et al.*, 2005; Spana und Doe, 1995; Vassin *et al.*, 1991). Besonders interessant ist, dass die *svp* Expression bereits vor der Teilung des Neuroblasten beginnt, die Abschaltung der *hb* Expression jedoch Mitose gebunden ist (Grosskortenhaus *et al.*, 2005; Isshiki *et al.*, 2001; Kanai *et al.*, 2005; Mettler *et al.*, 2005). Die *hb* Expression in *svp* exprimierenden Neuroblasten nimmt zwar bereits vor der Teilung des Neuroblasten ab, die Konzentration an Svp reicht jedoch nicht aus die *hb* Expression vollständig zu inhibieren. Diese ineffiziente Translation von *svp* ist zurückzuführen auf die Rückhaltung des Großteils der *svp* mRNA im Zellkern des Neuroblasten vor dessen Teilung. Sie wird erst bei der Teilung des Neuroblasten freigesetzt und kann dann die *hb* Expression im neu gebildeten NB vollständig unterbinden (Mettler *et al.*, 2005).

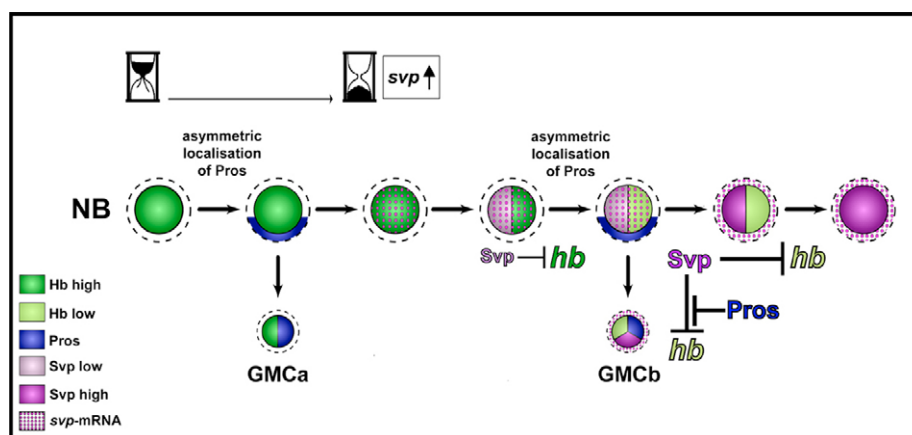


Abb. 4.5: Schematische Darstellung der *hb* Regulation im NB durch *Svp*. Die *svp*-Expression beginnt im NB in Abhängigkeit vom jeweiligen Stammbaum. Bei einem NB mit zwei Hb-abhängigen GMZ (GMZa/b) mit unterschiedlichem Schicksal beginnt die *svp* Expression nach der Generierung der ersten GMZ (GMZa). Das gebildete *svp* wird zum Großteil im Zellkern zurückgehalten, wodurch nur eine geringe Menge an Svp Protein

hergestellt wird, welche jedoch ausreicht die *hb* Expression im NB zu reduzieren. Mit der Teilung der Zelle wird das im Kern zurückgehaltene *svp* frei, translatiert und beendet im neu gebildeten NB die *hb*-Expression. In der GMZb wird *Svp* durch das asymmetrisch verteilte *Pros* inhibiert und die *hb*-Expression wird aufrechterhalten (Mettler et al., 2005).

Im Folgenden soll nun diskutiert werden, ob im Falle der Kernrückhaltung der *cas* mRNA im Zellkern von Neuroblasten bzw. GMZs, ein ähnlicher biologischer Hintergrund vorliegen könnte wie im Falle der Kernrückhaltung von *svp*. Wie bereits beschrieben ist die Expression von *cas* in der Larve auf den Neuroblasten (L2) bzw. die GMZ (L3) beschränkt und es konnte keine *cas*-Expression in den Nachkommenzellen der GMZ festgestellt werden.

Der erste *cas* exprimierende NB in jedem HS ist der NB 6-1 (Cui und Doe, 1992). In St. 11 findet die *cas*-Expression in 17 Neuroblasten eines jeden Hemisegmentes des sich entwickelnden Nervensystems statt und findet in den Embryonalstadien 11 und 12 ihr Maximum. Die Nachkommenzellen (Neurone und Glia) sind hiervon jedoch ausgeschlossen. In diesen befindet sich nur Cas Protein, welches nach der Teilung der GMZ translatiert und in den Zellkern transportiert wird. Innerhalb der Kaskade der temporalen Spezifizierungsgene aktiviert Cas die Expression von *grh* und beschränkt die Expression von *Pdm1*. Diese Repression wird vermittelt durch eine DNA-Bindesequenz, welche auch in *hb* zu finden ist (Kambadur et al., 1998). Dieser Mechanismus garantiert die korrekte Abfolge der temporalen Identitätsgene in Neuroblasten und GMZs. Der Verlust von *cas* sorgt in einigen Neuronen und Glia für einen Verlust der *en* Expression. Gleichzeitig treten in anderen Bereichen des ZNS zusätzliche *en*⁺ Zellen auf (Cui und Doe, 1992; Mellerick et al., 1992). Dies wird vermutlich vermittelt durch Cas, welches sich auf die Neurone und Glia beschränkt. Es könnte vermutet werden, dass durch die Kernrückhaltung der *cas* mRNA in den GMZs eine zu frühe Translation verhindert wird. Da Cas erst in den Nachkommenzellen benötigt wird, sammelt sich die *cas* mRNA im Zellkern der GMZs an und wird erst bei der Teilung frei. Würde die *cas* mRNA auf herkömmliche Weise direkt ins Cytoplasma entlassen und translatiert, steht bei der Teilung der GMZ vielleicht nicht genug Cas Protein für die entstehenden Nachkommenzellen zur Verfügung. Die Vermutung eines epigenetischen Effektes von *cas* unterstützt diese Theorie. Das im Kern zurückgehaltene *cas* mRNA könnte für eine Aufrechterhaltung der *cas*-Expression sorgen. Da die *cas*-Expression mit der Teilung der GMZ endet, besteht die Möglichkeit, dass der Transport von Cas in den Zellkern von Neuronen und Glia mit der Abschaltung der *cas*-Expression gekoppelt ist. Ob dies auf direktem oder indirektem Weg vonstattengeht, gilt es noch durch weitere Experimente zu klären.

5 ZUSAMMENFASSUNG/ABSTRACT

In dieser Arbeit wurden die Mechanismen der im Kern retenierten *cas* mRNA im embryonalen und larvalen Nervensystem von *Drosophila melanogaster* untersucht. Aus vorhergehenden Arbeiten konnte eine Involvierung der Introns und UTR's in die Kernrückhaltung weitestgehend ausgeschlossen werden und das mögliche Sequenzmotiv auf die kodierende Sequenz von *cas* eingengt werden. Durch In-frame-Deletionen innerhalb der CDS und die ektopische Expression der generierten *cas*-Deletionskonstrukte in der Epidermis von Stadium 11 Embryonen konnte das erste kb der kodierenden Sequenz von *cas* als notwendig zur Kernretention ermittelt werden. Da weitere gezielte In-frame-Deletionen zur Einengung des Retentionssignals nicht zum Erfolg führten, ist zu vermuten, dass entweder das gesamte 1kb große Fragment oder mehrere über diesen Bereich verteilte Sequenzen zur Kernrückhaltung notwendig sind. Erstere Theorie wurde anhand eines Fusionskonstrukts aus dem 1 kb der *cas*-CDS und nGFP getestet. Es zeigte sich, dass das erste kb von *cas* nicht ausreichend zur Kernrückhaltung von nGFP ist. Es ist daher zu vermuten, dass möglicherweise ein zweiter Sequenzabschnitt oder die Sekundärstruktur Einfluss auf die Funktionalität der Kernretention der *cas* mRNA hat. Der Einbau zufällig gewählter Spacersequenzen im mittleren Bereich des ersten kbs und die damit einhergehende vorzeitige Entlassung der *cas* mRNA aus dem Kern unterstützen diese Theorie.

Ein zweiter Ansatz zur Ermittlung der Retentionssequenz der *cas* mRNA, führte zur Isolation einer 58 Bp langen Sequenz, die für den Kernrückhalt der *cas* mRNA notwendig ist. Innerhalb dieser Sequenz befindet sich ein zweiteiliger Zipcode, der erstmals als notwendig zur Lokalisation von β -Aktin im Hühnchen ermittelt wurde und in *Drosophila* von dem RNA-Bindeprotein dImp erkannt wird. Die gezielte Deletion des Zipcodes führte zu einer vorzeitigen Entlassung der *cas* mRNA aus dem Zellkern. Auch der Austausch einzelner Basen innerhalb dieses Retentionssignals ohne die Veränderung der Aminosäuresequenz des Cas Proteins führte zu dem direkten Export der *cas* mRNA aus dem Zellkern und zeigt die Notwendigkeit dieses Sequenzmotivs für die Kernrückhaltung. Des Weiteren wurde der Einfluss möglicher RNA-Bindeproteine auf die Kernrückhaltung der *cas* mRNA untersucht. Aufgrund des bereits erwähnten Zipcodes wurde der mit dImp assoziierte *grk*-Lokalisationskomplex als eventuell Einfluss nehmender Faktor berücksichtigt. Hierunter befinden sich die Proteine Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein at 27C (Hrb27C, auch Hrp48), Squid (Sqd) und Syncrip (Syp). Diese drei RNA-Bindeproteine sind alle Mitglieder der hnRNP Familie und neben der Lokalisation von *grk*, auch in die Lokalisation von *osk* involviert und somit vielversprechende Kandidaten für die Kernrückhaltung der *cas* mRNA. Anhand von Antikörperfärbungen der einzelnen Komplexkomponenten konnte jedoch keine Kolokalisation der einzelnen Faktoren nachgewiesen werden.

In einem weiteren Ansatz wurde die Relevanz der Sekundärstruktur der *cas* mRNA auf die Kernrückhaltung untersucht. Eine sich in der Sequenz wiederholende Triplettabfolge, welche in der Sekundärstruktur der mRNA zu einer auffälligen Loop-Bildung führt, weist auf die Involvierung von Mbl hin. Mbl bindet die, in den betroffenen mRNAs entstehenden doppelsträngigen, Stem-loops und bildet intranukleare Cluster, welche unter anderem, Kennzeichnung der humanen Krankheit Myotoner Dystrophie (MD) sind. In dieser Arbeit konnte die Kolokalisation von Mbl und Cas nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigt sich

ein auffälliger *cas* mRNA-Phänotyp beim Knock-down von Mbl in der L3-Wanderlarve. Dies spricht für eine Rolle von Mbl in den Mechanismus der *cas* mRNA Kernrückhaltung.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Adams, J. M., Jeppesen, P. G., Sanger, F. und Barrell, B. G. (1969) 'Nucleotide sequence from the coat protein cistron of R17 bacteriophage RNA', *Nature* 223(5210):1009-14.

Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., Chen, L. X., Brandon, R. C., Rogers, Y. H., Blazej, R. G., Champe, M., Pfeiffer, B. D., Wan, K. H., Doyle, C., Baxter, E. G., Helt, G., Nelson, C. R., Gabor, G. L., Abril, J. F., Agbayani, A., An, H. J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R. M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E. M., Beeson, K. Y., Benos, P. V., Berman, B. P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M. R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K. C., Busam, D. A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J. M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L. B., Davies, P., de Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z., Mays, A. D., Dew, I., Dietz, S. M., Dodson, K., Doup, L. E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B. C., Dunn, P., Durbin, K. J., Evangelista, C. C., Ferraz, C., Ferriera, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A. E., Garg, N. S., Gelbart, W. M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J. H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N. L., Harvey, D., Heiman, T. J., Hernandez, J. R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K. A., Howland, T. J., Wie, M. H., Ibegwam, C., Jalali, M., Kalush, F., Karpen, G. H., Ke, Z., Kennison, J. A., Ketchum, K. A., Kimmel, B. E., Kodira, C. D., Kraft, C., Kravitz, S., Kulp, D., Lai, Z., Lasko, P., Lei, Y., Levitsky, A. A., Li, J., Li, Z., Liang, Y., Lin, X., Liu, X., Mattei, B., McIntosh, T. C., McLeod, M. P., McPherson, D., Merkulov, G., Milshina, N. V., Mobarry, C., Morris, J., Moshrefi, A., Mount, S. M., Moy, M., Murphy, B., Murphy, L., Muzny, D. M., Nelson, D. L., Nelson, D. R., Nelson, K. A., Nixon, K., Nusskern, D. R., Pacleb, J. M., Palazzolo, M., Pittman, G. S., Pan, S., Pollard, J., Puri, V., Reese, M. G., Reinert, K., Remington, K., Saunders, R. D., Scheeler, F., Shen, H., Shue, B. C., Sidén-Kiamos, I., Simpson, M., Skupski, M. P., Smith, T., Spier, E., Spradling, A. C., Stapleton, M., Strong, R., Sun, E., Svirskas, R., Tector, C., Turner, R., Venter, E., Wang, A. H., Wang, X., Wang, Z. Y., Wassarman, D. A., Weinstock, G. M., Weissenbach, J., Williams, S. M., Woodage, T., Worley, K. C., Wu, D., Yang, S., Yao, Q. A., Ye, J., Yeh, R. F., Zaveri, J. S., Zhan, M., Zhang, G., Zhao, Q., Zheng, L., Zheng, X. H., Zhong, F. N., Zhong, W., Zhou, X., Zhu, S., Zhu, X., Smith, H. O., Gibbs, R. A., Myers, E. W., Rubin, G. M. und Venter, J. C. (2000) 'The genome sequence of *Drosophila melanogaster*', *Science* 287(5461):2185-95.

- Adereth, Y., Dammai, V., Kose, N., Li, R. und Hsu, T.** (2005) 'RNA-dependent integrin $\alpha 3$ protein localization regulated by the Muscleblind-like protein MLP1', *Nat Cell Biol.* 7(12), pp. 1240–1247.
- Adolph, S. K., DeLotto, R., Nielsen, F. C. und Christiansen, J.** (2009) 'Embryonic expression of *Drosophila* IMP in the developing CNS and PNS', *Gene Expression Patterns* 9(3), pp. 138–143.
- Ainger, K., Avossa, D., Morgan, F., Hill, F., Barry, C., Barbarese, K. und Carson, J.** (1993) 'Transport and localization of Exogenous Myelin Basic Protein mRNA microinjected into oligodendrocytes', *The Journal of Cell Biology* 123(2), pp. 431–441.
- Akam, M.** (1987) 'The molecular basis for metameric pattern in the *Drosophila* embryo', *Development* 22, pp. 1–22.
- Almeida, M. S. und Bray, S. J.** (2005) 'Regulation of post-embryonic neuroblasts by *Drosophila* Grainyhead' *Mechanisms of Development* 122, 1282–1293.
- Amrein, H. und Axel, R.** (1997) 'Genes expressed in neurons of adult male *Drosophila*', *Cell* 88, pp. 459–469.
- Andersen, C. B., Ballut, L., Johansen, J. S., Chamieh, H., Nielsen, K. H., Oliveira, C. L., Pedersen, J. S., Seraphin, B., Le Hir, H. und Andersen, G. R.** (2006) 'Structure of the exon junction core complex with a trapped DEAD-box ATPase bound to RNA', *Science* 313(5795):1968–72.
- Artero, R., Prokop, A., Paricio, N., Begemann, G., Pueyo, I., Mlodzik, M., Perez-alonso, M. und Baylies, M. K.** (1998) 'The muscleblind gene participates in the organization of z-bands and epidermal attachments of *Drosophila* muscles and is regulated by Dmef2', *Developmental Biology* 143, pp. 131–143.
- Avery, O., MacLeod, C. und MacCarty, M.** (1943) 'Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types', *The Journal of experimental medicine* (6).
- Axmann, I. M., Kensche, P., Vogel, J., Kohl, S., Herzel, H. und Hess, W. R.** (2005) 'Identification of cyanobacterial non-coding RNAs by comparative genome analysis', *Genome Biology* 6(9).
- Bahar Halpern, K., Caspi, I., Lemze, D., Levy, M., Landen, S., Elinav, E., Ulitsky, I. und Itzkovitz, S.** (2015) 'Nuclear Retention of mRNA in Mammalian Tissues', *Cell Reports* 13, 2653–2662.
- Bashirullah, A., Cooperstock, R. L. und Lipshitz, H. D.** (1998) 'RNA localization in development.', *Annual review of biochemistry* 67, pp. 335–394.
- Bass, B. L.** (2002) 'RNA Editing by Adenosine Deaminases that act on RNA', *Annu Rev Biochem.* (1).
- Bastiani, M. J. und Goodman, C. S.** (1986) 'Guidance of neuronal growth cones in the Grasshopper. III Recognition of specific glial pathways', *The Journal of Neuroscience* 6, pp. 3542–3551.
- Bate, B. C. M.** (1976) 'Embryo genesis of an insect nervous system I. A map of the thoracic and abdominal neuroblasts in *Locusta migratoria*', *J. Embryo exp. Morph.*

35, pp. 107–123.

Bate, C. und Grunewald, E. B. (1981) 'Embryogenesis of an insect nervous system II: A second class of neuron precursor cells and the origin of the intersegmental connectives', *J. Embryo exp. Morph.* 61, pp. 317–330.

Bates, G. P., Mangiarini, L., Mahal, A. und Davies, S. W. (1997) 'Transgenic models of Huntington's disease', *Hum Mol Genet.* 6(10):1633-7.

Battich, N., Stöger, T. und Pelkmans, L. (2015) 'Control of transcript variability in single mammalian cells', *Cell* 163, 1596-1610.

Batzer, M. A. und Deininger, P. L. (2002) 'Alu repeats and human genomic diversity', *Nature Reviews Genetics* Vol 3, 370-379.

Bauer, V. (1904) 'Zur innern Metamorphose des Centralnervensystems der Insecten' Aus dem Zoologischen Institut zu Freiburg i. B. Published: Jena, G. Fischer.

Baumgardt, M., Karlsson, D., Terriente, J., Díaz-Benjumea, F. J. und Thor, S. (2009) 'Neuronal subtype specification within a lineage by opposing temporal feed-forward loops', *Cell* 139(5), pp. 969–982.

Begemann, G., Paricio, N., Artero, R., Kiss, I., Pérez-Alonso, M. und Mlodzik, M. (1997) 'muscleblind, a gene required for photoreceptor differentiation in *Drosophila*, encodes novel nuclear Cys3His-type zinc-finger-containing proteins.', *Development (Cambridge, England)* 124(21), pp. 4321–4331.

Bello, B. C., Izergina, N., Caussinus, E., und Reichert, H. (2008) 'Amplification of neural stem cell proliferation by intermediate progenitor cells in *Drosophila* brain development', *Neural Development* 2008, 3:5.

Berger, C., Urban, J. und Technau, G. M. (2001) 'Stage-specific inductive signals in the *Drosophila* neuroectoderm control the temporal sequence of neuroblast specification', *Development* 3251 pp. 3243–3251.

Berget, S. M. und Sharp, P. A. (1977) 'A spliced sequence at the 5'-terminus of adenovirus late mRNA', *Brookhaven Symp Biol.* (29):332-44.

Besse, F. und Ephrussi, A. (2008) 'Translational control of localized mRNAs: restricting protein synthesis in space and time', *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9(12):971-80.

Bhat, K. M. (1996) 'The patched signaling pathway mediates repression of gooseberry allowing neuroblast specification by wingless during *Drosophila* neurogenesis', *Development* 2932, pp. 2921–2932.

Bhat, K. M. und Schedl, P. (1994) 'The *Drosophila* miti-mere gene, a member of the POU family, is required for the specification of the RP2 / sibling lineage during neurogenesis', *Developmental Dynamics* 1501, pp. 1483–1501.

Bhat, K. M. (1999) 'Segment polarity genes in neuroblast formation and identity specification during *Drosophila* neurogenesis', *Bioessays* 21(6):472-85.

Birkholz, O., Rickert, C., Berger, C., Urbach, R. und Technau, G. M. (2013) 'Neuroblast pattern and identity in the *Drosophila* tail region and role of doublesex in the survival of sex-specific precursors', *Development* 140, pp. 1830–1842.

- Bischof, J., Maeda, R. K., Hediger, M. und Basler, K.** (2007) 'An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific C31 integrases', PNAS 104, 9.
- Björk, P. und Wieslander, L.** (2011) 'Nucleocytoplasmic mRNP export is an integral part of mRNP biogenesis', Chromosoma 120, pp. 23–38.
- Boehm, V. und Gehring, N. H.** (2016) 'Exon Junction Complexes: supervising the gene expression assembly line', Trends Genet. 32(11)724-735.
- Bono, F., Ebert, J., Lorentzen, E. und Conti, E.** (2006) 'The crystal structure of the Exon Junction Complex reveals how it maintains a stable grip on mRNA', Cell 126, pp. 713–725.
- Boothby, T. C. und Wolniak, S. M.** (2011) 'Masked mRNA is stored with aggregated nuclear speckles and its asymmetric redistribution requires a homolog of mago nashi', BMC Cell Biology 12(1), p. 45.
- Van De Bor, V. und Davis, I.** (2004) 'mRNA localisation gets more complex', Curr Opin Cell Biol. 16(3):300-7.
- Van De Bor, V., Hartswood, E., Jones, C., Finnegan, D. und Davis, I.** (2005) 'gurken and the I factor retrotransposon RNAs share common localization signals and machinery', Developmental Cell 9(1), pp. 51–62.
- Bossing, T., Udolph, G., Doe, C. Q. und Technau, G. M.** (1996) 'The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. I. Neuroblast lineages derived from the ventral half of the neuroectoderm.', Developmental biology 179(1), pp. 41–64.
- Boswell, R. E., Prout, M. E. und Steichen, J. C.** (1991) 'Mutations in a newly identified *Drosophila melanogaster* gene, mago nashi, disrupt germ cell formation and result in the formation of mirror-image symmetrical double abdomen embryos', Development 384, pp. 373–384.
- Boudoukha, S., Cuvellier, S. und Polesskaya, A.** (2010) 'Role of the RNA-binding protein IMP-2 in muscle cell motility', MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY 30(24), pp. 5710–5725.
- Bownes, B. M.** (1975) 'A photographic study of development in the living embryo of *Drosophila melanogaster*', J. Embryol. exp. Mor. 33, pp. 789–801.
- Boylan, K. L. M., Mische, S., Li, M., Marqués, G., Morin, X., Chia, W. und Hays, T. S.** (2008) 'Motility screen identifies *Drosophila* IGF-II mRNA-binding protein - Zipcode-binding protein acting in oogenesis and synaptogenesis', PLoS Genetics 4(2).
- Brand, A. H. und Perrimon, N.** (1993) 'Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes', Development 415, pp. 401–415.
- Brendza, R. P., Serbus, L. R., Duffy, J. B. und Saxton, W. M.** (2000) 'A function for Kinesin I in the posterior transport of oskar mRNA and Stauf protein', Science 289(5487), pp. 2120–2122.
- Broadus, J., Skeath, J. B., Spana, E. P., Bossing, T., Technau, G. und Doe, C. Q.** (1995) 'New neuroblast markers and the origin of the aCC/pCC neurons in the',

Mechanisms of Development 53, pp. 393–402.

Brody, T. und Odenwald, W. F. (2000) 'Programmed transformations in Neuroblast gene expression during *Drosophila* CNS lineage development', *Developmental Biology* 44, pp. 34–44.

Brody, T. und Odenwald, W. F. (2002) 'Cellular diversity in the developing nervous system : a temporal view from *Drosophila*', *Development* 3770, pp. 3763–3770.

Buckanovich, R. J. und Darnell, R. B. (1997) 'The neuronal RNA binding protein Nova-1 recognizes specific RNA targets in vitro and in vivo', *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* 17(6), pp. 3194–3201.

Bullock, S. L. (2011) 'Messengers , motors and mysteries : sorting of eukaryotic mRNAs by cytoskeletal transport', *Biochem Soc Trans.* 39, pp. 1161–1165.

Bullock, S. L. und Ish-Horowicz, D. (2001) 'Conserved signals and machinery for RNA transport in *Drosophila* oogenesis and embryogenesis', *Nature* 414(6864): 611-6.

Cabrera, C. V. (1990) 'Lateral inhibition and cell fate during neurogenesis in *Drosophila* : the interactions between scute, Notch and Delta', *Development* 109, pp. 733–742.

Cabrera, C. V., Martinez-Arias, A. und Bate, M. (1987) 'The expression of three members of the achaete-scute gene complex correlates with neuroblast segregation in *Drosophila*', *Cell* 50(3):425-33.

Cáceres, L. und Nilson, L. A. (2005) 'Production of gurken in the nurse cells is sufficient for axis determination in the *Drosophila* oocyte', *Development* 132. pp. 2345–2353.

Campos-Ortega, J. A. (1993) 'Mechanisms of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*', *J Neurobiol.* 24(10):1305-27.

Campos-Ortega, J. A. und Hartenstein, V. (1985) 'Fate-mapping in wild-type *Drosophila melanogaster*. I. The spatio-temporal pattern of embryonic cell divisions', *Wilhelm Roux's archives of developmental biology* Vol. 194(4), pp. 181-195.

Campos-Ortega, J. A. und Hartenstein, V. (1997) 'The Embryonic Development of *Drosophila melanogaster*'.

Capco, D. G. und Jeffery, W. R. (1978) 'Differential distribution of poly(A)-containing RNA in the embryonic cells of *Oncopeltus fasciatus*. Analysis by in situ hybridization with a [3H]poly(U) probe', *Dev Biol.* 67(1):137-51.

Carter, K. C., Bowman, D., Carrington, W., Fogarty, K., McNeil, J. A., Fay, F. S. und Lawrence, J. B. (1993) 'A three-dimensional view of precursor messenger RNA metabolism within the mammalian nucleus', *Science.* 259(5099):1330-5.

Carter, K. C., Taneja, K. L. und Lawrence, J. B. (1991) 'Discrete nuclear domains of Poly(A) RNA and their relationship to the functional organization of the nucleus', *The Journal of Cell Biology* 115(5).

Chang, D. D. und Sharp, P. A. (1989) 'Regulation by HIV Rev depends upon recognition of splice sites', *Cell* 59(5):789-95.

- Chao, J. A., Patskovsky, Y., Patel, V., Levy, M., Almo, S. C. und Singer, R. H.** (2010) 'ZBP-1 recognition of β -actin Zipcode induces RNA looping', *Genes and Development* 24(2), pp. 148–158.
- Chartrand, P., Meng, X., Singer, R. H. und Long, R. M.** (1999) 'Structural elements required for the localization of ASH1 mRNA and of a green fluorescent protein reporter particle in vivo', *Current Biology* 9:333–336.
- Chen, L.-L. und Carmichael, G. G.** (2008) 'Gene regulation by SINES and inosines: biological consequences of A-to-I editing of Alu element inverted repeats', *Cell Cycle* 7:21, pp. 3294-3301.
- Cheng, H., Dufu, K., Lee, C., Hsu, J. L., Dias, A. und Reed, R.** (2006) 'Human mRNA export machinery recruited to the 5' End of mRNA', *Cell* 127, pp. 1389–1400.
- Chow, L. T., Gelinis, R. E., Broker, T. R. und Roberts, R. J.** (1977) 'An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA', *Cell* 12(1):1-8.
- Christine, K. S. und Conlon, F. L.** (2008) 'Vertebrate CASTOR is required for differentiation of cardiac precursor cells at the ventral midline', *Dev Cell* 14(4), pp. 616–623.
- Chu, C., Zhang, Q. C., da Rocha, S. T., Flynn, R. A., Bharadwaj, M., Calabrese, J. M., Magnuson T., Heard, E. und Chang, H. Y.** (2015) 'Systematic discovery of Xist RNA binding proteins', *Cell* 161(2): 404-416.
- Chu, H., Parras, C., White, K. und Jime, F.** (1998) 'Formation and specification of ventral neuroblasts is controlled by vnd in *Drosophila* neurogenesis', *GENES & DEVELOPMENT* 12, pp. 3613–3624.
- Chu-LaGraff, Q. und Doe, C. Q.** (1993) 'Neuroblast specification and formation regulated by wingless in the *Drosophila* CNS', *Science* 261(5128):1594-7.
- Chu-LaGraff, Q., Wright, D. M., McNeil, L. K. und Doe, C. Q.** (1991) 'The prospero gene encodes a divergent homeodomain protein that controls neuronal identity in *Drosophila*', *Dev Suppl.* 2:79-85.
- Cilley, C. D. und Williamson, J. R.** (2003) 'Structural mimicry in the phage 21 N peptide – boxB RNA complex', *RNA* 9, pp. 663–676.
- Cohen, R. S., Zhang, S. U. I. und Dollar, G. L.** (2005) 'The positional , structural , and sequence requirements of the *Drosophila* TLS RNA localization element', *RNA* 11, pp. 1017–1029.
- Croft, L., Schandorff, S., Clark, F., Burrage, K., Arctander, P. und Mattick, J. S.** (2000) 'ISIS, the intron information system, reveals the high frequency of alternative splicing in the human genome', *Nat Genet.* 24(4):340-1.
- Cubas, P., de Celis, J.-F., Campuzano, S. und Modolell, J.** (1991) 'Proneural clusters of achaete-scute expression and the generation of sensory organs in the *Drosophila* imaginal wing disc', *G E N E S & D E V E L O P M E N T* 5, pp. 996–1008.
- Cugusi, S., Li, Y., Jin, P. und Lucchesi, J. C.** (2016) 'The *Drosophila* helicase MLE targets hairpin structures in genomic transcripts', *PLOS Genetics* 12, pp. 1–19.
- Cui, X. und Doe, C. Q.** (1992) '*ming* is expressed in neuroblast sublineages and regulates gene expression in the *Drosophila* central nervous system.', *Development*

(Cambridge, England) 116(4), pp. 943–952.

Czaplinski, K. und Singer, R. H. (2006) 'Pathways for mRNA localization in the cytoplasm', *Trends Biochem Sci.* 31(12):687-93.

D'Alessio, M. und Frasch, M. (1996) '*msh* may play a conserved role in dorsoventral patterning of the neuroectoderm and mesoderm', *Mech Dev.* 58(1-2):217-31.

Dar, R. D., Razooky, B. S., Singh, A., Trimeloni, T. V., McCollum, J. M., Cox, C. D., Simpson, M. L. und Weinberger, L. S. (2012) 'Transcriptional burst frequency and burst size are equally modulated across the human genome', *Proc Natl Acad Sci.* 109(43):17454-9.

Darwin, C., (1859) 'On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life', John Murray, London.

Darzacq, X., Shav-Tal, Y., de Turrís, V., Brody, Y., Shenoy, S. M., Phair, R. D. und Singer, R. H. (2007) 'In vivo dynamics of RNA polymerase II transcription', *Nat Struct Mol Biol.* 14(9):796-806.

Davis, B. M., McCurrach, M. E., Taneja, K. L., Singer, R. H. und Housman, D. E. (1997) 'Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(14), pp. 7388–7393.

Deeb, F., Weele, Van Der, C.M. und Wolniak, S. M. (2010) 'Spermidine is a morphogenetic determinant for cell fate specification in the male gametophyte of the water fern *Marsilea vestita*', *The Plant Cell* 22, pp. 3678–3691.

Degot, S., Le Hir, H., Alpy, F., Kedinger, V., Stoll, I., Wendling, C., Seraphin, B., Rio, M. und Tomasetto, C. (2004) 'Association of the breast cancer protein MLN51 with the Exon Junction Complex via its speckle localizer and RNA binding module', *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 279(32), pp. 33702–33715.

Dejgaard, K. und Leffers, H. (1996) 'Characterisation of the nucleic-acid-binding activity of KH domains different properties of different domains', *Eur. J. Biochem.* 241, pp. 425–431.

Delanoue, R., Herpers, B., Soetaert, J., Davis, I. und Rabouille, C. (2007) '*Drosophila* Squid/hnRNP helps dynein switch from a gurken mRNA Transport motor to an ultrastructural static anchor in sponge bodies', *Developmental Cell* 13(4), pp. 523–538.

Dennis, P. P. und Omer, A. (2005) 'Small non-coding RNAs in Archaea', *Curr Opin Microbiol.* 8(6):685-94.

Dere, R., Napierala, M., Ranum, L. P. W. und Wells, R. D. (2004) 'Hairpin structure-forming propensity of the (CCTG.CAGG) tetranucleotide repeats contributes to the genetic instability associated with Myotonic Dystrophy Type 2', *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 279(40), pp. 41715–41726.

Deshler, J. O., Highett, M. I., Abramson, T. und Schnapp, B. J. (1998) 'A highly conserved RNA-binding protein for cytoplasmic mRNA localization in vertebrates', *Current Biology* 8, pp. 489–496.

- Deshler, J. O., Highett, M. I. und Schnapp, B. J.** (1997) 'Localization of *Xenopus* Vg1 mRNA by Vera protein and the endoplasmic reticulum', *Science* 276(5315): 1128-31.
- Dimaano, C. und Ullman, K. S.** (2004) 'Nucleocytoplasmic transport : Integrating mRNA production and turnover with export through the nuclear pore', *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* 24(8), pp. 3069–3076.
- Dimitrova, N., Zamudio, J. R., Jong, R. M., Soukup, D., Resnik, R., Sarma, K., Ward, A. J., Raj, A., Lee, J., Sharp, P. A. und Jacks, T.** (2014) 'LincRNA-p21 activates p21 in cis to promote Polycomb target gene expression and to enforce the G1/S checkpoint', *Mol Cell*. 54(5): 777–790.
- Ding, D. und Lipshitz, H.D.** (1993) 'A molecular screen for polar-localised maternal RNAs in the early embryo of *Drosophila*', *Zygote* 1(3):257-71.
- Ding, D. und Lipshitz, H. D.** (1993) 'Localized RNAs and their functions', *Bioessays* 15(10):651-8.
- Ding, D., Parkhurst, S. M., Halsell, S. R. und Lipshitz, H. D.** (1993) 'Dynamic Hsp83 RNA localization during *Drosophila* oogenesis and embryogenesis.', *Molecular and cellular biology* 13(6), pp. 3773–3781.
- Dirks, R. M., Lin, M., Winfree, E. und Pierce, N. A.** (2004) 'Paradigms for computational nucleic acid design', *Nucleic Acids Research* 32(4), pp. 1392–1403.
- Dixon, M. T. und Hillis, D. M.** (1993) 'Ribosomal RNA secondary structure : compensatory mutations and implications for phylogenetic analysis ', *Mol. Bid. Evol.* 10(1), pp. 256–267.
- Do, C. B., Woods, D. A. und Batzoglou, S.** (2006) 'CONTRAFold : RNA secondary structure prediction without physics-based models', *Bioinformatics* 22(14), pp. 90–98.
- Doe, C. Q.** (1992) 'Molecular markers for identified neuroblasts and ganglion mother cells in the *Drosophila* central nervous system', *Development* 116, pp. 855–863.
- Doe, C. Q., Chu-LaGraff, Q., Wright, D. M. und Scott, M. P.** (1991) 'The prospero gene specifies cell fates in the *Drosophila* central nervous system', *Cell*. 65(3): 451-64.
- Doe, C. Q. und Goodman, C. S.** (1985) 'Early events in insect neurogenesis. I. Development and segmental differences in the pattern of neuronal precursor cells', *Dev Biol.* 111(1):193-205.
- Dostie, J. und Dreyfuss, G.** (2002) 'Translation is required to remove Y14 from mRNAs in the cytoplasm', *Current Biology* 12(2), pp. 1060–1067.
- Doyle, G. A. R., Betz, N. A., Leeds, P. F., Fleisig, A. J., Prokipcak, R. D. und Ross, J.** (1998) 'The c-myc coding region determinant-binding protein : a member of a family of KH domain RNA-binding proteins', *Nucleic Acid Research* 26(22), pp. 5036–5044.
- Eberl, D. F., Lorenz, L. J., Melnick, M. B., Sood, V., Lasko, P. und Perrimon, N.** (1997) 'A New Enhancer of Position-Effect Variegation', *Genetics* 146: 951-963.
- Eckner, R., Elimeier, W. und Birnstiel, M. L.** (1991) 'Mature mRNA 3' end

formation stimulates RNA from the nucleus export', *The EMBO Journal* 10(1), pp. 3513–3522.

Eeden, F. J. M. Van, Palacios, I. M., Petronczki, M., Weston, M. J. D. und Johnston, D. S. (2001) 'Barentsz is essential for the posterior localization of oskar mRNA and colocalizes with it to the posterior pole', *The Journal of Cell Biology* 154, pp. 511–523.

Eldar, A. und Elowitz, M. B. (2010) 'Functional roles for noise in genetic circuits', *Nature* 467(7312):167-73.

Van Den Ent, F. und Löwe, J. (2006) 'RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes into plasmids', *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 67(1), pp. 67–74.

Eom, T., Antar, L. N., Singer, R. H. und Bassell, G. J. (2003) 'Localization of a β -Actin messenger ribonucleoprotein complex with zipcode-binding protein modulates the density of dendritic filopodia and filopodial synapses', *The Journal of Neuroscience* 23(32), pp. 10433–10444.

Ephrussi, A., Dickinson, L. K. und Lehmann, R. (1991) 'Oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos', *Cell* 66(1):37-50.

Erdmann, V., Wolters, J., Huysmans, E. und De Wachter, R. (1984) 'Collection of published 5S, 5.8S and 4.5S ribosomal RNA sequences', *Nucleic Acids Research* 13, 105-153

Fabrizio, J. J., Hickey, C. A., Stabrawa, C., Meytes, V., Hutter, J. A., Talbert, C. und Regis, N. (2008) 'Imp (IGF-II mRNA-binding protein) is expressed during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*', *Fly* 2(1), pp. 47–52.

Fahrenkrog, B. und Aebi, U. (2003) 'The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond', *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(10):757-66.

Fardaei, M., Rogers, M. T., Thorpe, H. M., Larkin, K., Hamshere, M. G., Harper, P. S. und Brook, J. D. (2002) 'Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells', *Hum Mol Genet.* 11(7):805-14.

Farina, K. L., Hüttelmaier, S., Musunuru, K., Darnell, R. und Singer, R. H. (2003) 'Two ZBP-1 KH domains facilitate β -actin mRNA localization, granule formation, and cytoskeletal attachment', *Journal of Cell Biology* 160(1), pp. 77–87.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M., Kostas, S., Driver, S. und Mello, C. (1998) 'Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*', *Nature* 391, pp. 806–811.

Fischer, K. (2009) 'Analysen zur nukleären Lokalisation der *castor*-mRNA im zentralen Nervensystem von *Drosophila melanogaster*'.

Fleckner, J., Zhang, M., Valcarcel, J. und Green, M. R. (1997) 'U2AF 6s recruits a novel human DEAD box protein required for the U2 snRNP-branchpoint interaction', *GENES & DEVELOPMENT* 11, pp. 1864–1872.

Forrest, K. M. und Gavis, E. R. (2003) 'Live Imaging of Endogenous RNA Reveals a Diffusion and Entrapment Mechanism for nanos mRNA Localization in *Drosophila*', *Current Biology*, Vol. 13, 1159–1168.

- Franke, A. und Baker, B. S.** (1999) 'The rox1 and rox2 RNAs are essential components of the compensasome, which mediates dosage compensation in *Drosophila*', *Molecular Cell* 4, pp. 117–122.
- Fried, H. und Kutay, U.** (2003) 'Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory', *Cell Mol Life Sci.* 60(8):1659-88.
- Frigerio, G., Burri, M., Bopp, D., Baumgartner, S. und Noll, M.** (1986) 'Structure of the segmentation gene paired and the *Drosophila* PRD gene set as part of a gene network.', *Cell* 47(5), pp. 735–746.
- Frith, M. C., Pheasant, M. und Mattick, J. S.** (2005) 'The amazing complexity of the human transcriptome', *European Journal of Human Genetics* 13, pp. 894–897.
- Fu, X.** (1995) 'The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors', *RNA* 1, pp. 663–680.
- Fuerstenberg, S. A. L., Broadus, J. und Doe, C. Q.** (1998) 'Asymmetry and cell fate in the *Drosophila* embryonic CNS', *Int. J. Dev. Biol.* 383, pp. 379–383.
- Gagnon, J. A. und Mowry, K. L.** (2012) 'Molecular motors : directing traffic during RNA localization', *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 46(3), pp. 229–239.
- Galvao, R., Mendes-Soares, L., Camara, J., Jaco, I. und Carmo-Fonseca, M.** (2001) 'Triplet repeats, RNA secondary structure and toxic gain-of-function models for pathogenesis', *Brain Res Bull.* 56(3-4):191-201.
- Gatfield, D., Le Hir, H., Schmitt, C., Braun, I. C., Wilm, M., Izaurralde, E. und Ko, T.** (2001) 'The DExH / D box protein HEL / UAP56 is essential for mRNA nuclear export in *Drosophila*', *Current Biology* 11, pp. 1716–1721.
- Gaul, U., Seifert, E., Schuh, R. und Jäckle, H.** (1987) 'Analysis of Krüppel protein distribution during early *Drosophila* development reveals posttranscriptional regulation', *Cell* 50(4):639-47.
- Gavis, E. R., Lunsford, L., Bergsten, S. E. und Lehmann, R.** (1996) 'A conserved 90 nucleotide element mediates translational repression of *nanos* RNA', *Development* 122, pp. 2791–2800.
- Gehring, N. H., Lamprinaki, S., Hentze, M. W. und Kulozik, A. E.** (2009) 'The hierarchy of Exon-Junction Complex assembly by the spliceosome explains key features of mammalian nonsense-mediated mRNA decay', *PLOS Biology* 7(5).
- Geng, C. und Macdonald, P. M.** (2006) 'Imp associates with squid and Hrp48 and contributes to localized expression of *gurken* in the oocyte.', *Molecular and cellular biology* 26(24), pp. 9508–9516.
- Ghosh, S., Marchand, V., Gaspar, I. und Ephrussi, A.** (2012) 'Control of RNP motility and localization by a splicing-dependent structure in *oskar* mRNA', *Nat Struct Mol Biol.* 19(4):441-9.
- Ghysen, A. und Dambly-Chaudiere, C.** (1989) 'Genesis of the *Drosophila* peripheral nervous system', *Trends Genet* 5(8):251-5.
- Gingras, A. C., Raught, B. und Sonenberg, N.** (1999) 'eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation', *Annu Rev Biochem.* 68:913-63.
- Git, A. und Standart, N.** (2002) 'The KH domains of *Xenopus* Vg1RBP mediate RNA

binding and self-association', RNA 8, pp. 1319–1333.

Glisovic, T., Bachorik, J. L., Yong, J. und Dreyfuss, G. (2008) 'RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation', FEBS Lett 582(14), pp. 1977–1986.

Glotzer, J. B., Saffrich, R., Glotzer, M. und Ephrussi, A. (1997) 'Cytoplasmic flows localize injected *oskar* RNA in *Drosophila* oocytes', Current Biology 7(5), pp. 326–337.

Gonzalez, I., Buonomo, S. B. C., Nasmyth, K., Ahsen, U. Von und The, M. (1999) 'ASH1 mRNA localization in yeast involves multiple secondary structural elements and Ash1 protein translation', Current Biology 9(6), pp. 337–340.

Gonzalez, J. und Petrov, D. A. (2009) 'The adaptive role of transposable elements in the *Drosophila* genome', Gene 448(2): 124–133.

Gonzalez-Reyes, A. und St Johnston, D. (1994) 'Role of oocyte position in establishment of anterior-posterior polarity in *Drosophila*', Science 266(5185):639-42.

Gonzalez-Reyes, A., Elliott, H. und St Johnston, D. (1995) 'Polarization of both major body axes in *Drosophila* by gurken-torpedo signalling', Nature 375(6533):654-8.

Goodman, C. S., Bastiani, M. J., Doe, C. Q., du Lac, S., Helfand, S. L., Kuwada, J. Y. und Thomas, J. B. (1984) 'Cell recognition during neuronal development', Science 225(4668):1271-9.

Goodrich, J. S., Clouse, K. N. und Schüpbach, T. (2004) 'Hrb27C, Sqd and Otu cooperatively regulate *gurken* RNA localization and mediate nurse cell chromosome dispersion in *Drosophila* oogenesis.', Development (Cambridge, England) 131(9), pp. 1949–1958.

Graveley, B. R. (2001) 'Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world', Trends Genet 17(2):100-7.

Graveley, B. R., Brooks, A. N., Carlson, J. W., Duff, M. O., Landolin, J. M., Yang, L., Artieri, C. G., Baren, M. J. Van, Boley, N., Booth, B. W., Brown, J. B., Cherbas, L., Davis, C. A., Li, R., Lin, W., Malone, J. H., Mattiuzzo, N. R., Dudoit, S., Eads, B., Green, R. E., Hammonds, A., Kaufman, T. C., Oliver, B. und Celniker, S. E. (2011) 'The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster*', Nature 471(7339), pp. 473–479.

Grosskortenhaus, R., Pearson, B. J., Marusich, A. und Doe, C. Q. (2005) 'Regulation of temporal identity transitions in *Drosophila* neuroblasts', Developmental Cell 8(2), pp. 193–202.

Grosskortenhaus, R., Robinson, K. J. und Doe, C. Q. (2006) 'Pdm and Castor specify late-born motor neuron identity in the NB7-1 lineage', Genes and Development 20(18), pp. 2618–2627.

Groth, A. C., Fish, M., Nusse, R. und Calos, M. P. (2004) 'Construction of transgenic *Drosophila* by using the site-specific Integrase', Genetics 166, pp. 1775–1782.

Gruber, A. R., Lorenz, R., Bernhart, S. H. und Neubo, R. (2008) 'The Vienna RNA Websuite' 36, pp. 70–74.

- Grüter, P., Taberner, C., Kobbe, C. Von, Schmitt, C., Saavedra, C., Bachi, A., Wilm, M., Felber, B. K. und Izaurralde, E.** (1998) 'TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus', *Molecular Cell* 1, pp. 649–659.
- Haasnoot, J., Westerhout, E. M. und Berkhout, B.** (2007) 'RNA interference against viruses: strike and counterstrike', *NATURE BIOTECHNOLOGY* 25(12).
- Hachet, O. und Ephrussi, A.** (2001) 'Drosophila Y14 shuttles to the posterior of the oocyte and is required for *oskar* mRNA transport', *Current Biology* 11, pp. 1666–1674.
- Hachet, O. und Ephrussi, A.** (2004) 'Splicing of *oskar* RNA in the nucleus is coupled to its cytoplasmic localization Olivier', *Nature* 428(6986), pp. 950–955.
- Hall, L. L., Smith, K. P., Meg, B. und Lawrence, J. B.** (2006) 'The molecular anatomy of a speckle', *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 288(7), pp. 664–675.
- Hamada, M., Kiryu, H., Sato, K., Mituyama, T. und Asai, K.** (2009) 'Prediction of RNA secondary structure using generalized centroid estimators', *Bioinformatics* 25(4), pp. 465–473.
- Hamilton, A. J. und Baulcombe, D. C.** (1999) 'A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants', *Science* 286(5441):950-2.
- Hamilton, R. S. und Davis, I.** (2011) 'Europe PMC Funders Group Europe PMC Funders Author Manuscripts RNA localization signals: deciphering the message with bioinformatics', *Semin Cell Dev Biol.* 18(2), pp. 178–185.
- Hamm, J. und Mattaj, I. W.** (1990) 'Monomethylated cap structures facilitate RNA export from the nucleus', *Cell* 63(1):109-18.
- Harris, W.** (2001) 'Temporal Coordinates: The Genes that Fix Cell Fate with Birth Order', *Developmental Cell* 1(3), pp. 2000–2001.
- Hartenstein, V. und Campos-Ortega, J. A.** (1984) 'Early neurogenesis in wild-type *Drosophila melanogaster*.', *Roux's Archives of Developmental Biology* 193(5), pp. 308–325.
- Hartenstein, V., Rudloff, E. und Campos-Ortega, J. A.** (1987) 'The pattern of proliferation of the neuroblasts in the wild-type embryo of *Drosophila melanogaster*', *Roux Arch Dev Biol.* 196(8):473-485.
- Häsler, J. und Strub, K.** (2006) 'Alu elements as regulators of gene expression', *Nucleic Acids Research* 34(19), 5491–5497.
- Havin, L., Git, A., Elisha, Z., Oberman, F., Yaniv, K., Schwartz, S. P., Standart, N. und Yisraeli, J. K.** (1998) 'RNA-binding protein conserved in both microtubule- and microfilament- based RNA localization', *Genes and Development* 12(11), pp. 1593–1598.
- Herman, R. C., Williams, J. G. und Penman, S.** (1976) 'Message and non-message sequences adjacent to poly(A) in steady state heterogeneous nuclear RNA of HeLa cells', *Cell* 7(3):429-37.
- Herold, N., Will, C. L., Wolf, E., Kastner, B., Urlaub, H. und Lu, R.** (2009) 'Conservation of the protein composition and electron microscopy structure of *Drosophila melanogaster* and human spliceosomal complexes', *MOLECULAR AND*

CELLULAR BIOLOGY 29(1), pp. 281–301.

Hershey, A. und Chase, M. (1952) 'Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage', *The Journal of General Physiology* 36(1), pp. 39–56.

Le Hir, L., Izaurralde, E., Maquat, L. E. und Moore, M. J. (2000) 'The spliceosome deposits multiple proteins 20 ± 24 nucleotides upstream of mRNA exon \pm exon junctions', *The EMBO Journal* 19(24), 6860–6869.

Hirata, J., Nakagoshi, H., Nabeshima, Y. und Matsuzaki, F. (1995) 'Asymmetric segregation of the homeodomain protein Prospero during *Drosophila* development', *Nature*. 377(6550):627–30.

Hitier, R., Chaminade, M. und Pr at, T. (2001) 'The *Drosophila castor* gene is involved in postembryonic brain development', *Mechanisms of Development* 103(1–2), pp. 3–11.

Ho, T. H., Charlet-b, N., Michael, G., Singh, G., Maurice, S. und Cooper, T. A. (2004) 'Muscleblind proteins regulate alternative splicing', *The EMBO Journal* 23(15), pp. 3103–3112.

Ho, T. H., Savkur, R. S., Poulos, M. G., Mancini, M. a, Swanson, M. S. und Cooper, T. A. (2005) 'Colocalization of muscleblind with RNA foci is separable from misregulation of alternative splicing in myotonic dystrophy.', *Journal of cell science* 118(Pt 13), pp. 2923–2933.

Holt, C. E. und Bullock, S. L. (2009) 'Subcellular mRNA localization in animal cells and why it matters.', *Science (New York, N.Y.)* 326(5957), pp. 1212–1216.

Homberg, M. (2011) 'Kartierung kernexportinhibierender Sequenzen der castor mRNA von *Drosophila melanogaster*'.

Hosoya, T., Takizawa, K. und Nitta, K. (1995) 'Glial cells missing : A binary switch between neuronal and glial determination in *Drosophila*', *Cell* 82, pp. 1025–1036.

Houseley, J. M., Wang, Z., Brock, G. J. R., Soloway, J., Artero, R., Perez-Alonso, M., O'Dell, K. M. C. und Monckton, D. G. (2005) 'Myotonic dystrophy associated expanded CUG repeat muscleblind positive ribonuclear foci are not toxic to *Drosophila*', *Human Molecular Genetics* 14(6), pp. 873–883.

Huang, S., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H. und Spector, D. L. (1994) 'In vivo analysis of the stability and transport of nuclear Poly(A) + RNA', *Current Biology* 126.

Huang, S. und Spector, D. L. (1991) 'Nascent pre-mRNA transcripts are . associated with nuclear regions enriched in splicing factors', Cold Spring Harbor Laboratory Press pp. 2288–2302.

Huang, Y. und Carmichael, G. G. (1996) 'Role of polyadenylation in nucleocytoplasmic transport of mRNA', *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* 16(4), pp. 1534–1542.

Hutchinson, J. N., Ensminger, A. W., Clemson, C. M., Lynch, C. R., Lawrence, J. B. und Chess, A. (2007) 'A screen for nuclear transcripts identifies two linked noncoding RNAs associated with SC35 splicing domains', *BMC Genomics* 8:39, pp. 1–16.

- Huynh, J.-R., Munro, T. P., Smith-Litiere, K., Lepesant, J.-A. und St Johnston, D.** (2004) 'The *Drosophila* hnRNPA / B homolog, Hrp48, is specifically required for a distinct step in *osk* mRNA localization', *Developmental Cell* 6, pp. 625–635.
- Iampietro, C., Bergalet, J., Wang, X., Cody, N. L., Chin, A., Lefebvre, F., Douziech, M., Krause, H. und Lécuycy, E.** (2014) 'Developmentally regulated elimination of damaged nuclei involves a Chk2-dependent mechanism of mRNA nuclear retention', *Developmental Cell* 29(4), pp. 468–481.
- Ideue, T., Sasaki, Y. T. F., Hagiwara, M. und Hirose, T.** (2007) 'Introns play an essential role in splicing-dependent formation of the exon junction complex', *GENES & DEVELOPMENT* 21, pp. 1993–1998.
- Irion, U. und Leptin, M.** (1999) 'Developmental and cell biological functions of the *Drosophila* DEAD-box protein Abstrakt', *Current Biology* 9, pp. 1373–1381.
- Isshiki, T., Pearson, B., Holbrook, S. und Doe, C. Q.** (2001) 'Transcription factors which specify the temporal identity of their neuronal progeny', *Cell* 106, pp. 511–521.
- Isshiki, T., Takeichi, M. und Nose, A.** (1997) 'The role of the *msh* homeobox gene during *Drosophila* neurogenesis: implication for the dorsoventral specification of the neuroectoderm', *Development* 124, pp. 3099–3109.
- Ito, K., Urban, J. und Technau, G. M.** (1995) 'Distribution, classification, and development of *Drosophila* glial cells in the late embryonic and early larval ventral nerve cord', *Roux Arch Dev Biol.* 204(5):284-307.
- Izaurralde, E. und Mattaj, I. W.** (1995) 'RNA export', *Cell* 81(2):153-9.
- Jagatheesan, G., Thanumalayan, S., Muralikrishna, B., Rangaraj, N. und Karande, A. A.** (1999) 'Colocalization of intranuclear lamin foci with RNA splicing factors', *Journal of Cell Science* 112, pp. 4651–4661.
- Jambhekar, A. und Derisi, J. L.** (2007) 'Cis-acting determinants of asymmetric, cytoplasmic RNA transport', *RNA* 13, pp. 625–642.
- Jambor, H., Brunel, C. und Ephrussi, A.** (2011) 'Dimerization of *oskar* 3' UTRs promotes hitchhiking for RNA localization in the *Drosophila* oocyte', *RNA* 17(12), pp. 2049–2057.
- Jansen, R. P.** (2001) 'mRNA localization: message on the move', *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2(4):247-56.
- Jarmolowski, A., Boelens, W. C., Izaurralde, E. und Mattaj, I.** (1994) 'Nuclear export of different classes of RNA is mediated by specific factors preparation of RNA for injection quantitation of export data', *The Journal of Cell Biology* 124(5), pp. 627–635.
- Jeffery, W. R. und Capco, D. G.** (1978) 'Differential accumulation and localization of maternal poly(A)-containing RNA during early development of the ascidian, *Styela*', *Dev Biol.* 67(1):152-66.
- Jeffery, W. R., Tomlinson, C. R. und Brodeur, R. D.** (1983) 'Localization of actin messenger RNA during early ascidian development.', *Developmental biology* 99(2), pp. 408–417.
- Jiang, H., Mankodi, A., Swanson, M. S., Moxley, R. T. und Thornton, C. A.** (2004)

'Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA , sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons', *Human Molecular Genetics* 13(24), pp. 3079–3088.

Jiménez, F. und Campos-Ortega, J. A. (1979) 'A region of the *Drosophila* genome necessary for CNS development', *Nature* 282(5736):310-2.

Jimenez, F., Martin-Morris, L. E., Velasco, L., Chu, H., Sierra, J., Rosen, D. R. und White, K. (1995) '*vnd*, a gene required for early neurogenesis of *Drosophila*, encodes a homeodomain protein', *The EMBO Journal* 14(14), pp. 3487–3495.

Johnston, D. S. (1995) 'The Intracellular Localization of Messenger RNAs', *Cell* 81, pp. 161–170.

Kambadur, R., Koizumi, K., Stivers, C., Nagle, J., Poole, S. J. und Odenwald, W. F. (1998) 'Regulation of POU genes by *castor* and *hunchback* establishes layered compartments in the *Drosophila* CNS', *GENES & DEVELOPMENT* 12, pp. 246–260.

Kanadia, R. N., Johnstone, K. A., Mankodi, A., Lungu, C., Thornton, C. A., Esson, D., Timmers, A. M., Hauswirth, W. W. und Swanson, M. S. (2003) 'A *muscleblind* knockout model for myotonic dystrophy', *Science* 302(5652):1978-80.

Kanadia, R. N., Shin, J., Yuan, Y., Beattie, S. G., Wheeler, T. M., Thornton, C. A. und Swanson, M. S. (2006) 'Reversal of RNA missplicing and myotonia after *muscleblind* overexpression in a mouse poly (CUG) model for myotonic dystrophy', *PNAS* 103(31), 11748-11753.

Kanai, M. I., Okabe, M. und Hiromi, Y. (2005) 'Seven-up controls switching of transcription factors that specify temporal identities of *Drosophila* neuroblasts', *Developmental Cell* 8(2), pp. 203–213.

Karlin-Mcginness, M., Serano, T. L. und Cohen, R. S. (1996) 'Comparative analysis of the kinetics and dynamics of K10, *bicoid*, and *oskar* mRNA localization in the *Drosophila* oocyte', *Dev Genet.* 19(3): 238-48.

Katahira, J. (2012) 'Biochimica et Biophysica Acta mRNA export and the TREX complex', *BBA - Gene Regulatory Mechanisms Elsevier B.V.*, 1819(6), pp. 507–513.

Kataoka, N., Yong, J., Kim, V. N., Velazquez, F., Perkinson, R. A., Wang, F. und Dreyfuss, G. (2000) 'Pre-mRNA splicing imprints mRNA in the nucleus with a novel RNA-binding protein that persists in the cytoplasm', *Molecular Cell* 6, pp. 673–682.

Kelley, R. L. (1993) 'Initial organization of the *Drosophila* dorsoventral axis depends on an RNA-binding protein encoded by the *squid* gene', *GENES & DEVELOPMENT* (7), pp. 948–960.

Kelley, R. L., Meller, V. H., Gordadze, P. R., Roman, G., Davis, R. L. und Kuroda, M. I. (1999) 'Epigenetic spreading of the *Drosophila* dosage compensation complex from roX RNA genes into flanking chromatin', *Cell Vol.* 98, pp. 513–522.

Kibbe, W. A. (2007) 'OligoCalc : an online oligonucleotide properties calculator', *Nucleic Acids Research* 35, pp. 43–46.

Kiebler, M. A. und Bassell, G. J. (2006) 'Neuronal RNA granules : movers and makers', *Neuron* 51, pp. 685–690.

Kim-Ha, J., Smith, J. L. und Macdonald, P. M. (1991) '*oskar* mRNA is localized to

the posterior pole of the *Drosophila* oocyte', Cell 66(1):23-35.

Kim-Ha, J., Webster, P. J., Smith, J. L. und Macdonald, P. M. (1993) 'Multiple RNA regulatory elements mediate distinct steps in localization of *oskar* mRNA', Development 119, pp. 169–178.

Kim, H. H., Lee, S. J., Gardiner, A. S., Perrone-bizzozero, N. I. und Yoo, S. (2015) 'Different motif requirements for the localization Zipcode element of β -actin mRNA binding by HuD and', Nucleic Acids Research 43(15), pp. 7432–7446.

Kim, S. H., Suddath, F. L., Quigley, G. J., McPherson, A., Sussman, J. L., Wang, A. H., Seeman, N. C. und Rich, A. (1974) 'Three-dimensional tertiary structure of yeast phenylalanine transfer RNA', Science 185(4149):435-40.

Kim, V. N., Yong, J., Kataoka, N., Abel, L., Diem, M. D. und Dreyfuss, G. (2001) 'The Y14 protein communicates to the cytoplasm the position of exon \pm exon junctions', The EMBO Journal 20(8), 2062-2068.

Kino, Y., Mori, D., Oma, Y., Takeshita, Y., Sasagawa, N. und Ishiura, S. (2004) 'Muscleblind protein, MBNL1 / EXP, binds specifically to CHHG repeats', Human Molecular Genetics 13(5), pp. 495–507.

Kislauskis, E. H., Li, Z., Singer, R. H. und Taneja, K. L. (1993) 'Isoform-specific 3'-untranslated sequences sort alpha cardiac and / β -cytoplasmic actin messenger RNAs to different cytoplasmic compartments', The Journal of Cell Biology 123(1), pp. 165–172.

Kislauskis, E. H., Zhu, X. und Singer, R. H. (1994) 'Sequences responsible for intracellular localization of beta-actin messenger RNA also affect cell phenotype', The Journal of cell biology 127(2), pp. 441–451.

Kislauskis, E. H., Zhu, X. und Singer, R. H. (1997) ' β -Actin messenger RNA localization and protein synthesis augment cell motility', The Journal of Cell Biology 136(6), pp. 1263–1270.

Kloc, M., Spohr, G. und Etkin, L. D. (1993) 'Translocation of repetitive RNA sequences with the germ plasm in *Xenopus* oocytes', Science 262(5140):1712-4.

Kloc, M., Zearfoss, N. R. und Etkin, L. D. (2002) 'Mechanisms of subcellular mRNA localization of RNA is a widespread and efficient way', Cell 108, pp. 533–544.

Knoblich, J. A., Jan, L. Y. und Jan, Y. N. (1995) 'Asymmetric segregation of Numb and Prospero during cell division', Nature. 377(6550):624-7.

Knowles, R. B., Sabry, J. H., Martone, M. E., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Bassell, G. J. und Kosik, K. S. (1996) 'Translocation of RNA granules in living neurons', The Journal of Neuroscience 16(24), pp. 7812–7820.

Kraut, R., Menon, K. und Zinn, K. (2001) 'A gain-of-function screen for genes controlling motor axon guidance and synaptogenesis in *Drosophila*', Current Biology 11(6), pp. 417–430.

Krecic, A. M. und Swanson, M. S. (1999) 'hnRNP complexes: composition, structure, and function', Curr Opin Cell Biol. 11(3):363-71.

Kress, T. L., Yoon, Y. J. und Mowry, K. L. (2004) 'Nuclear RNP complex assembly initiates cytoplasmic RNA localization', The Journal of Cell Biology 165(2), pp. 203–211.

- Kurreck, J.** (2009) 'RNA interference: from basic research to therapeutic applications', *Angew Chem Int Ed Engl.* 2009;48(8):1378-98.
- Lall, S., Francis-lang, H., Flament, A., Norvell, A., Schu, T., Ish-horowicz, D., Fields, I. und Wca, L.** (1999) 'Squid hnRNP protein promotes apical cytoplasmic transport and localization of *Drosophila* pair-rule transcripts', *Cell* 98, pp. 171–180.
- Lamarck, J.-B.**, (1809) 'Philosophie zoologique, ou exposition des considérations relatives à l'histoire naturelle des animaux; à la diversité de leur organisation et des facultés qu'ils en obtiennent; aux causes physiques qui maintiennent en eux la vie et donnent lieu aux mouvemens qu'ils exécutent; enfin, à celles qui produisent les unes le sentiment, et les autres l'intelligence de ceux qui en sont doués' Baillière, Paris.
- Landgraf, M., Bossing, T., Technau, G. M. und Bate, M.** (1997) 'The origin, location, and projections of the embryonic abdominal motorneurons of *Drosophila*', *The Journal of Neuroscience* 17(24), pp. 9642–9655.
- Lange, S., Katayama, Y., Schmid, M. und Burkacky, O.** (2008) 'Simultaneous transport of different localized mRNA species revealed by live-cell imaging', *Traffic* pp. 1256–1267.
- Larson, D. R., Zenklusen, D., Wu, B., Chao, J. A. und Singer, R. H.** (2011) 'Real-time observation of transcription initiation and elongation on an endogenous yeast gene', *Science* 332(6028):475-8.
- Larsson, S. H., Charlieu, J., Miyagawa, K., Engelkamp, D., Rassoulzadegan, M., Ross, A., Cuzin, F., Heyningen, V. Van und Hastie, N. D.** (1995) 'Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing', *Cell* 81, pp. 391–401.
- Lawrence, J. B. und Singer, R. H.** (1986) 'Intracellular localization of messenger RNAs for cytoskeletal proteins.', *Cell* 45(3), pp. 407–415.
- Lécuyer, E., Yoshida, H., Parthasarathy, N., Alm, C., Babak, T., Cerovina, T., Hughes, T. R., Tomancak, P. und Krause, H. M.** (2007) 'Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function', *Cell* 131(1), pp. 174–187.
- Legrain, P. und Rosbash, M.** (1989) 'Some cis- and trans-acting mutants for splicing target pre-mRNA to the cytoplasm', *Cell* 57(4):573-83.
- Lehmann, R. und Nüsslein-Volhard, C.** (1986) 'Abdominal segmentation, pole cell formation, and embryonic polarity require the localized activity of *oskar*, a maternal gene in *Drosophila*', *Cell* 47(1):141-52.
- Lewis, R. A. und Mowry, K. L.** (2007) 'Ribonucleoprotein remodeling during RNA localization', *Differentiation* 75(6):507-18.
- Li, L., Yu, Z., Teng, X. und Bonini, N. M.** (2008) 'RNA toxicity is a component of ataxin-3 degeneration in *Drosophila*', *Nature* 453(7198), pp. 1107–1111.
- Liang, L., Diehl-jones, W. und Lasko, P.** (1994) 'Localization of vasa protein to the *Drosophila* pole plasm is independent of its RNA-binding and helicase activities', *Development* 120(5), pp. 1201–1211.
- Liu, Z., Yang, X., Li, Z., McMahan, C., Sizer, C., Bliskovsky, V., Mock, B., Ried, T., London, W. B. und Maris, J.** (2011) 'CASZ1, a candidate tumor-suppressor gene,

suppresses neuroblastoma tumor growth through reprogramming gene expression', *Cell Death and Differentiation* 18, pp. 1174–1183.

Liu, Z., Yang, X., Tan, F., Cullion, K. und Thiele, C. J. (2006) 'Molecular cloning and characterization of human Castor, a novel human gene upregulated during cell differentiation', *Biochem Biophys Res Commun.* 344(3):834-44.

Lopez, A. J. (1998) 'Alternative splicing of pre-mRNA: developmental consequences and mechanisms of regulation', *Annu Rev Genet.* 32:279-305.

Lowenstein, C. J., Lowenstein, C. J. und Padalko, E. (2004) 'iNOS (NOS2) at a glance', *Journal of Cell Science* 117, pp. 2865–2867.

Lubelsky, Y. und Ulitsky, I. (2018) 'Sequences enriched in Alu repeats drive nuclear localization of long RNAs in human cells', *Nature* 555, pp. 107-111.

Luheshi, L. M. und Dobson, C. M. (2009) 'Bridging the gap : From protein misfolding to protein misfolding diseases', *FEBS Letters. Federation of European Biochemical Societies* 583(16), pp. 2581–2586.

Lüking, A., Stahl, U. und Schmidt, U. (1998) 'The protein family of RNA helicases', *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 33(4):259-96.

Macdonald, P. M. (1990) '*bicoid* mRNA localization signal : phylogenetic conservation of function and RNA secondary structure', *Development* 110, pp. 161–171.

Macdonald, P. M. und Kerr, K. (1997) 'Redundant RNA recognition events in *bicoid* mRNA localization', *RNA* 3, pp. 1413–1420.

Macdougall, N., Clark, A., Macdougall, E. und Davis, I. (2003) '*Drosophila gurken* (TGF α) mRNA localizes as particles that move within the oocyte in two dynein-dependent steps', *Developmental Cell* 4, pp. 307–319.

Machuca-Tzili, L., Thorpe, H., Robinson, T. E., Sewry, C. und Brook, J. D. (2006) 'Flies deficient in Muscleblind protein model features of myotonic dystrophy with altered splice forms of Z-band associated transcripts', *Hum Genet.* 120(4):487-99.

Macleod, C. L. (1991) 'Regulation of cationic amino acid transporter (CAT) gene expression', *Biochemical Society Transactions* 24, pp. 846–852.

Mankodi, A., Urbinati, C. R., Yuan, Q. P., Moxley, R. T., Sansone, V., Krym, M., Henderson, D., Schalling, M., Swanson, M. S. und Thornton, C. A. (2001) 'Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2.', *Human molecular genetics* 10(19), pp. 2165–2170.

Martin, K. C. und Ephrussi, A. (2009) 'mRNA Localization: gene expression in the spatial dimension', *Cell. Elsevier Inc.*, 136(4), pp. 719–730.

Mathews, D. H., Moss, W. N. und Turner, D. H. (2010) 'Folding and finding RNA secondary structure', *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2:a003665

Matsuzaki, M. und Saigo, K. (1996) 'hedgehog signaling independent of engrailed and wingless required for post- S1 neuroblast formation in *Drosophila* CNS', *Development* 122, pp. 3567–3575.

Mattick, J. S. (2001) 'Non-coding RNAs : the architects of eukaryotic complexity', *EMBO reports* 2(11), pp. 986–991.

Mattick, J. S. (2003) 'Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-

coding RNAs in complex organisms', *Bioessays* 25(10):930-9.

Mattick, J. S. (2004) 'The hidden genetic program of complex organisms', *Sci Am.* 291(4):60-7.

Mattick, J. S. (2004) 'RNA regulation: a new genetics?', *Nat Rev Genet.* 5(4):316-23.

Mattick, J. S. und Gagen, M. J. (2001) 'The evolution of controlled multitasked gene networks : The role of introns and other noncoding RNAs in the development of complex organisms', *Mol. Biol. Evol.* 18(9), pp. 1611–1630.

Mattick, J. S. und Makunin, I. V. (2006) 'Non-coding RNA', *Human Molecular Genetics* 15(1), pp. 17–29.

Matunis, E. L., Matunis, M. J. und Dreyfuss, G. (1992) 'Characterization of the major hnRNP proteins from *Drosophila melanogaster*', *The Journal of Cell Biology* 116(2), 257-269.

Matunis, M. J., Matunis, E. L. und Dreyfuss, G. (1992) 'Isolation of hnRNP complexes from *Drosophila melanogaster*', *The Journal of Cell Biology* 116(2), 245-255.

Maurange, C., Cheng, L. und Gould, A. P. (2008) 'Temporal Transcription Factors and Their Targets Schedule the End of Neural Proliferation in *Drosophila*' *Cell* 133, 891–902.

McCullers, T. J. und Steiniger, M. (2017) 'Transposable elements in *Drosophila*', *MOBILE GENETIC ELEMENTS* 7(3).

McDermott, S. M., Meignin, C., Rappsilber, J. und Davis, I. (2012) '*Drosophila* Syncrip binds the *gurken* mRNA localisation signal and regulates localised transcripts during axis specification', *Biology Open* 1(5), pp. 488–497.

Mcdonald, J. A. und Doe, C. Q. (1997) 'Establishing neuroblast-specific gene expression in the *Drosophila* CNS : huckebein is activated by Wingless and Hedgehog and repressed by Engrailed and Gooseberry', *Development* 124, pp. 1079–1087.

Mcdonald, J. A., Holbrook, S., Isshiki, T., Weiss, J., Doe, C. Q. und Mellerick, D. M. (1998) 'Dorsoventral patterning in the *Drosophila* central nervous system : the vnd homeobox gene specifies ventral column identity', *GENES & DEVELOPMENT* 12, pp. 3603–3612.

Medioni, C., Mowry, K. und Besse, F. (2012) 'Principles and roles of mRNA localization in animal development', *Development* 139, pp. 3263–3276.

Meignin, C. und Davis, I. (2008) 'UAP56 RNA helicase is required for axis specification and cytoplasmic mRNA localization in *Drosophila*', *Developmental Biology*. Elsevier Inc., 315(1), pp. 89–98.

Meissner, B., Warner, A., Wong, K., Dube, N., Lorch, A., McKay, S. J., Khattra, J., Rogalski, T., Somasiri, A., Chaudhry, I., Fox, R. M., David, M., Baillie, D. L., Holt, R. A., Jones, S. J. M., Marra, M. A. und Moerman, D. G. (2009) 'An integrated strategy to study muscle development and myofilament structure in *Caenorhabditis elegans*', *PLoS Genetics* 5(6).

Melcak, I., Cermanova, S., Jirsova, K., Koberna, K., Malinsky, J. und Ras, I. (2000) 'Nuclear pre-mRNA compartmentalization : trafficking of released

- transcripts to splicing factor reservoirs', *Molecular Biology of the Cell* 11, pp. 497–510.
- Meller, V. H., Gordadze, P. R., Park, Y., Chu, X., Stuckenholz, C., Kelley, R. L. und Kuroda, M. I.** (2000) 'Ordered assembly of roX RNAs into MSL complexes on the dosage-compensated X chromosome in *Drosophila*', *Current Biology* 10(3), pp. 136–143.
- Meller, V. H., Wu, K. H., Roman, G., Kuroda, M. I. und Davis, R. L.** (1997) 'roX1 RNA paints the X chromosome of male *Drosophila* and is regulated by the dosage compensation system', *Cell* 88, pp. 445–457.
- Mellerick, D. M., Kassis, J. a., Zhang, S. D. und Odenwald, W. F.** (1992) '*castor* encodes a novel zinc finger protein required for the development of a subset of CNS neurons in *Drosophila*', *Neuron* 9(5), pp. 789–803.
- Mendel, G.** (1866) 'Versuche Über Pflanzen-Hybriden', *Verhandlungen des naturforschenden Vereines zu Brünn* 4 (1865): 3–47.
- Mettler, U., Vogler, G. und Urban, J.** (2005) 'Timing of identity : spatiotemporal regulation of *hunchback* in neuroblast lineages of *Drosophila* by Seven-up and Prospero', *Development* 133, pp. 429–437.
- Micklem, D. R., Adams, J., Grünert, S. und St Johnston, D.** (2000) 'Distinct roles of two conserved Staufin domains in *oskar* mRNA localization and translation', *The EMBO journal* 19(6), pp. 1366–1377.
- Miller, J. W., Urbinati, C. R., Teng-Umuay, P., Stenberg, M. G., Byrne, B. J., Thornton, C. a und Swanson, M. S.** (2000) 'Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy.', *The EMBO journal* 19(17), pp. 4439–4448.
- Miller, S. L.** (1953) 'A production of amino acids under possible primitive earth conditions', *Science* 117(3046):528-9.
- Miller, S. L. und Urey, H. C.** (1959) 'Organic compound synthesis on the primitive earth', *Science* 130(3370):245-51.
- Misteli, T. und Spector, D. L.** (1997) 'Protein phosphorylation and the nuclear organization of pre-mRNA splicing', *Trends Cell Biol.* 7(4):135-8.
- Misteli, T., Caceres, J. F. und Spector, D. L.** (1997) 'The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells', *Nature.* 387(6632):523-7.
- Miyazaki, J., Araki, K., Yamato, E., Ikegami, H., Asano, T., Shibasaki, Y., Oka, Y. und Yamamura, K.** (1990) 'Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms', *Endocrinology* 127(1):126-32.
- Mohr, S. E., Dillon, S. T. und Boswell, R. E.** (2001) 'The RNA-binding protein Tsunagi interacts with Mago Nashi to establish polarity and localize *oskar* mRNA during *Drosophila* oogenesis', *GENES & DEVELOPMENT* 15, pp. 2886–2899.
- Mooers, B. H. M., Logue, J. S. und Berglund, J. A.** (2005) 'The structural basis of myotonic dystrophy from the crystal structure of CUG repeats', *PNAS* 102(46), pp. 16626–16631.
- Morgan, T. H.** (1910) 'THE AMERICAN SOCIETY OF NATURALISTS CHANCE OR

- PURPOSE IN THE ORIGIN AND EVOLUTION OF ADAPTATION', *Science* 31(789):201-10.
- Morgan, T. H.** (1911) 'CHROMOSOMES AND ASSOCIATIVE INHERITANCE', *Science* 34(880):636-8.
- Morgan, T. H.** (1911) 'RANDOM SEGREGATION VERSUS COUPLING IN MENDELIAN INHERITANCE', *Science* 34(873):384.
- Morgan, T. H.** (1911) 'THE ORIGIN OF FIVE MUTATIONS IN EYE COLOR IN *DROSOPHILA* AND THEIR MODES OF INHERITANCE', *Science* 33(849):534-7.
- Mortillaro, M. J., Blencowet, B. J., Wei, X., Nakayasu, H., Dull, L. E. I., Warrenii, S. L., Sharp, P. A. und Berezney, R.** (1996) 'A hyperphosphorylated form of the large subunit of RNA polymerase II is associated with splicing complexes and the nuclear matrix', *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, pp. 8253–8257.
- Munro, T. P., Kwon, S., Schnapp, B. J. und St Johnston, D.** (2006) 'A repeated IMP-binding motif controls *oskar* mRNA translation and anchoring independently of *Drosophila melanogaster* IMP', *Journal of Cell Biology* 172(4), pp. 577–588.
- Nakamori, M. und Thornton, C.** (2010) 'Epigenetic changes and non-coding expanded repeats', *Neurobiol Dis.* 39(1), pp. 21–27.
- Nakielny, S. und Dreyfuss, G.** (1996) 'The hnRNP C proteins contain a nuclear retention sequence that can override nuclear export signals', *J Cell Biol.* 134(6):1365-73.
- Nakielny, S. und Dreyfuss, G.** (1997) 'Nuclear export of proteins and RNAs', *Curr Opin Cell Biol.* 9(3):420-9.
- Nakielny, S., Fischer, U., Michael, W. M. und Dreyfuss, G.** (1997) 'RNA transport', *Annu Rev Neurosci.* 20:269-301.
- Nalavade, R., Griesche, N., Ryan, D. P., Hildebrand, S. und Krauss, S.** (2013) 'Mechanisms of RNA-induced toxicity in CAG repeat disorders.', *Cell death & disease.* Nature Publishing Group, 4(8), p. e752.
- Napierala, M. und Krzyzosiak, W. J.** (1997) 'CUG repeats present in Myotonin Kinase RNA form metastable "slippery" hairpins', *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 272(49), pp. 31079–31085.
- Neuman-Silberberg, F. S. und Schüpbach, T.** (1993) 'The *Drosophila* dorsoventral patterning gene *gurken* produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF alpha-like protein', *Cell* 75(1):165-74.
- Neuman-Silberberg, F. und Schüpbach, T.** (1994) 'Dorsoventral axis formation in *Drosophila* depends on the correct dosage of the gene *gurken*', *Development* 120, pp. 2457–2463.
- Neumüller, R. A. und Knoblich, J. A.** (2009) 'Dividing cellular asymmetry : asymmetric cell division and its implications for stem cells and cancer', *GENES & DEVELOPMENT* 23, pp. 2675–2699.
- Newmark, P. A. und Boswell, R. E.** (1994) 'The mago nashi locus encodes an essential product required for germ plasm assembly in *Drosophila*', *Development* 120, pp. 1303–1313.
- Nicholson, B., Manner, C. K., Kleeman, J. und Macleod, C. L.** (2001) 'Sustained

- nitric oxide production in Macrophages requires the Arginine Transporter CAT2', THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 276(19), pp. 15881–15885.
- Nielsen, J., Christiansen, J. A. N., Lykke-andersen, J., Johnsen, A. H., Wewer, U. M. und Nielsen, F. C.** (1999) 'A family of Insulin-Like Growth Factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development', MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY 19(2), pp. 1262–1270.
- Nielsen, J., Cilius Nielsen, F., Kragh Jakobsen, R. und Christiansen, J.** (2000) 'The biphasic expression of IMP/Vg1-RBP is conserved between vertebrates and *Drosophila*', Mechanisms of Development 96(1), pp. 129–132.
- Noller, H. F.** (1984) 'Structure of ribosomal RNA', Annu Rev Biochem. 53:119-62.
- Norvell, A., Debec, A., Finch, D., Gibson, L. und Thoma, B.** (2005) 'Squid is required for efficient posterior localization of *oskar* mRNA during *Drosophila* oogenesis', Development Genes and Evolution 215(7), pp. 340–349.
- Norvell, A., Kelley, R. L., Wehr, K. und Schüpbach, T.** (1999) 'Specific isoforms of Squid, a *Drosophila* hnRNP, perform distinct roles in Gurken localization during oogenesis', Genes and Development 13(7), pp. 864–876.
- Novotny, T., Eiselt, R. und Urban, J.** (2002) 'Hunchback is required for the specification of the early sublineage of neuroblast 7-3 in the *Drosophila* central nervous system', Development 129, pp. 1027–1036.
- Nüsslein-Volhard, C. und Wieschaus, E.** (1980) 'Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*', Nature 287(5785):795-801.
- Olivares, E. C., Hollis, R. P., Chalberg, T. W., Meuse, L., Kay, M. A. und Calos, M. P.** (2002) 'Site-specific genomic integration produces therapeutic Factor IX levels in mice', Nature biotechnology 20, 1124-1128.
- Orr, H. T. und Zoghbi, H. Y.** (2007) 'Trinucleotide repeat disorders', Annu Rev Neurosci. 30:575-621.
- Palacios, I. M.** (2002) 'RNA processing : splicing and the cytoplasmic localisation of mRNA', Current Biology 12(1), pp. 50–52.
- Palacios, I. M., Gatfield, D., St Johnston, D. und Izaurralde, E.** (2004) 'An eIF4AIII-containing complex required for mRNA localization and nonsense-mediated mRNA decay', Nature 427(6976):753-7.
- Pasquinelli, A. E., Ernst, R. K., Lund, E., Grimm, C., Zapp, M. L., Rekosh, D., Hammarskjö, M. und Dahlberg, J. E.** (1997) 'The constitutive transport element (CTE) of Mason – Pfizer monkey virus (MPMV) accesses a cellular mRNA export pathway', The EMBO Journal 16(24), pp. 7500–7510.
- Patel, N., Schafer, B., Corey, S. G. und Holmgren, R.** (1989) 'The role of segment polarity genes during *Drosophila* neurogenesis', GENES & DEVELOPMENT 3, pp. 890–904.
- Paulson, H. L., Perez, M. K., Trottier, Y., Trojanowski, J. Q., Subramony, S. H., Das, S. S., Vig, P., Mandel, J., Fischbeck, K. H. und Pittman, R. N.** (1997) 'Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in Spinocerebellar Ataxia Type 3', Neuron 19, pp. 333–344.
- Pause, A., Methot, N. und Sonenberg, N.** (1993) 'The HRIGRXXR region of the

DEAD Box RNA Helicase Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A is required for RNA binding and ATP hydrolysis', *MOL. CELL. BIOL.* 13(11), pp. 6789–6798.

Pause, A. und Sonenberg, N. (1992) 'Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase : the mammalian translation initiation factor eIF-4A', *The EMBO Journal* 1(7), pp. 2643–2654.

Pearson, B. J. und Doe, C. Q. (2003) 'Regulation of neuroblast competence in *Drosophila*.', *Nature* 425(6958), pp. 624–628.

Pemberton, L. F. und Paschal, B. M. (2005) 'Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export', *Traffic* 6, pp. 187–198.

Pinol-Roma, S. und Dreyfuss, G. (1991) 'Transcription-dependent and transcription-independent nuclear transport of hnRNP proteins', *Science* 253(5017):312-4.

Pinol-Roma, S. und Dreyfuss, G. (1992) 'Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm', *Nature* 355(6263):730-2.

Poulson, D.F. (1950) 'Histogenesis, organogenesis and differentiation in the embryo of *Drosophila melanogaster*', Meigen. In *Biology of Drosophila* (ed. M. Demerec) pp. 168-274. Wiley, N. Y.

Prasanth, K. V., Prasanth, S. G., Xuan, Z., Hearn, S., Freier, S. M., Bennett, C. F., Zhang, M. Q. und Spector, D. L. (2005) 'Regulating gene expression through RNA nuclear retention', *Cell*, 123(2), pp. 249–263.

Prasanth, K. V und Spector, D. L. (2007) 'Eukaryotic regulatory RNAs : an answer to the " genome complexity " conundrum', *GENES & DEVELOPMENT* 21, pp. 11–42.

Quimby, B. B. und Corbett, A. H. (2001) 'Nuclear transport mechanisms', *Cell Mol Life Sci.* 58(12-13):1766-73.

Raj, A. und van Oudenaarden, A. (2008) 'Nature, nurture, or chance: stochastic gene expression and its consequences', *Cell* 135(2):216-26.

Rebagliati, M. R., Weeks, D. L., Harvey, R. P. und Melton, D. A. (1985) 'Identification and cloning of localized maternal RNAs from *Xenopus* eggs.', *Cell*, 42(3), pp. 769–777.

Reed, R. und Cheng, H. (2005) 'TRES, SR proteins and export of mRNA', *Curr Opin Cell Biol.* 17(3):269-73.

Reichert, H. (2011) '*Drosophila* neural stem cells: cell cycle control of self-renewal, differentiation, and termination in brain development', *Results Probl Cell Differ.* 53:529-46.

Richelle, J. und Ghysen, A. (1979) 'Determination of sensory bristles and pattern formation in *Drosophila*, I. A model', *Dev Biol.* 70(2):418-37.

Riebli, N., Viktorin, G. und Reichert, H. (2013) 'Early-born neurons in type II neuroblast lineages establish a larval primordium and integrate into adult circuitry during central complex development in *Drosophila*' *Neural Development* 2013, 8:6.

Riemer, D., Stuurman, N., Berrios, M., Hunter, C., Fisher, P. A. und Weber, K. (1995) 'Expression of *Drosophila* lamin C is developmentally regulated : analogies with vertebrate A-type lamins', *Journal of Cell Science* 108, pp. 3189–3198.

Rivas, E. und Eddy, S. R. (1999) 'A dynamic programming algorithm for RNA

structure prediction including pseudoknots', *J Mol Biol.* 285(5):2053-68.

Rivera Vargas, T., Boudoukha, S., Simon, A., Souidi, M., Cuvellier, S., Pinna, G. und Polesskaya, A. (2013) 'Post-transcriptional regulation of cyclins D1, D3 and G1 and proliferation of human cancer cells depend on IMP-3 nuclear localization.', *Oncogene* 33(22), pp. 2866–75.

Robertus, J. D., Ladner, J. E., Finch, J. T., Rhodes, D., Brown, R. S., Clark, B. F. und Klug, A. (1974) 'Structure of yeast phenylalanine tRNA at 3 Å resolution', *Nature* 250(467):546-51.

Rogers, G. W., Lima, W. F. und Merrick, W. C. (2001) 'Further Characterization of the Helicase Activity of eIF4A', *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 276(16), pp. 12598–12608.

Rogers, G. W., Richter, N. J. und Merrick, W. C. (1999) 'Biochemical and Kinetic Characterization of the RNA Helicase Activity of Eukaryotic Initiation Factor 4A', *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 274(18), pp. 12236–12244.

Romani, S., Campuzano, S. und Modolell, J. (1987) 'The achaete-scute complex is expressed in neurogenic regions of *Drosophila* embryos', *The EMBO Journal* 6(7), pp. 2085–2092.

Romani, S., Jimenezb, F., Hocha, M., Patelc, N. H., Tauberta, H. und Herbert, J. (1996) 'Krüppel, a *Drosophila* segmentation gene, participates in the specification of neurons and glial cells', *Mechanisms of Development* 60, pp. 95–107.

Rondon, A. G., Jimeno, S. und Aguilera, A. (2010) 'The interface between transcription and mRNP export: from THO to THSC/TREX-2', *Biochem Biophys Acta.* 1799(8):533-8.

Ross, A. F., Oleynikov, Y., Kislauskis, E. H., Taneja, K. L. und Singer, R. H. (1997) 'Characterization of a β -Actin mRNA Zipcode-Binding Protein', *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* 17(4), pp. 2158–2165.

Rothwell, W. F., Fogarty, P., Field, C. M. und Sullivan, W. (1998) 'Nuclear-fallout, a *Drosophila* protein that cycles from the cytoplasm to the centrosomes, regulates cortical microfilament organization', *Development* 125, pp. 1295–1303.

Rozen, F., Edery, I., Meerovitch, K., Dever, T. E., Merrick, W. C. und Sonenberg, N. (1990) 'Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F', *MOL. CELL. BIOL.* 10(3), pp. 1134–1144.

Ryder, P. V. und Lerit, D. A. (2018) 'RNA localization regulates diverse and dynamic cellular processes', *Traffic* 19(7):496-502.

dos Santos, G., Simmonds, A. J. und Krause, H. M. (2008) 'A stem-loop structure in the wingless transcript defines a consensus motif for apical RNA transport.', *Development (Cambridge, England)*, 135(1), pp. 133–143.

Saunders, C. und Cohen, R. S. (1999) 'The role of oocyte transcription, the 5' UTR, and translation repression and derepression in *Drosophila gurken* mRNA and protein localization', *Molecular Cell* 3, pp. 43–54.

Schellman, J. A. und Schellman, C. G. (1997) 'Kaj Ulrik Linderström-Lang (1896-1959)', *Protein Science* 6, pp. 1092–1100.

Schmid, A., Chiba, A. und Doe, C. Q. (1999) 'Clonal analysis of *Drosophila*

embryonic neuroblasts: neural cell types, axon projections and muscle targets', *Development* 126, pp. 4653–4689.

Schmid, S. R. und Linder, P. (1991) 'Translation Initiation Factor 4A from *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of residues conserved in the D-E-A-D family of RNA helicases', *MOL. CELL. BIOL.* 11(7), pp. 3463–3471.

Schmidt, H., Rickert, C., Bossing, T., Vef, O., Urban, J. und Technau, G. M. (1997) 'The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. II. Neuroblast lineages derived from the dorsal part of the neuroectoderm.', *Developmental biology*, 189(2), pp. 186–204.

Senecal, A., Munsky, B., Proux, F., Ly, N., Braye, F. E., Zimmer, C., Müller, F. und Darzacq, X. (2014) 'Transcription factors modulate c-Fos transcriptional bursts', *Cell Rep.* 8(1):75-83.

Sengoku, T., Nureki, O., Nakamura, A., Kobayashi, S. und Yokoyama, S. (2006) 'Structural basis for RNA unwinding by the DEAD-Box protein *Drosophila* Vasa', *Cell* 125, pp. 287–300.

Serano, T. L. und Cohen, R. S. (1995) 'A small predicted Stem-loop structure mediates oocyte localization of *Drosophila* K10 mRNA.', *Development (Cambridge, England)*, 121(11), pp. 3809–3818.

Seyffert, W. (2003) 'Lehrbuch der Genetik', 2. Auflage, Springer Spektrum.

Sharma, A., Takata, H., Shibahara, K., Bubulya, A. und Bubulya, P. A. (2010) 'Son is essential for nuclear speckle organization and cell cycle progression', *Molecular Biology of the Cell* 21, pp. 650–663.

Shaye, D. D. und Greenwald, I. (2011) 'OrthoList: A Compendium of *C. elegans* Genes with human orthologs', *PLoS ONE* 6(5).

Shepard, K. A., Gerber, A. P., Jambhekar, A., Takizawa, P. A., Brown, P. O., Herschlag, D., Derisi, J. L. und Vale, R. D. (2003) 'Widespread cytoplasmic mRNA transport in yeast: Identification of 22 bud-localized transcripts using DNA microarray analysis', *PNAS* 100(20), 11429–11434.

Shi, H. U. A., Hoffman, B. E. und Lis, J. T. (1997) 'A specific RNA hairpin loop structure binds the RNA recognition motifs of the *Drosophila* SR protein B52', *MOL. CELL. BIOL.* 17(5), pp. 2649–2657.

Shibuya, T., Tange, T. O., Sonenberg, N. und Moore, M. J. (2004) 'eIF4AIII binds spliced mRNA in the exon junction complex and is essential for nonsense-mediated decay', *Nat Struct Mol Biol.* 11(4):346-51.

Sibon, O. C., Kelkar, A., Lemstra, W. und Theurkauf, W. E. (2000) 'DNA-replication/DNA-damage-dependent centrosome inactivation in *Drosophila* embryos', *Nat Cell Biol.* 2(2):90-5.

Simmonds, A. J., Livne-bar, I., Krause, H. M. und Street, C. (2001) 'Apical localization of wingless transcripts is required for Wingless signaling', *Cell* 105, pp. 197–207.

Simon, B., Masiewicz, P., Ephrussi, A. und Carlomagno, T. (2015) 'The structure of the SOLE element of *oskar* mRNA', *RNA* 21, pp. 1444–1453.

Simpson, P. A. T. (1990) 'Lateral inhibition and the development of the sensory

bristles of the adult peripheral nervous system of *Drosophila*', *Development* 109, pp. 509–519.

Singh, A. und Bokes, P. (2012) 'Consequences of mRNA transport on stochastic variability in protein levels', *Biophys J.* 103(5):1087-96.

Skeath, J. B. (1999) 'At the nexus between pattern formation and cell-type specification: the generation of individual neuroblast fates in the *Drosophila* embryonic central nervous system', *Bioessays.* 21(11):922-31.

Skeath, J. B. und Carroll, S. B. (1991) 'Regulation of achaete-scute gene expression and sensory organ pattern formation in the *Drosophila* wing', *GENES & DEVELOPMENT* 5, pp. 984–995.

Skeath, J. B., Panganiban, G. F. und Carroll, S. B. (1994) 'The ventral nervous system defective gene controls proneural gene expression at two distinct steps during neuroblast formation in *Drosophila*', *Development* 120, pp. 1517–1524.

Skeath, J. B. und Thor, S. (2003) 'Genetic control of *Drosophila* nerve cord development', *Curr Opin Neurobiol.* 13(1):8-15.

Snee, M. J., Arn, E. A., Bullock, S. L. und Macdonald, P. M. (2005) 'Recognition of the bcd mRNA localization signal in *Drosophila* embryos and ovaries', *MOL. CELL. BIOL.* 25(4), pp. 1501–1510.

Sobczak, K. und Krzyzosiak, W. J. (2004) 'Imperfect CAG repeats form diverse structures in SCA1 transcripts', *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 279(40), pp. 41563–41572.

Sobczak, K. und Krzyzosiak, W. J. (2005) 'CAG repeats containing CAA interruptions form branched hairpin structures in Spinocerebellar Ataxia Type 2 transcripts', *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 280(5), pp. 3898–3910.

Sobczak, K., Mezer, M. De, Michlewski, G. und Krol, J. (2003) 'RNA structure of trinucleotide repeats associated with human neurological diseases', *Nucleic Acids Research* 31(19), 5469-5482.

Soller, M. (2006) 'Pre-messenger RNA processing and its regulation: A genomic perspective', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(7–8), pp. 796–819.

Sommerville, J. und Ladomery, M. (1996) 'Masking of mRNA by Y-box proteins', *FASEB J.* 10(4):435-43.

Spana, E. P. und Doe, C. Q. (1995) 'The prospero transcription factor is asymmetrically localized to the cell cortex during neuroblast mitosis in *Drosophila*', *Development* 121, pp. 3187–3195.

Spector, D. L., Ful, X. und Maniatis, T. (1991) 'Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus', *The EMBO Journal* 10(11), pp. 3467–3481.

Spector, D. L. und Lamond, A. I. (2011) 'Nuclear Speckles', *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3:a000646

Spradling, A. C., Stern, D., Beaton, A., Rhem, E. J., Laverly, T., Mozden, N., Misra, S. und Rubin, G. M. (1999) 'The Berkeley *Drosophila* Genome Project Gene Disruption Project: Single P -Element insertions mutating 25 % of vital *Drosophila* genes', *Genetics* 153: 135–177.

- St Johnston, D.** (2005) 'Moving messages: the intracellular localization of mRNAs', *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6(5):363-75.
- St Johnston, D., Beuchle, D. und Nüsslein-Volhard, C.** (1991) 'Staufen, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg', *Cell* 66(1):51-63.
- Steitz, J. A.** (1969) 'Nucleotide sequences of the ribosomal binding sites of bacteriophage R17 RNA', *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 34:621-30.
- Strässer, K., Masuda, S., Mason, P., Pfannstiel, J., Oppizzi, M., Rodriguez-Navarro, S., Rondon, A. G., Aguilera, A., Struhl, K., Reed, R. und Hurt, E.** (2002) 'TRESK is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export', *Nature* 417(6886):304-8.
- Sturtevant, A. H.** (1917) 'Genetic factors affecting the strength of linkage in *Drosophila*', *Proc Natl Acad Sci USA* 3(9), pp. 555-558.
- Sturtevant, A. H., Bridges, C. und Morgan, T.** (1919) 'The spatial relations of genes'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Vol. 5, No. 5, pp. 168-173.
- Sullivan, W., Daily, D. R., Fogarty, P., Yook, K. J. und Pimpinelli, S.** (1993) 'Delays in anaphase initiation occur in individual nuclei of the syncytial *Drosophila* embryo', *Molecular Biology of the Cell* 4, pp. 885-896.
- Sullivan, W., Fogarty, P. und Theurkauf, W.** (1993) 'Mutations affecting the cytoskeletal organization of syncytial *Drosophila* embryos', *Development* 118, pp. 1245-1254.
- Suter, D. M., Molina, N., Gatfield, D., Schneider, K., Schibler, U. und Naef, F.** (2011) 'Mammalian genes are transcribed with widely different bursting kinetics', *Science* 332(6028):472-4.
- Taghert, P. und Goodman, C.** (1984) 'Cell determination and differentiation of serotonin-immunoreactive neurons in the grasshopper embryo', *The Journal of Neuroscience* 4(4), 989-1000.
- Takada, S., Kelkar, A. und Theurkauf, W. E.** (2003) '*Drosophila* Checkpoint Kinase 2 couples centrosome function and spindle assembly to genomic integrity', *Cell* 113, pp. 87-99.
- Taliaferro, J. M., Wang, E. T. und Burge, C. B.** (2014) 'Genomic analysis of RNA localization', *RNA Biology* 11:8, 1040-1050.
- Taneja, K. L., McCurrach, M., Schalling, M., Housman, D. und Singer, R. H.** (1995) 'Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of Myotonic Dystrophy cells and tissues', *The Journal of Cell Biology* 128(6), pp. 995-1002.
- Tange, T. O., Nott, A. und Moore, M. J.** (2004) 'The ever-increasing complexities of the exon junction complex', *Curr Opin Cell Biol.* 16(3):279-84.
- Technau, G. M., Berger, C. und Urbach, R.** (2006) 'Generation of cell diversity and segmental pattern in the embryonic central nervous system of *Drosophila*', *Developmental Dynamics*, 235(4), pp. 861-869.
- Terry, L. J. und Wente, S. R.** (2007) 'Nuclear mRNA export requires specific FG nucleoporins for translocation through the nuclear pore complex', *J Cell Biol.* 178(7)1121-32.

- Thapar, R., Denmon, A. P. und Nikonowicz, E. P.** (2015) 'Recognition modes of RNA tetraloops and tetraloop-like motifs by RNA binding proteins', Wiley Interdiscip Rev RNA 5(1), pp. 1–28.
- Thio, G. L., Ray, R. P., Barcelo, G. und Schu, T.** (2000) 'Localization of *gurken* RNA in *Drosophila* oogenesis requires elements in the 5' and 3' regions of the transcript', Developmental Biology 221, pp. 435–446.
- Thisse, C., und Thisse, B.** (2005) 'High throughput expression analysis of ZF-models consortium clones', ZFIN Direct Data Submission.
- Thorpe, H. M., Wilson, S. E., Margaret, C. und Smith, M.** (2000) 'Control of directionality in the site-specific recombination system of the Streptomyces phage f C31', Molecular Microbiology 38(2), pp. 232–241.
- Thorpe, H. und Smith, M.** (1998) 'In vitro site-specific integration of bacteriophage DNA catalyzed by a recombinase of the resolvase⁻invertase family', Proc. Natl. Acad. Sci. 95, pp. 5505–5510.
- Thyagarajan, B., Olivares, E. C., Hollis, R. P., Ginsburg, D. S. und Calos, M. P.** (2001) 'Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by Phage C31 Integrase', MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY 21(12), pp. 3926–3934.
- Tinker, R., Silver, D. und Montell, D. J.** (1998) 'Requirement for the Vasa RNA Helicase in *gurken* mRNA Localization', DEVELOPMENTAL BIOLOGY 199, pp. 1–10.
- Todd, P. K. und Paulson, H. L.** (2010) 'RNA mediated neurodegeneration in repeat expansion disorders', Ann Neurol. 67(3), pp. 291–300.
- Tomancak, P., Beaton, A., Weiszmann, R., Kwan, E., Shu, S., Lewis, S. E., Richards, S., Hartenstein, V., Celniker, S. E. und Rubin, G. M.** (2002) 'Systematic determination of patterns of gene expression during *Drosophila* embryogenesis', Genome Biology 3(12), pp. 1–14.
- Tripathi, V., Ellis, J. D., Shen, Z., Song, D. Y., Pan, Q., Andrew, T., Freier, S. M., Bennett, C. F., Sharma, A., Bubulya, P. A., Benjamin, J., Prasanth, S. G. und Prasanth, K. V.** (2014) 'The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation', Mol Cell 39(6), pp. 925–938.
- Udolph, G., Prokop, A., Bossing, T. und Technau, G. M.** (1993) 'A common precursor for glia and neurons in the embryonic CNS of *Drosophila* gives rise to segment-specific lineage variants', Development 118, pp. 765–775.
- Urbach, R., Jussen, D. und Technau, G. M.** (2016) 'Gene expression profiles uncover individual identities of gnathal neuroblasts and serial homologies in the embryonic CNS of *Drosophila*', Development 143, pp. 1290–1301.
- Urbach, R., Schnabel, R. und Technau, G. M.** (2003) 'The pattern of neuroblast formation, mitotic domains and proneural gene expression during early brain development in *Drosophila*', Development 130 pp. 3589–3606.
- Vacalla, C. M. H. und Theil, T.** (2002) 'Cst, a novel mouse gene related to *Drosophila* Castor, exhibits dynamic expression patterns during neurogenesis and heart development', Mechanisms of Development 118, pp. 265–268.
- Vässin, H., Grell, E., Wolff, E., Bier, E., Jan, L. Y. und Jan, Y. N.** (1991) 'prospero is expressed in neuronal precursors and encodes a nuclear protein that is involved in

the control of axonal outgrowth in *Drosophila*', *Cell*. 67(5):941-53.

Versteeg, R., van Schaik, B. D. C., van Batenburg, M. F., Roos, M., Monajemi, R., Caron, H., Bussemaker, H. J., und van Kampen A. H. C. (2003) 'The human transcriptome map reveals extremes in gene density, intron length, GC content, and repeat pattern for domains of highly and weakly expressed genes', *Genome Research* 13:1998–2004.

Vicente, M., Monferrer, L., Poulos, M. G., Houseley, J., Monckton, D. G., O'dell, K. M., Swanson, M. S. und Artero, R. D. (2007) 'Muscleblind isoforms are functionally distinct and regulate alpha-actinin splicing', *Differentiation* 75(5):427-40.

Vicente-crespo, M., Pascual, M., Fernandez-costa, J. M., Garcia-lopez, A., Miranda, M. E., Zhou, L. und Artero, R. D. (2008) '*Drosophila* Muscleblind is involved in troponin T alternative splicing and apoptosis', *PLoS ONE* 3(2).

Visa, N., Izaurrealde, E., Ferreira, J., Daneholt, B. und Mattaj, I. W. (1996) 'A Nuclear cap-binding complex binds Balbiani Ring Pre-mRNA cotranscriptionally and accompanies the ribonucleoprotein particle during nuclear export', *The Journal of Cell Biology* 133(1), pp. 5–14.

Wang, E. T., Cody, N. a L., Jog, S., Biancolella, M., Wang, T. T., Treacy, D. J., Luo, S., Schroth, G. P., Housman, D. E., Reddy, S., Lécuyer, E. und Burge, C. B. (2012) 'Transcriptome-wide regulation of pre-mRNA splicing and mRNA localization by muscleblind proteins', *Cell*, 150(4), pp. 710–724.

Watson, J. D. und Crick, F. H. (1953) 'Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid', *Nature*, 171(4356):737-8.

Weigmann, K. und Lehner, C. F. (1995) 'Cell fate specification by *even-skipped* expression in the *Drosophila* nervous system is coupled to cell cycle progression', *Development* 121, pp. 3713–3721.

Weiss, J. B., Ohlen, T. Von, Mellerick, D. M., Dressler, G., Doe, C. Q. und Scott, M. P. (1998) 'Dorsoventral patterning in the *Drosophila* central nervous system : the intermediate neuroblasts defective homeobox gene specifies intermediate column identity', *GENES & DEVELOPMENT* 12, pp. 3591–3602.

Wheeler, W. C. und Honeycutt, R. L. (1988) 'Paired sequence difference in ribosomal RNAs : evolutionary and phylogenetic implications ", *Mol. Biol. Evol.* 5(1), pp. 90–96.

Wheeler, W. M. (1891) 'Neuroblasts in the arthropod embryo', *Journal of morphology*, Vol. 4, Issue 3, Pg 337–343.

Wheeler, W. M. (1893) 'A contribution to insect embryology', *Journal of morphology*, Vol. 8, Issue 1, Pages 1–161.

White, K. (1980) 'Defective neural development in *Drosophila melanogaster* embryos deficient for the tip of the X chromosome', *Dev Biol.* 80(2):332-44.

White, K., Decelles, N. L. und Enlow, A. N. D. T. C. (1983) 'THE vnd', *Genetics* 104, pp. 433–448.

Wigglesworth, B. Y. V. B. (1940) 'Local and general factors in the development of "pattern" in *Rhodnius prolixus* (hemiptera)'. London School of Hygiene and Tropical Medicine

- Wilhelm, J. und Vale, R. D.** (1993) 'Mini-Review RNA on the Move : The mRNA localization pathway', *The Journal of Cell Biology* 123(2), pp. 269–274.
- Wilkie, G. S. und Davis, I.** (2001) '*Drosophila* wingless and pair-rule transcripts localize apically by dynein-mediated transport of RNA particles', *Cell* 105, pp. 209–219.
- Wilkie, G. S., Zimyanin, V., Kirby, R., Korey, C., Vactor, D. Van, Davis, I., Wilkie, G. S., Zimyanin, V., Kirby, R., Korey, C., Francis-lang, H., Vactor, D. V. A. N. und Davis, I.** (2001) 'Small bristles , the *Drosophila* ortholog of NXF-1 , is essential for mRNA export throughout development', *RNA* 7, pp. 1781–1792.
- Wilusz, J. E., Sunwoo, H. und Spector, D. L.** (2009) 'Long noncoding RNAs : functional surprises from the RNA world', *GENES & DEVELOPMENT* 23, pp. 1494–1504.
- Xia, T., SantaLucia, J. Jr., Burkard, M. E., Kierzek, R., Schroeder, S. J., Jiao, X., Cox, C. und Turner, D. H.** (1998) 'Thermodynamic parameters for an expanded nearest-neighbor model for formation of RNA duplexes with Watson-Crick base pairs', *Biochemistry*, 37(42):14719-35.
- Xiong, L. P., Ma, Y. Q. und Tang, L. H.** (2009) 'Attenuation of transcriptional bursting in mRNA transport', *Phys Biol.* 7(1):0160005.
- Yaffe, D., Nudel, U., Mayer, Y. und Neuman, S.** (1985) 'Highly conserved sequences in the 3'UTR region of nmRNAs coding for homologous proteins in distantly related species', *Nucleic Acids Research* 13(10), pp. 3723–3737.
- Yang, X., Yeo, S., Dick, T. und Chia, W.** (1993) 'The role of a *Drosophila* POU homeo domain gene in the specification of neural precursor cell identity in the developing embryonic central nervous system', *GENES & DEVELOPMENT* 7, pp. 504–516.
- Yaniv, K. und Yisraeli, J. K.** (2002) 'The involvement of a conserved family of RNA binding proteins in embryonic development and carcinogenesis', *Gene* 287(1–2), pp. 49–54.
- Yano, T., Lo, S., Matsui, Y., Shevchenko, A., Shevchenko, A. und Ephrussi, A.** (2004) 'Hrp48 , a *Drosophila* hnRNPA / B homolog , binds and regulates translation of *oskar* mRNA', *Developmental Cell* 6, pp. 637–648.
- Yisraeli, J. K.** (2005) 'VICKZ proteins: a multi-talented family of regulatory RNA-binding proteins.', *Biology of the cell*, 97(1), pp. 87–96.
- Zanier, K., Luyten, I., Crombie, C., Müller, B., Schümperli, D., Linge, J. P., Nilges, M. und Sattler, M.** (2002) 'Structure of the histone mRNA hairpin required for cell cycle regulation of histone gene expression', *RNA* 8, pp. 29–46.
- Zhang, H. L., Eom, T., Oleynikov, Y., Shenoy, S. M., Liebelt, D. A., Dichtenberg, J. B., Singer, R. H. und Bassell, G. J.** (2001) 'Neurotrophin-induced transport of a β -Actin mRNP complex increases β -Actin levels and stimulates growth cone motility', *Neuron* 31, pp. 261–275.
- Zhang, Y., Ungar, A., Fresquez, C. und Holmgren, R.** (1994) 'Ectopic expression of either the *Drosophila* gooseberry-distal or proximal gene causes alterations of cell fate in the epidermis and central nervous system', *Development* 120, pp. 1151–1161.

- Zhang, Z. und Carmichael, G. G.** (2001) 'The fate of dsRNA in the nucleus : A p54 nrb-containing complex mediates the nuclear retention of promiscuously A-to-I edited RNAs', *Cell* 106, pp. 465–475.
- Zhou, Y. und King, M. Lou** (1996) 'RNA transport to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes', *DEVELOPMENTAL BIOLOGY* 183(249), pp. 173–183.
- Zimyanin, V. L., Belaya, K., Pecreaux, J., Gilchrist, M. J., Clark, A. und Davis, I.** (2008) 'In vivo imaging of *oskar* mRNA transport reveals the mechanism of posterior localization', *CELL* 134(5), pp. 843–853.
- Zuker, M.** (2003) 'Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction', *Nucleic Acids Research* 31(13), pp. 3406–3415.

7 ANHANG

7.1 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

7.1.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Mechanismen der mRNA-Lokalisation.....	9
Abb. 1.2: Schematische Darstellung der frühen Stadien der embryonalen Neurogenese bei <i>D. melanogaster</i>	12
Abb. 1.3: Genstruktur von <i>cas</i> -RA.....	14
Abb. 1.4: Konstrukte UAS <i>cas</i> ¹⁻⁴	15
Abb. 2.1: UAS-Gal4 System.....	20
Abb. 2.2: Kreuzung zur Gewinnung homozygot transgener Fliegen.....	33
Abb. 3.1: Die Lokalisation der <i>cas</i> mRNA und des Cas Proteins vom Start der Transkription bis zur zweiten mRNA-Syntheserunde im NB 6-1.....	41
Abb. 3.2: InscGal4 L2-Larve, Typ I.....	43
Abb. 3.3: Neurogenese im larvalen Gehirn von <i>Drosophila</i>	44
Abb. 3.4: <i>cas</i> mRNA in-situ Hybridisierung und Cas Antikörperfärbung am Gehirn einer wildtypischer L3-Larve.....	45
Abb. 3.5: <i>cas</i> mRNA in-situ Hybridisierung und Cas Antikörperfärbung am Gehirn einer wildtypischer L3-Larve, Typ II.....	46
Abb. 3.6: In-situ Hybridisierung mit <i>cas</i> Exonsonde.....	47
Abb. 3.7: In-situ Hybridisierung mit <i>cas</i> Intronsonde.....	48
Abb. 3.8: Die <i>cas</i> mRNA-Retention ist im <i>D. virilis</i> Embryo konserviert.....	50
Abb. 3.9: Die <i>cas</i> mRNA-Retention ist in der <i>D. virilis</i> Larve konserviert.....	51
Abb. 3.10: Die Deletionskonstrukte UAS <i>cas</i> Del1-3.....	52
Abb. 3.11: Das <i>cas</i> mRNA-Retentionssignal befindet sich innerhalb der ersten 1035 Basen der CDS.....	54
Abb. 3.12: Die Deletionskonstrukte UAS <i>cas</i> NTDel1-3.....	55
Abb. 3.13: 300 Bp Deletionen können das Retentionssignal der <i>cas</i> mRNA nicht weiter eingrenzen.....	56
Abb. 3.14: Die Deletionskonstrukte UAS <i>cas</i> NTDel1.1-1.5.....	57
Abb. 3.15: 207 Bp Deletionen können das Retentionssignal der <i>cas</i> mRNA nicht weiter eingrenzen.....	59

Abb. 3.16: Das 1kb-nGFP-Fusionskonstrukt und die Konstrukte CG-1/2 mit eingebauten Spacersequenzen.	60
Abb. 3.17: Das erste kb der <i>cas</i> CDS reicht nicht zur Kernrückhaltung von nGFP aus.	61
Abb. 3.18: Der Einbau der Spacersequenz CG1 in die <i>cas</i> mRNA stört deren Kernrückhaltung.	63
Abb. 3.19: Der Einbau der Spacersequenz CG2 in die <i>cas</i> mRNA stört deren Kernrückhaltung.	65
Abb. 3.20: Die ZBP-1-Lokalisationssequenz der β -Aktin mRNA im Hühnchen.	66
Abb. 3.21: Das dImp-Sequenzmotiv ist zweimal innerhalb des ersten Kbs der <i>cas</i> -CDS lokalisiert.	66
Abb. 3.22: Der Zipcode ist innerhalb der <i>cas</i> -Sequenz von <i>D. virilis</i> teilweise konserviert.	69
Abb. 3.23: Die Deletion der beiden dImp-Motive ist ausreichend zum frühzeitigen <i>cas</i> mRNA-Kernexport.	70
Abb. 3.24: Der gezielte Austausch einzelner Basen unter Beibehaltung der endogenen Aminosäuresequenz von Cas.	71
Abb. 3.25: Der Basenaustausch innerhalb der dImp-Motive ist ausreichend zum frühzeitigen <i>cas</i> mRNA-Kernexport.	72
Abb. 3.26: <i>Cas</i> mRNA in-situ Hybridisierung und dImp Antikörperfärbung an wildtypischer L3-Larve, Typ I.	73
Abb. 3.27: <i>cas</i> mRNA in-situ Hybridisierung und dImp Antikörperfärbung an wildtypischer L3-Larve, Typ II.	74
Abb. 3.28: dImp Knock-down mittels RNAi zeigt bezüglich der <i>cas</i> mRNA keinen Phänotyp.	76
Abb. 3.29: Es besteht keine Kolo-kalisation zwischen der <i>cas</i> mRNA und den Antikörperfärbungen der Kandidaten.	78
Abb. 3.30: Cas und Mbl Antikörperfärbungen zeigen eine teilweise Überlappung.	80
Abb. 3.31: Mbl Knock-down mittels RNAi zeigt eine erhöhte Anzahl an <i>cas</i> positiven Zellen in kettenförmiger Anordnung, Typ I.	82
Abb. 3.32: Mbl Knock-down mittels RNAi zeigt eine erhöhte Anzahl an <i>cas</i> positiven Zellen, Typ II.	84
Abb. 4.1: Hypothetisches Model der Bindung von ZBP-1 an β -Aktin.	92
Abb. 4.2: Sekundärstruktur des <i>cas</i> -Transkripts im Bereich des Imp Zipcodes.	93
Abb. 4.3: Der grk mRNA-Lokalisationskomplex.	96
Abb. 4.4: Auffällige Haarnadelstrukturen im <i>cas</i> -Transkript.	98
Abb. 4.5: Schematische Darstellung der <i>hb</i> Regulation im NB durch Svp.	104

7.1.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Fliegenstämme	18
Tab. 2.2: Sequenzierprimer	21
Tab. 2.3: PCR-Primer	22
Tab. 2.4: Reaktionsprotokoll für einen 100 µl PCR-Ansatz mit der Taq PCR Polymerase (Qiagen)	24
Tab. 2.5: Thermocycler Konditionen für einen PCR-Ansatz mit der Taq PCR Polymerase (Qiagen)	24
Tab. 2.6: Reaktionsprotokoll für einen 50 µl PCR-Ansatz mit der KAPAHiFi™ DNA Polymerase (Peqlab)	25
Tab. 2.7: Thermocycler Konditionen für einen 50 µl PCR-Ansatz mit der KAPAHiFi™ DNA Polymerase (Peqlab)	25
Tab. 2.8: Restriktionsenzyme	26
Tab. 2.9: Vektoren	28
Tab. 2.10: In-vitro Transkriptionsansatz (20 µl) zur Herstellung einer RNA-Sonde mit der T7 Polymerase	34
Tab. 2.11: Reaktionsprotokoll zur Sondenherstellung für einen 100 µl PCR-Ansatz mit der Taq PCR Polymerase (Qiagen)	34
Tab. 2.12: Primäre Antikörper	37
Tab. 2.13: Sekundäre Antikörper	37
Tab. 2.14: Nukleinsäureinterkalatoren	37
Tab. 7.1: Geräte	152
Tab. 7.2: Kits	153
Tab. 7.3: Computersoftware	153
Tab. 7.4: allgemeines Abkürzungsverzeichnis	157
Tab. 7.5: Abkürzungsverzeichnis Gene und Proteine	160

7.2 Sequenzdaten

Sequenzierung UAScas

ATGTCCAACCAAATGGAGTTTATTATGCAACTCTACATGATGAACTTGATGAAGCAGCAGCAGCAAATGC
 AGCTCCAGCTTCCGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCTGGCTGGATACTTACACACAGAACGAGGATATC
 TCTAGCAGCACATCCGTGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGGAGCAACTGCAGCAGCCACAGCCAGATCT
 CCGCAAGACAAGAACGCACAAGCGCATTAGCTCGCAAAAACCAACTGTAGTAGTAGCCGTAGTTGTAGT
 CCCAATAGTAATTTGATTGCTTTTCAACCACAACAATACCCAGGCGCTACAGCGGCAACTCCTTCCACTCC
 CAACAGCCACCCAGCAACCTGGTCAACCAGATGCTGCTCCAAAGCCTGCCGCCGTGACGCAGCTCATGT
 TGCAGCAGCAGCAGCAACATTTGCTGACCACCTCCAACCTTCTACTAACACCCACCCACACCCAGTT
 CGCTGGGCAAGCAGGATCCACTGCAGCATCCGTTGTTGCTGGGCCAGTTTGCCGGCTCCGAACAGATGGCC

ACAAATAACTTCCTTCAATCATCCACAGTGACCTCCACGCCATCGAGAGAGAGAAGGCAGCCACACCAGC
 ACCCTCCGCCGAGCAACTGCCGGCAACCTTTCGGCGGCCAGGTCAAGTTTGTAGCAGGAGTCCGCCGACG
 ACGATGAGGACGATGATAAGCCGCTGTCCAGCCTCACCAGCTGCAGCTCCTCGGGCCACACCAACGCCAGC
 TCCGAGAAGCTGCTGTTGTCTGGGCGTCCATCCGCTGGAGTCAACCACCGACAGCCTAGACTCACCCAGCAT
 GTATACGCCCCTCAAGCAGCCGGCGGACTCATCGTACGGACTCATCACACCCGTCGACAGTGATCTGACCC
 CCAACACACCCCTCCAACCGACCCAAACAATATCCCTGCTGACGCCCGCTCGAGTGAGCAGAGCAAGAGC
 CTGGTGAGCCTCTCGGCGGCCAGCGGCCTGGATGCTCTGCTCCAGAACGAGGAGGTACTGAAGAACCTGCG
 GAAAGTGTCTCTACCTGGAGTGCGGAGAACAGCCTGTGCAGGCAGGAGAACCTGCGGGAGCACTTCCATT
 GCCACGAGGAGCCCTGCCAGGGCAAGATCCTGAGCAAGAAGGACGACATCATCCGGCACCTGAAGTGGCAC
 AAGAAGCGCAAGGAAAGCCTCAAGCTGGGCTTTCGCCGCTTCTCCTCCTCGGACGACTGTGCACCAGCCTA
 CGGAGAGGGTTGCGCCTACAACCTGGAACAGACCCACTACCACTGCGTCTACGAGCACTGTCCCAAGGTGT
 ATGTGAGCACCAGTGACGTCCAGATGCATGCCAATTTCCACCGCAAGGACTCCGAGATCGTGAACGAGGGC
 TTCCGGCGCTTCCGGGCGCACGAGACCTGCCGCATCGAGGATTGCCCTTTTTCGGCAAGAAGATCTCCCA
 CTACCACTGCTGTCTCGGAGGGATGCACCCACACCTTCAAGAACAAGGCCGATATGGACAAGCACAAAACCT
 ACCATCTGAAGGACCACCAGCTGAAGATGGACGGCTTCAAGAAGATCCTGAAGACCGAGGTATGTCCCTTC
 GACGCCTGCAAGTTCTCCACCGTCTGCAACCACATCCACTGCGTCCGCGAGGGCTGCGACTACATCCTGCAC
 TCCAGCAGCCAGATGATCAGCCACAAGAGAAAAGCAGATCGTCAGGACGGAGAGCAGGCGTACCAGCAGT
 TTAAGATCAAGCAGGACGTGGAGGAGTCTCCCTGGATGCCATGCCCCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG
 CAGC--CC-
 ACCAGCCTTAGTCAATCCCAGAGCAGCAGCTCTGTATGCGGCGGCAGCAACACCTCCACTCCACTCTCCTC
 TTTGTCCGCCGAGCACTTCCCTGGCTCGGAAACGCGGCAGGCCACCCAAGAAAATCCAACCTGCCAGCCGACG
 CTCAGCAGTCGGAAGCCAAGCGCCTGAAAGTCAAGACGAGTCTCTAATCCCGCCATGCTCCTGCCCCAG
 TCCCAGCCAGCAGCCGCTGTGCATCCGCTGACAAGTGGACTCTTTCGGGTCTCCTGCCCGCTGCCGCCGCT
 CCTGGAGTGGATCCCACAGCCCCTAACTTCCAGCTCACCCACCTGATGGCCCTTTCAGTTGCAGAATCCC
 CTCTTCTACCAGAACCTCTATCCGGGAATGACCCAGAATTCCTCCATGCTCGGCAACCTGGCAGCACTTAG
 CGCCGCATCGGCAGCAGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCAAATGGAGCCGGAGTCCAGCAGCCGAAGGCAGAGT
 TTAGCTTTAAGCCAGAGTTAAGGAGTAG

ATG: Startcodon; TAG: Stopcodon

-: Verlust von 1 Triplettwiederholung CAG, in frame

Sequenzierung UAScasDel1

ATGCAGAACGAGGAGGTACTGAAGAACCTGCGGAAAGTGTCTCCTACCTGGAGTGCAGAGAACAGCCTGT
 GCAGGCAGGAGAACCTGCGGGAGCACTTCCATTGCCACGAGGAGCCCTGCCAGGGCAAGATCCTGAGCAAG
 AAGGACGACATCATCCGGCACCTGAAGTGGCACAAGAAGCGCAAGGAAAGCCTCAAGCTGGGCTTTGCCCG
 CTTCTCCTCCTCGGACGACTGTGCACCAGCCTACGGAGAGGGTTGCGCCTACAACCTGGAACAGACCCACT
 ACCACTGCGTCTACGAGCACTGTCCCAAGGTGTATGTGAGCACCAGTGACGTCCAGATGCATGCCAATTTTC
 CACCGCAAGGACTCCGAGATCGTGAACGAGGGCTTCCGGCGCTTCCGGGCGCACGAGACCTGCCGCATCGA
 GGATTGCCCTTTTTTCGGCAAGAAGATCTCCCACTACCACTGCTGTGCGGAGGGATGCACCCACACCTTCA
 AGAACAAGGCCGATATGGACAAGCACAAAACCTTACCATCTGAAGGACCACCAGCTGAAGATGGACGGCTT
 CAAGAAGATCCTGAAGACCGAGGTATGTCCCTTCGACGCCTGCAAGTTCTCCACCGTCTGCAACCACATCC
 ACTGCGTCCGCGAGGGCTGCGACTACATCCTGCACTCCAGCAGCCAGATGATCAGCCACAAGAGAAAGCAC
 GATCGTCAGGACGGAGAGCAGGCGTACCAGCAGTTTAAGATCAAGCAGGACGTGGAGGAGTCTCCTCGG
 ATGCCATG-CCC—
 CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCCACCAGCCTTAGTCAATCCCAGAGCAGCAGCTCTGTATGCGG
 CGGCAGCAACACCTCCACTCCACTCTCCTCTTTGTCCGCCGAGCACTTCTGGCTCGGAAACGCGGCAGGCC
 ACCCAAGAAAATCCAACCTGCCAGCCGACGCTCAGCAGTCCGAAGCCAAGCGCCTGAAAGTCAAGACGAGT
 CCTCTAATCCCGCCATGCTCCTGCCCGAGTCCAGCCAGCAGCCGCTGTGCATCCGCTGACAAGTGGACTCT
 TTCCGGTCTCCTGCCCGTGCCGCCGCTCCTGGAGTGGATCCCACAGCCCCTAACTTCCAGCTCACCCACC
 TGATGGCCCTTTCAGTTGCAGAATCCCCTCTTCTACCAGAACCTCTATCCGGGAATGACCCAGAATTC

TCCATGCTCGGCAACCTGGCAGCACTTAGCGCCGCATCGGCAGCAGCGGGCGGGCAGCGGGCGGCAAATGG
AGCCGGAGTCCAGCAGCCGAAGGCAGAGTTTAGCTTTAAGTCAGAGTTTAAGGAGTAG

ATG: Startcodon; TAG: Stopcodon

-: Verlust von 1 Triplettwiederholung CAG, in frame

CCA > TCA: Pro > Ser

Sequenzierung UAScasDel2

ATGTCCAACCAAATGGAGTTTATTATGCAACTCTACATGATGAACTTGATGAAGCAGCAGCAGCAAATGC
AGCTCCAGCTTCCGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCTGGCTGGATACACTTACACACAGAACGAGGATATC
TCTAGCAGCACATCCGTGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCAGGAGCAACTGCAGCAGCCACAGCCAGATCT
CCGCAAGACAAGAACGCACAAGCGCATTAGCTCGCAAAACACCAACTGTAGTAGTAGCCGTAGTTGTAGT
CCCAATAGTAATTTGATTGCTTTTCAACCACAACAATACCCAGGCGCTACAGCGGCAACTCCTTCCACTCC
CAACAGCCACCCCAGCAACCTGGTCAACCAGATGCTGCTCCAAAGCCTGCCGCCGTGACGCAGCTCATGT
TGCAGCAGCAGCAGCAGCAACATTTGCTGACCACCTCCAACCTTCTACTAACACCCACCCACACCCCCAGTT
CGCTGGGCAAGCAGGATCCACTGCAGCATCCGTTGTTGCTGGGCCAGTTTGCCGGCTCCGAACAGATGGCC
ACAAATAACTTCCTTCAATCATCCACAGTGACCTCCACGCCATCGAGAGAGAGAAGGCAGCCACACCAGC
ACCCTCCGCCGAGCAACTGCCGGCAACCTTTCCGGCGGCCAGGTCAAGTTTGAGCAGGAGTCCGCCGACG
ACGATGAGGACGATGATAAGCCGCTGTCCAGCCTCACCAGCTGCAGCTCCTCGGGCCACACCAACGCCAGC
TCCGAGAAGCTGCTGTTGTCCGGCGTCCATCCGCTGGAGTCAACCACCGACAGCCTAGACTCACCCAGCAT
GTATACGCCCGTCAAGCAGCCGGCGGACTCATCGTACGGACTCATCACACCCGTCGACAGTGATCTGACCC
CCAACACACCCCTCCAACCGACCCAAACAATATCCCTGCTGACGCCGCCGTGAGTGAGCAGAGCAAGAGC
CTGGTGAGCCTCTCGGCCGCCAGCGGCCTGGATGCTCTGCTCCAGAACGAGGAGGTAAGAGAGAGCAGG
CGTACCAGCAGTTTAAGATCAAGCAGGACGTGGAGGAGTCTCCTCCCTGGATGCCATG-CCC--
CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCCACCAGCCTTAGTCAATCCCAGAGCAGCAGCTCTGTATGCGG
CGGCAGCAACACCTCCACTCCACTCTCCTCTTTGTCGCCGAGCACTTCTGGCTCGGAAACCGGGCAGGCC
ACCCAAGAAAATCCAAGTCCAGCCGACGCTCAGCAGTCGGAAGCCAAGCGCCTGAAAGTCGAAGACGAGT
CCTCTAATCCCGCCATGCTCCTGCCCCAGTCCAGCCAGCAGCCGCTGTGCATCCGCTGACAAGTGGACTCT
TTCCCGGTCTCCTGCCCGCTGCCGCCCTCCTGGAGTGGATCCACAGCCCTAACTTCCAGCTCACCCACC
TGATGGCCCTCTTCCAGTTGCAGAATCCCCTCTTCTACCAGAACCTCTATCCGGGAATGACCCAGAATTC
TCCATGCTCGGCAACCTGGCAGCACTTAGCGCCGCATCGGCAGCAGCGGGCGGGCAGCGGGCGGCAAATGG
AGCCGGAGTCCAGCAGCCGAAGGCAGAGTTTAGCTTTAAGCCAGAGTTTAAGGAGTAG

ATG: Startcodon; TAG: Stopcodon

-: Verlust von 1 Triplettwiederholung CAG, in frame

Sequenzierung UAScasDel3

ATGTCCAACCAAATGGAGTTTATTATGCAACTCTACATGATGAACTTGATGAAGCAGCAGCAGC
AAATGCAGCTCCAGCTTCCGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCTGGCTGGATACACTTACACACA
GAACGAGGATATCTCTAGCAGCACATCCGTGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCAGGAGCAACTG
CAGCAGCCACAGCCAGATCTCCGCAAGACAAGAACGCACAAGCGCATTAGCTCGCAAAACACCA
ACTGTAGTAGTAGCCGTAGTTGTAGTCCAATAGTAATTTGATTGCTTTTCAACCACAACAATA
CCCAGGCGCTACAGCGGCAACTCCTTCCACTCCCAACAGCCACCCACAGCAACCTGGTCAACCAGA
TACTGCTCCAAGCCTGCCGCCGTGACGCAGCTCATGTTGTAGCAGCAGCAGCAGCAACATTTG
CTGACCACCTCCAACCTTCTACTAACACCCACCCACACCCCCAGTTTCGCTGGGCAAGCAGGATCC
ACTGCAGCATCCGTTGTTGCTGGGCCAGTTTGCCGGCTCCGAACAGATGGCCACAAATAACTTCC
TTCAATCATCCACAGTGACCTCCACGCCATCGAGAGAGAGAAGGCAGCCACACCAGCACCCCTCC

GCCGGAGCAACTGCCGGCAACCTTTCGGCGGCCAGGTCAAGTTTGAGCAGGAGTCCGCCGACG
 ACGATGAGGACGATGATAAGCCGCTGTCCAGCCTCACCAGCTGCAGCTCCTCGGGCCACACCAAC
 GCCAGCTCCGAGAAGCTGCTGTTGTGGGGCTCCATCCGCTGGAGTCAACCACCGACAGCCTAGA
 CTCACCCAGCATGTATACGCCGTCAAGCAGCCGGCGGACTCATCGTACGGACTCATCACACCCG
 TCGACAGTGATCTGACCCCCAACACCCCCCTCCAACCGACCCAAACAATATCCCTGCTGACGCCG
 CCGTCGAGTGAGCAGAGCAAGAGCCTGGTGAGCCTCTCGGGGCCAGCGGCCTGGATGCTCTGC
 TCCAGAACGAGGAGTACTGAAGAACCTGCGGAAAGTGTCTCCTACCTGGAGTGCAGAGAACAG
 CCTGTGCAGGCAGGAGAACCTGCGGGAGCACTTCCATTGCCACGAGGAGCCCTGCCAGGGCAAG
 ATCCTGAGCAAGAAGGACGACATCATCCGGCACCTGAAGTGGCACAAGAAGCGCAAGGAAAGCC
 TCAAGCTGGGCTTTCGCCGCTTCTCCTCCTCGGACGACTGTGCACCAGCCTACGGAGAGGGTTGC
 GCCTACAACCTGGAACAGACCCACTACCACTGCGTCTACGAGCACTGTCCCAAGGTGTATGTGA
 GCACCAGTGACGTCCAGATGCATGCCAATTTCCACCGCAAGGACTCCGAGATCGTGAACGAGGG
 CTTCCGGCGCTTCCGGGCGCACGAGACCTGCCGCATCGAGGATTGCCCTTTTTTCGGCAAGAAGA
 TCTCCCACTACCACTGCTGTGCGGAGGGATGCACCCACACCTTCAAGAACAAGGCCGATATGGAC
 AAGCACAAAACCTACCATCTGAAGGACCACCAGCTGAAGATGGACGGCTTCAAGAAGATCCTGA
 AGACCGAGGTATGTCCCTTCGACGCCTGCAAGTTCTCCACCGTCTGCAACCACATCCACTGCGTC
 CGCGAGGGCTGCGACTACATCCTGCACTCCAGCAGCCAGATGATCAGCCACAAGAGAAAGCAGC
 ATCGTCAGGACGGAGAGCAGGGGTACCAGCAGTTTAAGTAG

ATG: Startcodon; TAG: Stopcodon

GAT > ATA: Met > Ile; CAG > TAG: Glu > Stopcodon

Sequenzierung UAScasNTDel1

ATGCCCAACAGCCACCCAGCAACCTGGTCAACCAGATGCTGCTCCAAAGCCTGCCGCCGCTGACGCAGCT
 CATGTTGCAGCAGCAGCAGCAGCAACATTTGCTGACCACCTCCAACCTTCTACTAACACCCACCCACACCC
 CAGTTCGCTGGGCAAGCAGGATCCACTGCAGCATCCGTTGTTGCTGGGCCAGTTTTGCCGGCTCCGAACAGA
 TGGCCACAAATAAACTTCTTCAATCATCCACAGTGACCTCCACGCCCATCGAGAGAGAGAAGGCAGCCACA
 CCAGCACCCCTCCGCCGAGCAACTGCCGGCAACCTTTCGGCGGCCAGGTCAAGTTTGAGCAGGAGTCCGC
 CGACGACGATGAGGACGATGATAAGCCGCTGTCCAGCCTCACCAGCTGCAGCTCCTCGGGCCACACCAACG
 CCAGCTCCGAGAAGCTGCTGTTGTGGGGCTCCATCCGCTGGAGTCAACCACCGACAGCCTAGACTCACCC
 AGCATGTATACGCCGTCAAGCAGCCGGCGGACTCATCGTACGGACTCATCACACCCGTCGACAGTGATCT
 GACCCCAACACACCCCTCCAACCGACCCAAACAATATCCCTGCTGACGCCGCCGTCGAGTGAGCAGAGCA
 AGAGCCTGGTGAGCCTCTCGGGGCCAGCGGCCTGGATGCTCTGCTCCAGAACGAGGAGGACTGAAGAAC
 CTGCGGAAAGTGTCTCCTACCTGGAGTGCAGGAAACAGCCTGTGCAGGCAGGAGAACCTGCGGGAGCACTT
 CCATTGCCACGAGGAGCCCTGCCAGGGCAAGATCCTGAGCAAGAAGGACGACATCATCCGGCACCTGAAGT
 GGCACAAGAAGCGCAAGGAAAGCCTCAAGCTGGGCTTTCGCCGCTTCTCCTCCTCGGACGACTGTGCACCA
 GCCTACGGAGAGGGTTGCGCCTACAACCTGGAAACGACCCACTACCACTGCGTCTACGAGCACTGTCCCAA
 GGTGTATGTGAGCACCAGTGACGTCCAGATGCATGCCAATTTCCACCGCAAGGACTCCGAGATCGTGAACG
 GGGGCTTCCGGCGCTTCCGGGCGCACGAGACCTGCCGCATCGAGGATTGCCCTTTTTTCGGCAAGAAGATC
 TCCCACTACCACTGCTGTGCGGAGGGATGCACCCACACCTTCAAGAACAAGGCCGATATGGACAAGCACAA
 AACTTACCATCTGAAGGACCACCAGCTGAAGATGGACGGCTTCAAGAAGATCCTGAAGACCGAGGTATGT
 CCCTTCGACGCCTGCAAGTTCTCCACCGTCTGCAACCACATCCACTGCGTCCGCGAGGGCTGCGACTACATC
 CTGCACTCCAGCAGCCAGATGATCAGCCACAAGAGAAAGCAGATCGTCAGGACGGAGAGCAGGCCGTACCA
 GCAGTTTAAGATCAAGCAGGACGTGGAGGAGTCTCCTGGATGCCATGCCCCAGCAGCAGCAGCAGCAGC
 AGCAGCAGC--CC-
 ACCAGCCTTAGTCAATCCCAGAGCAGCAGCTCTGTATGCGGCGGCAGCAACACCTCCACTCCACTCTCCTC
 TTTGTCCGCCGAGCACTTCTGGCTCGGAAACGCGGACAGGCCACCCAAGAAAATCCAACCTGCCAGCCGAGC
 CTCAGCAGTCGGAAGCCAAGCGCCTGAAAGTCGAAGACGAGTCTCTAATCCCGCCATGCTCCTGCCCCAG
 TCCCAGCCAGCAGCCGCTGTGCATCCGCTGACAAGTGGACTCTTCCCGGTCTCCTGCCCGCTGCCGCCGCT

CCCAATAGTAATTTGATTGCTTTTCAACCACAACAATACCCAGGCGCTACAGCGGCAACTCCTTCCACTCC
 CAACAGCCACCCCAGCAACCTGGTCAACCAGATGCTGCTCCAAAGCCTGCCGCCGCTGACGCAGCTCATGT
 TGCAGCAGCAGCAGCAGCAACATTTGCTGACCACCTCCAACCTTCTACTAACACCCACCCACACCCCCAGTT
 CGCTGGGCAAGCAGGATCCACTGCAGCATCCGTTGTTGCTGGGCCAGTTTGCCGGCTCCGAACAGATGGCC
 ACAATAACTTCCTTCAATCATCCACAGTGACCTCCACGCCATCGAGAGAGAGAAGGCAGCCACACCAGC
 ACCCTCCGCCGAGCAACTGCCGGCAACCTTTCCGGCGCCAGGTCAAGTTTGAGCAGGAGTCCGCCGACG
 ACGAAGTGTCTCTACCTGGAGTGCAGAACAGCCTGTGCAGGCAGGAGAACCTGCCGGAGCACTTCCAT
 TGCCACGAGGAGCCCTGCCAGGGCAAGATCCTGAGCAAGAAGGACGACATCATCCGGCACCTGAAGTGGCA
 CAAGAAGCGCAAGGAAAGCCTCAAGCTGGGCTTTGCCCGCTTCTCCTCCTCGGACGACTGTGCACCAGCCT
 ACGGAGAGGGTTGCGCCTACAACCTGAAACAGACCCACTACCACTGCGTCTACGAGCACTGTCCCAAGGTG
 TATGTGAGCACCAGTGACGTCCAGATGCATGCCAATTTCCACCGCAAGGACTCCGAGATCGTGAACGAGGG
 CTTCCGGCGCTTCCGGGCGCACGAGACCTGCCGCATCGAGGATTGCCCTTTTTCCGGCAAGAAGATCTCCC
 ACTACCACTGCTGTGCGGAGGGATGCACCCACACCTTCAAGAACAAGGCCGATATGGACAAGCACAAAAC
 TACCATCTGAAGGACCACCAGCTGAAGATGGACGGCTTCAAGAAGATCCTGAAGACCGAGGTATGTCCCTT
 CGACGCCTGCAAGTTCTCCACCGTCTGCAACCACATCCACTGCGTCCGCGAGGGCTGCGACTACATCTGCA
 CTCCAGCAGCCAGATGATCAGCCACAAGAGAAAGCAGATCGTCAGGACGGAGAGCAGGCGTACCAGCAG
 TTTAAGATCAAGCAGGACGTGGAGGAGTCTCCTGGATGCCATGCCCCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA
 GCAGC--CC-

ACCAGCCTTAGTCAATCCCAGAGCAGCAGCTCTGTATGCGGCGGCAGCAACACCTCCACTCCACTCTCCTC
 TTTGTCCGCCGAGCACTTCTGGCTCGGAAACGCGGCAGGCCACCCAAGAAAATCCAACCTGCCAGCCGACG
 CTCAGCAGTCGGAAGCCAAGCGCCTGAAAGTCGAAGACGAGTCTCTAATCCCGCCATGCTCCTGCCCCAG
 TCCCAGCCAGCAGCCGCTGTGCATCCGCTGACAAGTGGACTCTTTCCCGGTCTCCTGCCCGCTGCCGCCGCT
 CCTGGAGTGGATCCCACAGCCCCTAACTTCCAGCTCACCCACCTGATGGCCCTTCTCCAGTTGCAGAATCCC
 CTCTTCTACCAGAACCTCTATCCGGGAATGACCCAGAATTCTCCATGCTCGGCAACCTGGCAGCACTTAG
 CGCCGCATCGGCAGCAGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCAATGGAGCCGGAGTCCAGCAGCCGAAGGCAGAGT
 TTAGCTTTAAGCCAGAGTTTAAGGAGTAG

ATG: Startcodon; TAG: Stopcodon

-: Verlust von 1 Triplettwiederholung CAG, in frame

Sequenzierung UAScasNTDel1.1

ATGCTCCGCAAGACAAGAACGCACAAGCGCATTAGCTCGCAAAACACCAACTGTAGTAGTAGCCGTAGTT
 GTAGTCCCAATAGTAATTTGATTGCTTTTCAACCACAACAATACCCAGGCGCTACAGCGGCAACTCCTTCC
 ACTCCAACAGCCACCCCAGCAACCTGGTCAACCAGATGCTGCTCCAAAGCCTGCCGCCGCTGACGCAGCTC
 ATGTTGCAGCAGCAGCAGCAGCAACATTTGCTGACCACCTCCAACCTTCTACTAACACCCACCCACACCCCC
 AGTTGCTGCGTGGGCAAGCAGGATCCACTGCAGCATCCGTTGTTGCTGGGCCAGTTTGCCGGCTCCGAACAGAT
 GGCCACAAATAACTTCCTTCAATCATCCACAGTGACCTCCACGCCATCGAGAGAGAGAAGGCAGCCACAC
 CAGCACCTCCGCCGAGCAACTGCCGGCAACCTTTCCGGCGCCAGGTCAAGTTTGAGCAGGAGTCCGCC
 GACGACGATGAGGACGATGATAAGCCGCTGTCCAGCCTCACCAGCTGCAGCTCCTCGGGCCACACCAACGC
 CAGCTCCGAGAAGCTGCTGTTGTGCGGGCTCCATCCGCTGGAGTCAACCACCGACAGCCTAGACTCACCCA
 GCATGTATACGCCCGTCAAGCAGCCGGCGGACTCATCGTACGGACTCATCACACCCGTCGACAGTGATCTG
 ACCCCAACACACCCCTCCAACCGACCCAAACAATATCCCTGCTGACGCCCGCTGAGTGAGCAGAGCAA
 GAGCCTGGTGAGCCTCTCGGCGGCCAGCGCCTGGATGCTCTGCTCCAGAACGAGGAGGTAAGGAACC
 TGCGGAAAGTGTCTCCTACCTGGAGTGCAGAACAGCCTGTGCAGGCAGGAGAACCTGCCGGGAGCACTTC
 CATTGCCACGAGGAGCCCTGCCAGGGCAAGATCCTGAGCAAGAAGGACGACATCATCCGGCACCTGAAGTG
 GCACAAGAAGCGCAAGGAAAGCCTCAAGCTGGGCTTTGCCCGCTTCTCCTCCTCGGACGACTGTGCACCAG
 CCTACGGAGAGGGTTGCGCCTACAACCTGAAACAGACCCACTACCACTGCGTCTACGAGCACTGTCCAAG
 GTGTATGTGAGCACCAGTGACGTCCAGATGCATGCCAATTTCCACCGCAAGGACTCCGAGATCGTGAACGA
 GGGCTTCCGGCGCTTCCGGGCGCACGAGACCTGCCGCATCGAGGATTGCCCTTTTTCCGGCAAGAAGATCT
 CCCACTACCACTGCTGTGCGGAGGGATGCACCCACACCTTCAAGAACAAGGCCGATATGGACAAGCACAAA
 ACTTACCATCTGAAGGACCACCAGCTGAAGATGGACGGCTTCAAGAAGATCCTGAAGACCGAGGTATGTC

CCTTCGACGCCTGCAAGTTCTCCACCGTCTGCAACCACATCCACTGCGTCCGCGAGGGGTGCGACTACATCC
 TGCACTCCAGCAGCCAGATGATCAGCCACAAGAGAAAAGCACGATCGTCAGGACGGAGAGCAGGCGTACCA
 GCAGTTTAAGATCAAGCAGGACGTGGAGGAGTCTCCCTGGATGCCATGCCCCAGCAGCAGCAGCAGCAGC
 AGCAGCAGC--CC-

ACCAGCCTTAGTCAATCCCAGAGCAGCAGCTCTGTATGCGGGCGGCAGCAACACCTCCACTCCACTCTCCTC
 TTTGTCCGCCGAGCACTTCTGGCTCGGAAACGCGGCAGGCCACCCAAGAAAATCCAAGTCCAGCCGAGC
 CTCAGCAGTCGGAAGCCAAGCGCCTGAAAGTCGAAGACGAGTCTCTAATCCCGCCATGCTCCTGCCCCAG
 TCCCAGCCAGCAGCCGCTGTGCATCCGCTGACAAGTGGACTCTTTCCCGGTCTCCTGCCCGCTGCCGCCGCT
 CCTGGAGTGGATCCCACAGCCCCTAACTTCCAGCTCACCCACCTGATGGCCCTCTTCCAGTTGCAGAATCCC
 CTCTTCTACCAGAACCTCTATCCGGGAATGACCCAGAATTCTCCATGCTCGGCAACCTGGCAGCACTTAG
 CGCCGCATCGGCAGCAGCGGGCGGCAGCGGGCGCAAATGGAGCCGGAGTCCAGCAGCCGAAGGCAGAGT
 TTAGCTTTAAGCCAGAGTTAAGGAGTAG

ATG: Startcodon; TAG: Stopcodon

-: Verlust von 1 Triplettwiederholung CAG, in frame

Sequenzierung UAScasNTDel1.3

ATGTCCAACCAAATGGAGTTTATTATGCAACTCTACATGATGAACTTGATGAAGCAGCAGCAGCAAATGC
AGCTCCAGCTTCCGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCTGGCTGGATACACTTACACACAGAACGAGGATATC
TCTAGCAGCACATCCGTGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCAGGAGCAACTGCAGCAGCCACAGCCAGATCT
CCGCAAGACAAGAAGCACAAGCGCATTAGCTCGCAAAACACCAACTGTAGTAGTAGCCGTAGTTGTAGT
CCCAATAGTAATTTGATTGCTTTTCAACCACAACAATACCCAGGGCGCTACAGCGGCAACTCCTTCCACTCC
CAACAGCCACCCCAGCAACCTGGTCAACCAGATGCTGCTCAAAGCCTGCCGCCGCTGACGCAGGCAGCCA
CACCAGCACCTCCGCCGAGCAACTGCCGGCAACCTTTCGGCGGCCAGGTCAAGTTTGAGCAGGAGTCC
GCCGACGACGATGAGGACGATGATAAGCCGCTGTCCAGCCTCACAGCTGCAGCTCCTCGGGCCACACCAA
CGCCAGCTCCGAGAAGCTGCTGTTGTGGGGCTCCATCCGCTGGAGTCAACCACCGACAGCCTAGACTCAC
CCAGCATGTATACGCCCGTCAAGCAGCCGGCGGACTCATCGTACGGACTCATCACACCCGTCGACAGTGAT
CTGACCCCCAACACACCCCTCCAACCGACCCAAACAATATCCCTGCTGACGCCGCCGTCGAGTGAGCAGAG
CAAGAGCCTGGTGAGCCTCTCGGGCGCCAGCGGCCTGGATGCTCTGCTCCAGAACGAGGAGGTAAGTGAAGA
ACCTGCGGAAAGTGTCCTCCTACCTGGAGTGCAGGAAACAGCCTGTGCAGGCAGGAGAACCTGCGGGAGCAC
TTCCATTGCCACGAGGAGCCCTGCCAGGGCAAGATCCTGAGCAAGAAGGACGACATCATCCGGCACCTGAA
GTGGCACAAGAAGCGCAAGGAAAGCCTCAAGCTGGGCTTTGCCCCGCTTCTCCTCCTCGGACGACTGTGCAC
CAGCCTACGGAGAGGGTTGCGCCTACAACCTGGAACAGACCCACTACCACTGCGTCTACGAGCACTGTCCC
AAGGTGTATGTGAGCACCAGTGACGTCCAGATGCATGCCAATTTCCACCGCAAGGACTCCGAGATCGTGAA
CGAGGGCTTCCGGCGCTTCCGGGCGCACGAGACCTGCCGCATCGAGGATTGCCCTTTTTCCGGCAAGAAGA
TCTCCACTACCCTGCTGTGCGGAGGGATGCACCCACACCTTCAAGAACAAGGCCGATATGGACAAGCAC
AAAACCTTACCATCTGAAGGACCACCAGCTGAAGATGGACGGCTTCAAGAAGATCCTGAAGACCGAGGTAT
GTCCCTTCGACGCCTGCAAGTTCTCCACCGTCTGCAACCACATCCACTGCGTCCGCGAGGGCTGCGACTACA
TCCTGCACTCCAGCAGCCAGATGATCAGCCACAAGAGAAAAGCACGATCGTCAGGACGGAGAGCAGGCGTAC
CAGCAGTTTAAGATCAAGCAGGACGTGGAGGAGTCTCCCTGGATGCCATGCCCCAGCAGCAGCAGCAGCA
GCAGCAGCAGC--CC-

ACCAGCCTTAGTCAATCCCAGAGCAGCAGCTCTGTATGCGGGCGGCAGCAACACCTCCACTCCACTCTCCTC
 TTTGTCCGCCGAGCACTTCTGGCTCGGAAACGCGGCAGGCCACCCAAGAAAATCCAAGTCCAGCCGAGC
 CTCAGCAGTCGGAAGCCAAGCGCCTGAAAGTCGAAGACGAGTCTCTAATCCCGCCATGCTCCTGCCCCAG
 TCCCAGCCAGCAGCCGCTGTGCATCCGCTGACAAGTGGACTCTTTCCCGGTCTCCTGCCCGCTGCCGCCGCT
 CCTGGAGTGGATCCCACAGCCCCTAACTTCCAGCTCACCCACCTGATGGCCCTCTTCCAGTTGCAGAATCCC
 CTCTTCTACCAGAACCTCTATCCGGGAATGACCCAGAATTCTCCATGCTCGGCAACCTGGCAGCACTTAG
 CGCCGCATCGGCAGCAGCGGGCGGCAGCGGGCGCAAATGGAGCCGGAGTCCAGCAGCCGAAGGCAGAGT
 TTAGCTTTAAGCCAGAGTTAAGGAGTAG

ATG: Startcodon; TAG: Stopcodon

-: Verlust von 1 Triplettwiederholung CAG, in frame

Sequenzierung UAScasNTDel1.4

ATGTCCAACCAAATGGAGTTTATTATGCAACTCTACATGATGAACTTGATGAAGCAGCAGCAGCAAATGC
 AGCTCCAGCTTCCGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCTGGCTGGATACACTTACACACAGAACGAGGATATC
 TCTAGCAGCACATCCGTGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCAGGAGCAACTGCAGCAGCCACAGCCAGATCT
 CCGCAAGACAAGAACGCACAAGCGCATTAGCTCGCAAAACACCAACTGTAGTAGTAGCCGTAGTTGTAGT
 CCCAATAGTAATTTGATTGCTTTTCAACCACAACAATACCCAGGGCTACAGCGGCAACTCCTTCCACTCC
 CAACAGCCACCCCAGCAACCTGGTCAACCAGATGCTGCTCCAAAGCCTGCCGCCGTGACGCAGCTCATGT
 TGCAGCAGCAGCAGCAGCAACATTTGCTGACCACCTCCAACCTTCTACTAACACCCACCCACACCCCCAGTT
 CGCTGGGCAAGCAGGATCCACTGCAGCATCCGTTGTTGCTGGGCCAGTTTGCCGGCTCCGAACAGATGGCC
 ACAAATAACTTCCTTCAATCATCCACAGTGACCTCCATGCCCATCGAGAGAGAGAAGAGCCTAGACTCACC
 CAGCATGTATACGCCCGTCAAGCAGCCGGCGGACTCATCGTACGGACTCATCACACCCGTCGACAGTGATC
 TGACCCCCAACACACCCCTCCAACCGACCCAAACAATATCCCTGCTGACGCCGCCGTGAGTGAGCAGAGC
 AAGAGCCTGGTGAGCCTCTCGGCCGCCAGCGGCCTGGATGCTCTGCTCCAGAACGAGGAGGTAAGAA
 CCTGCGGAAAGTGTCTCTACCTGGAGTGCGAGAACAGCCTGTGCAGGCAGGAGAACCTGCGGGAGCACT
 TCCATTGCCACGAGGAGCCCTGCCAGGGCAAGATCCTGAGCAAGAAGGACGACATCATCCGGCACCTGAAG
 TGGCACAAGAAGCGCAAGGAAAGCCTCAAGCTGGGCTTTGCCCGCTTCTCCTCCTCGGACGACTGTGCACC
 AGCCTACGGAGAGGGTTGCGCCTACAACCTGGAAACAGACCCACTACCACTGCGTCTACGAGCACTGTCCCA
 AGGTGTATGTGAGCACCAGTGACGTCCAGATGCATGCCAATTTCCACCGCAAGGACTCCGAGATCGTGAAC
 GAGGGCTTCCGGCGCTTCCGGGCGCACGAGACCTGCCGCATCGAGGATTGCCCTTTTTCCGGCAAGAAGAT
 CTCCCCTACTGCTGTGCGGAGGGATGCACCCACACCTTCAAGAACAAGGCCGATATGGACAAGCACA
 AAATTACCATCTGAAGGACCACCAGCTGAAGATGGACGGCTTCAAGAAGATCCTGAAGACCGAGGTATG
 TCCCTTCGACGCCTGCAAGTTCTCCACCGTCTGCAACCACATCCACTGCGTCCGCGAGGGCTGCGACTACAT
 CCTGCACTCCAGCAGCCAGATGATCAGCCACAAGAGAAAGCAGCATCGTCAAGGACGGAGAGCAGGCGTACC
 AGCAGTTTAAGATCAAGCAGGACGTGGAGGAGTCTCCCTGGATGCCATGCCCCAGCAGCAGCAGCAGCAG
 CAGCAGCAGC--CC-

ACCAGCCTTAGTCAATCCAGAGCAGCAGCTCTGTATGCGGCGGCAGCAACACCTCCACTCCACTCTCCTC
 TTTGTCCGCCGAGCACTTCTGGCTCGGAAACGCGGCAGGCCACCCAAGAAAATCCAAGTCCAGCCGACG
 CTCAGCAGTCGGAAGCCAAGCGCCTGAAAGTCGAAGACGAGTCTCTAATCCCGCCATGCTCCTGCCCCAG
 TCCCAGCCAGCAGCCGCTGTGCATCCGCTGACAAGTGGACTCTTTCCCGTCTCCTGCCCGCTGCCGCCGCT
 CCTGGAGTGGATCCCACAGCCCCTAACTTCCAGCTCACCCACCTGATGGCCCTCTTCCAGTTGCAGAAATCC
 CTCTTCTACCAGAACCTCTATCCGGGAATGACCCAGAATTCCTCCATGCTCGGCAACCTGGCAGCACTTAG
 CGCCGCATCGGCAGCAGCGCGCGGCAGCGCGGCAATGGAGCCGGAGTCCAGCAGCCGAAGGCAGAGT
 TTAGCTTTAAGCCAGAGTTTAAGGAGTAG

ATG: Startcodon; TAG: Stopcodon

-: Verlust von 1 Triplettwiederholung CAG, in frame

ACG > ATG: Thr > Met

Sequenzierung UAScasNTDel1.5

ATGTCCAACCAAATGGAGTTTATTATGCAACTCTACATGATGAACTTGATGAAGCAGCAGCAGCAAATGC
 AGCTCCAGCTTCCGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCTGGCTGGATACACTTACACACAGAACGAGGATATC
 TCTAGCAGCACATCCGTGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCAGGAGCAACTGCAGCAGCCACAGCCAGATCT
 CCGCAAGACAAGAACGCACAAGCGCATTAGCTCGCAAAACACCAACTGTAGTAGTAGCCGTAGTTGTAGT
 CCCAATAGTAATTTGATTGCTTTTCAACCACAACAATACCCAGGGCTACAGCGGCAACTCCTTCCACTCC
 CAACAGCCACCCCAGCAACCTGGTCAACCAGATGCTGCTCCAAAGCCTGCCGCCGTGACGCAGCTCATGT
 TGCAGCAGCAGCAGCAGCAACATTTGCTGACCACCTCCAACCTTCTACTAACACCCACCCACACCCCCAGTT

CGCTGGGCAAGCAGGATCCACTGCAGCATCCGTTGTTGCTGGGCCAGTTTGCCGGCTCCGAACAGATGGCC
 ACAAATAACTTCCTTCAATCATCCACAGTGACCTCCACGCCATCGAGAGAGAGAAGGCAGCCACACCAGC
 ACCCTCCGCCGGAGCAACTGCCGGCAACCTTTCGGCGGCCAGGTCAAGTTTGAGCAGGAGTCCGCCGACG
 ACGATGAGGACGATGATAAGCCGCTGTCCAGCCTCACCAGCTGCAGCTCCTCGGGCCACACCAACGCCAGC
 TCCGAGAAGCTGCTGTTGTCCGGCGTCCATCCGCTGGAGTCAACCACCGACCAGAACGAGGAGGTA^CCTGA
 AGAACCTGCGGAAAGTGTCTCTACCTGGAGTGCGAGAACAGCCTGTGCAGGCAGGAGAACCTGCGGGA
 GCACTTCCATTGCCACGAGGAGCCCTGCCAGGGCAAGATCCTGAGCAAGAAGGACGACATCATCCGGCACC
 TGAAGTGGCACAAGAAGCGCAAGGAAAGCCTCAAGCTGGGCTTTCGCCGCTTCTCTCTCGGACGACTGT
 GCACCAGCCTACGGAGAGGGTTGCGCCTACAACCTGGAAAACAGACCCACTACCACTGCGTCTACGAGCACTG
 TCCAAGGTGTATGTGAGCACCAGTGACGTCCAGATGCATGCCAATTTCCACCGCAAGGACTCCGAGATCG
 TGAACGAGGGCTTCCGGCGCTTCCGGGCGCACGAGACCTGCCGCATCGAGGATTGCCCTTTTTCCGGCAAG
 AAGATCTCCCACTACCACTGCTGTCCGAGGGATGCACCCACACCTTCAAGAACAAGGCCGATATGGACAA
 GCACAAAACCTTACCATCTGAAGGACCACCAGCTGAAGATGGACGGCTTCAAGAAGATCCTGAAGACCGAG
 GTATGTCCCTTCGACGCCTGCAAGTTCTCCACCGTCTGCAACCACATCCACTGCGTCCGCGAGGGCTGCGAC
 TACATCCTGCACTCCAGCAGCCAGATGATCAGCCACAAGAGAAAAGCAGATCGTCAGGACGGAGAGCAGGC
 GTACCAGCAGTTTAAGATCAAGCAGGACGTGGAGGAGTCTCCCTGGATGCCATGCC⁻⁻⁻
 CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCCACCAGCCTTAGTCAATCCCAGAGCAGCAGCTCTGTATGCGG
 GGCAGCAACACCTCCACTCCACTCTCTCTTTGTCCGCGGAGCACTTCTTGCTCGGAAACGCGGCAGGCCA
 CCCAAGAAAATCCAACCTGCCAGCCGACGCTCAGCAGTCGGAAGCCAAGCGCCTGAAAGTCGAAGACGAGTC
 CTCTAATCCCGCCATGCTCTGCCCCAGTCCCAGCCAGCAGCCGCTGTGCATCCGCTGACAAGTGGACTCTT
 TCCCGGTCTCTGCCCGCTGCCCGCTCCTGGAGTGGATCCCACAGCCCCTAACTTCCAGCTCACCCACCT
 GATGGCCCTCTTCCAGTTGCAGAATCCCCTCTTCTACCAGAACCTCTATCCGGGAATGACCCAGAATTCCT
 CCATGCTCGGCAACCTGGCAGCACTTAGCGCCGCATCGGCAGCAGCGGCGGGCAGCGGGCGGCAATGGA
 GCCGGAGTCCAGCAGCCGAAGGCAGAGTTAGCTTTAAGCCAGAGTTAAGGAGTAG

ATG: Startcodon; TAG: Stopcodon

-: Verlust von 1 Triplettwiederholung CAG, in frame

^C: zusätzliches Cytosin

Sequenzierung UAScasDelZipcode

ATGTCCAACCAATGGAGTTTATTATGCAACTCTACATGATGAACTTGATGAAGCAGCAGCAGCAAATGC
 AGCTCCAGCTTCCGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCTGGCTGGATACACTTACACACAGAACGAGGATATC
 TCTAGCAGCACATCCGTGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCAGGAGCAACTGCAGCAGCCACAGCCAGATCT
 CCGCAAGACAAGAACGCACAAGCGCATTAGCTCGCAAAAACCAACTGTAGTAGTAGCCGTAGTTGTAGT
 CCCAATAGTAATTTGATTGCTTTTCAACCACAACAATACCCAGGCGCTACAGCGGCAACTCCTTCCACTCC
 CAACAGCCACCCAGCAACCTGGTCAACCAGATGCTGCTCCAAAGCCTGCCGCCGCTGACGCAGCTCATGT
 TGCAGCAGCAGCAGCAGCAACATTTGCTGACCACCTCCAACCTTCTACTAACACCCACCCACACCCCACT
 CGCTGGGCAAGCAGGATCCACTGCAGCATCCGTTGTTGCTGGGCCAGTTTGCCGGCTCCGAACAGATGGCC
 ACAAATAACTTCCTTCAATCATCCACAGTGACCTCCACGCCATCGAGAGAGAGAAGGCAGCCACACCAGC
 ACCCTCCGCCGGAGCAACTGCCGGCAACCTTTCGGCGGCCAGGTCAAGTTTGAGCAGGAGTCCGCCGACG
 ACGATGAGGACGATGATAAGCCGCTGTCCAGCCTCACCAGCTGCAGCTCCTCGGGCCACACCAACGCCAGC
 TCCGAGAAGCTGCTGTTGTCCGGCGTCCATCCGCTGGAGTCAACCACCGACAGCCTAGACTCACCCAGCAT
 GTATACGCCCGTCAAGCAGCCGCTCCAACCGACCCAAACAATATCCCTGCTGACGCCGCCGTCGAGTGAGC
 AGAGCAAGAGCCTGGTGAGCCTCTCGGCGGCCAGCGGCCTGGATGCTCTGCTCCAGAACGAGGAGGTA^CCTG
 AAGAACCTGCGGAA-
 GTGTCCTCTACCTGGAGTGCGAGAACAGCCTGTGCAGGCAGGAGAACCTGCGGGAGCACTTCCATTGCCA
 CGAGGAGCCCTGCCAGGGCAAGATCCTGAGCAAGAAGGACGACATCATCCGGCACCTGAAGTGGCACAAG
 AAGCGCAAGGAAAGCCTCAAGCTGGGCTTTCGCCGCTTCTCTCTCGGACGACTGTGCACCAGCCTACGG
 AGAGGGTTGCGCCTACAACCTGGAAAACAGACCCACTACCACTGCGTCTACGAGCACTGTCCCAAGGTGTATG
 TGAGCACCAGTGACGTCCAGATGCATGCCAATTTCCACCGCAAGGACTCCGAGATCGTGAACGAGGGCTTC

CGGCGCTTCCGGGCGCACGAGACCTGCCGCATCGAGGATTGCCCTTTTTTCGGCAAGAAGATCTCCCCTA
 CCACTGCTGTGCGGAGGGATGCACCCACACCTTCAAGAACAAGGCCGATATGGACAAGCACAAAACCTTACC
 ATCTGAAGGACCACCAGCTGAAGATGGACGGCTTCAAGAAGATCCTGAAGACCGAGGTATGTCCCTTCGA
 CGCCTGCAAGTTCTCCACCGTCTGCAACCACATCCACTGCGTCCGCGAGGGCTGCGACTACATCCTGCACTC
 CAGCAGCCAGATGATCAGCCACAAGAGAAAGCACGATCGTCAGGACGGAGAGCAGGCGTACCAGCAGTTT
 AAGATCAAGCAGGACGTGGAGGAGTCTCCTGGATGCCATGCCCCA--A-
 CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCCACCAGCCTTAGTCAATCCCAGAGCAGCAGCTCTGTATGCGGCGG
 CAGCAACACCTCCACTCCACTCTCCTCTTTGTCCGCGGAGCACTTCTGGCTCGGAAACGCGGCAGGCCACC
 CAAGAAAATCCAATGCCAGCCGACGCTCAGCAGTCGGAAGCCAAGCGCCTGAAAAGTCGAAGACGAGTCCT
 CTAATCCCGCCATGCTCCTGCCCCAGTCCCAGCCAGCAGCCGCTGTGCATCCGCTGACAAGTGGACTCTTTC
 CCGGTCTCCTGCCCGCTGCCGCCGCTCCTGGAGTGGATCCCACAGCCCCTAACTTCCAGCTCACCCACCTGA
 TGGCCCTCTCCAGTTGCAGAATCCCCTCTTCTACCAGAACCTCTATCCGGGAATGACCCAGAATTCCTCC
 ATGCTCGGCAACCTGGCAGCACTTAGCGCCGCATCGGCAGCAGCGGCGGGCAGCGGGCAAATGGAGC
 CGGAGTCCAGCAGCCGAAGGCAGAGTTTAGCTTTAAGCCAGAGTTAAGGAGTAG

ATG: Startcodon; TAG: Stopcodon

-: Verlust von 1 Triplettwiederholung CAG, in frame

-: Verlust von 1 Adenosin

Sequenzierung UAScasAtZipcode

ATGTCCAACCAATGGAGTTTATTATGCAACTCTACATGATGAACTTGATGAAGCAGCAGCAGCAAATGC
 AGCTCCAGCTTCCGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCTGGCTGGATACTTACACACAGAACGAGGATATC
 TCTAGCAGCACATCCGTGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCAGGAGCAACTGCAGCAGCCACAGCCAGATCT
 CCGCAAGACAAGAACGCACAAGCGCATTAGCTCGCAAAACACCAACTGTAGTAGTAGCCGTAGTTGTAGT
 CCCAATAGTAATTTGATTGCTTTTCAACCACAACAATACCCAGGCGCTACAGCGGCAACTCCTTCCACTCC
 CAACAGCCACCCCAGCAACCTGGTCAACCAGATGCTGCTCAAAGCCTGCCGCCGCTGACGCAGCTCATGT
 TGCAGCAGCAGCAGCAGCAACATTTGCTGACCACCTCCAACCTTCTACTAACACCCACCCACACCCCCAGTT
 CGCTGGGCAAGCAGGATCCACTGCAGCATCCGTTGTTGCTGGGCCAGTTTGCCGGCTCCGAACAGATGGCC
 ACAAATAACTTCTTCAATCATCCACAGTGACCTCCACGCCATCGAGAGAGAGAAGGCAGCCACACCAGC
 ACCCTCCGCCGAGCAACTGCCGGCAACCTTTCCGGCGCCAGGTCAAGTTTGAGCAGGAGTCCGCCGACG
 ACGATGAGGACGATGATAAGCCGCTGTCCAGCCTCACCAGCTGCAGCTCCTCGGGCCACACCAACGCCAGC
 TCCGAGAAGCTGCTGTTGTCCGGCGTCCATCCGCTGGAGTCAACCACCGACAGCCTAGACTCACCCAGCAT
 GTATACGCCCGTCAAGCAGCCGGCGGATTTCATCGTATGGTCTGATCACTCCGGTGCAGAGTATGACCC
 CCAACTCCCCTCCAACCGACCCAAACAATATCCCTGCTGACGCCGCGTGCAGTGAGCAGAGCAAGAGC
 CTGGTGAGCCTCTCGGCGGCCAGCGCCTGGATGCTCTGCTCCAGAACGAGGAGGTAAGTGAAGAACCTGCG
 GAAAGTGTCTCTACCTGGAGTGCAGAGAAGCCTGTGCAGGCAGGAGAACCTGCGGGAGCACTTCCATT
 GCCACGAGGAGCCCTGCCAGGGCAAGATCCTGAGCAAGAAGGACGACATCATCCGGCACCTGAAGTGGCAC
 AAGAAGCGCAAGGAAAGCCTCAAGCTGGGCTTTGCCCGCTTCTCCTCCTCGGACGACTGTGCACCAGCCTA
 CGGAGAGGGTTGCGCCTACAACCTGGAAAACAGACCCACTACCACTGCGTCTACGAGCACTGTCCCAAGGTGT
 ATGTGAGCACCAGTGACGTCCAGATGCATGCCAATTTCCACCGCAAGGACTCCGAGATCGTGAACGAGGGC
 TTCCGGCGCTTCCGGGCGCACGAGACCTGCCGCATCGAGGATTGCCCTTTTTTCGGCAAGAAGATCTCCCA
 CTACCACTGCTGTGCGGAGGGATGCACCCACACCTTCAAGAACAAGGCCGATATGGACAAGCACAAAACCTT
 ACCATCTGAAGGACCACCAGCTGAAGATGGACGGCTTCAAGAAGATCCTGAAGACCGAGGTATGTCCCTTC
 GACGCCTGCAAGTTCTCCACCGTCTGCAACCACATCCACTGCGTCCGCGAGGGCTGCGACTACATCCTGCAC
 TCCAGCAGCCAGATGATCAGCCACAAGAGAAAGCACGATCGTCAGGACGGAGAGCAGGCGTACCAGCAGT
 TTAAGATCAAGCAGGACGTGGAGGAGTCTCCTGGATGCCATGCC---
 CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCCACCAGCCTTAGTCAATCCCAGAGCAGCAGCTCTGTATGCGG
 CGGCAGCAACACCTCCACTCCACTCTCCTCTTTGTCCGCCGAGCACTTCTGGCTCGGAAACGCGGCAGGCC
 ACCCAAGAAAATCCAATGCCAGCCGACGCTCAGCAGTCGGAAGCCAAGCGCCTGAAAAGTCGAAGACGAGT
 CCTCTAATCCCGCCATGCTCCTGCCCCAGTCCCAGCCAGCAGCCGCTGTGCATCCGCTGACAAGTGGACTCT

TTCCCGGTCTCCTGCCCGCTGCCGCCGCTCCTGGAGTGGATCCCACAGCCCCTAACTTCCAGCTCACCCACC
 TGATGGCCCTCTTCCAGTTGCAGAATCCCCTCTTCTACCAGAACCTCTATCCGGGAATGACCCAGAATTCC
 TCCATGCTCGGCAACCTGGCAGCACTTAGCGCCGCATCGGCAGCAGCGGCCGGCAGCGGCCGCAATGG
 AGCCGGAGTCCAGCAGCCGAAGGCAGAGTTTAGCTTTAAGCCAGAGTTTAAGGAGTAG

ATG: Startcodon; TAG: Stopcodon

-: Verlust von 1 Triplettwiederholung CAG, in frame

Sequenzierung 1kbGFP in pUASTattB

ATGTCCAACCAAATGGAGTTTATTATGCAACTCTACATGATGAACTTGATGAAGCAGCAGCAGCAAATGC
 AGCTCCAGCTTCCGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCTGGCTGGATACACTTACACACAGAACGAGGATATC
 TCTAGCAGCACATCCGTGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCAGGAGCAACTGCAGCAGCCACAGCCAGATCT
 CCGCAAGACAAGAACGCACAAGCGCATTAGCTCGAAAAACCAACTGTAGTAGTAGCCGTAGTTGTAGT
 CCCAATAGTAATTTGATTGCTTTTCAACCACAACAATACCCAGGCGCTACAGCGGCAACTCCTTCCACTCC
 CAACAGCCACCCAGCAACCTGGTCAACCAGATGCTGCTCAAAGCCTGCCGCCGCTGACGCAGCTCATGT
 TGCAGCAGCAGCAGCAGCAACATTTGCTGACCACCTCCAACCTTCTACTAACACCCACCCACACCCCAAGT
 CGCTGGGCAAGCAGGATCCACTGCAGCATCCGTTGTTGCTGGGCCAGTTTGCCGGCTCCGAACAGATGGCC
 ACAATAAATTCCTTCAATCATCCACAGTGACCTCCACGCCATCGAGAGAGAGAAGGCAGCCACACCAGC
 ACCCTCCGCCGAGCAACTGCCGGCAACCTTTCCGGCGGCCAGGTCAAGTTTGAGCAGGAGTCCGCCGACG
 ACGATGAGGACGATGATAAGCCGCTGTCCAGCCTCACCAGCTGCAGCTCCTCGGGCCACACCAACGCCAGC
 TCCGAGAAGCTGCTGTTGTCGGGCGTCCATCCGCTGGAGTCAACCACCGACAGCCTAGACTCACCCAGCAT
 GTATACGCCCGTCAAGCAGCCGGCGGACTCATCGTACGGACTCATCACACCCGTCGACAGTGATCTGACCC
 CCAACACACCCCTCCAACCGACCCAAACAATATCCCTGCTGACGCCGCCGTCGAGTGAGCAGAGCAAGAGC
 CTGGTGAGCCTCTCGGCCGCCAGCGCCTGGATGCTCTGCTCagcatgaagcagcagcacttcttcaagtccgcatgcc
 gaaggctacgtccaggagcgcaccatcttctcaaggacgacggcaactacaagaccgcgccgaggtgaagttcgagggcgacacctggg
 aaccgcatcgagctgaagggcatcgacttcaaggaggacggcaactctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctat
 atcatggcgcagaagcagaagaacggcatcaaggtgaactcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccgaccacta
 ccagcagaacacccccatcgcgacggccccgtgctgctgcccacaaccactactgagcaccagtcgacctgagcaagacccaacga
 gaagcgcatcatgctgctgagttcgtgaccgcccgggatcactctcgcatggacgagctgtacaagagcagccacagaaggca
 tcgccagccttaggagccgaatcgagccgaagtcgcagcagtgaaacgaaacggtcaacggagccgaagtcgcagcagtgaaacgaa
 gacgctaaccttagaggatcttgaagg...

ATG: Startcodon; agc: 3-basige Linkersequenz; atg: nGFP; cct: Vektorsequenz pUAST(attB) +
 svpII::nGFP

Sequenzierung Austausch CG1 in pUASTattB

ATGTCCAACCAAATGGAGTTTATTATGCAACTCTACATGATGAACTTGATGAAGCAGCAGCAGCAAATGC
 AGCTCCAGCTTCCGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCTGGCTGGATACACTTACACACAGAACGAGGATATC
 TCTAGCAGCACATCCGTGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCAGGAGCAACTGCAGCAGCCACAGCCAGATCT
 CCGCAAGACAAGAACGCACAAGCGCATTAGCTCGAAAAACCAACTGTAGTAGTAGCCGTAGTTGTAGT
 CCCAATAGTAATTTGATTGCTTTTCAACCACAACAATACCCAGGCGCTACAGCGGCAACTCCTTCCACTCC
 CAACAGCCACCCAGCAACCTGGTCAACCAGATGCTGCTCAAAGCCTGCCGCCGCTGACGCAGCAGATAA
 AATCAAACGCTGCACAGGAGTTGAATTGAGTGAGAGTCCCGACTGGCCCAATCGCATCTGCACCAGCTGCG
 CCCTGCTGCTCAGAGCTGCCCTCAAACCTCAGATCCCTTTGCCAGCAGACGGAGAAGGATCTGAAGGAGCAG
 AAGCTGCAGGAGATAAACATAGAGATTGTTACAGATGAGCAGGAGACGAAGAAGAAAAAGCAGCCACACCA
 GCACCCTCCGCCGAGCAACTGCCGGCAACCTTTCCGGCGGCCAGGTCAAGTTTGAGCAGGAGTCCGCCGA
 CGACGATGAGGACGATGATAAGCCGCTGTCCAGCCTCACCAGCTGCAGCTCCTCGGGCCACACCAACGCCA
 GCTCCGAGAAGCTGCTGTTGTCGGGCGTCCATCCGCTGGAGTCAACCACCGACAGCCTAGACTCACCCAGC
 ATGTATACGCCCGTCAAGCAGCCGGCGGACTCATCGTACGGACTCATCACACCCGTCGACAGTGATCTGAC
 CCCCACACACCC...

ATG: Startcodon; CAG: Ausgetauschte Sequenzen in der 1kb Retentionssequenz

Sequenzierung Austausch CG2 in pUASTattB

ATGTCCAACCAAATGGAGTTTATTATGCAACTCTACATGATGAACTTGATGAAGCAGCAGCAGCAAATGC
 AGCTCCAGCTTCCGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCTGGCTGGATACACTTACACACAGAACGAGGATATC
 TCTAGCAGCACATCCGTGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCAGGAGCAACTGCAGCAGCCACAGCCAGATCT
 CCGCAAGACAAGAACGCACAAGCGCATTAGCTCGCAAAACACCAACTGTAGTAGTAGCCGTAGTTGTAGT
 CCCAATAGTAATTTGATTGCTTTTCAACCACAACAATACCCAGGCGCTACAGCGGCAACTCCTTCCACTCC
 CAACAGCCACCCCAGCAACCTGGTCAACCAGATGCTGCTCCAAAGCCTGCCGCCGTGACGCAGGAATCAA
 GAGACCTGTCCAAGAATGAGGCTACCGGTAGCGACAGCGAGTTGGAGTACGAGTACCTAGACTCATAACGA
 TGTAACGCTGGAGAGCAGCGAGGATGTGGCTGTAGTGCCGATGAATTGGTCAGCATAGAGCCTGCCATC
 TCCGCTCCAGAGGAATCTGTCTATTCACTTAGTCCCAAACCGGTAACCTTTTGAAGACGAGGCAGCCACACC
 AGCACCTCCGCCGGAGCAACTGCCGGCAACCTTTCGGCGGCCAGGTCAAGTTTGGAGCAGGAGTCCGCCG
 ACGACGATGAGGACGATGATAAGCCGCTGTCCAGCCTCACCAGCTGCAGCTCCTCGGGCCACACCAACGCC
 AGCTCCGAGAAGCTGCTGTTGTGGGCGTCCATCCGCTGGAGTCAACCACCGACAGCCTAGACTCACCCAG
 CATGTATACGCCCGTCAAGCAGCCGGCGGACTCATCGTACGGACTCATCACACCCGTCGACAGTGATCTGA
 CCCCCAACACACCC...

ATG: Startcodon; GAA: Ausgetauschte Sequenzen in der 1kb Retentionssequenz

7.3 Geräte, Kits und Computersoftware

Tab. 7.1: Geräte

Gerätebezeichnung	Modell	Hersteller
Binokular	M80	Leica
	WILD M3B	Heerbrugg, Switzerland
Eismaschine	AF100	Scotsman
Elektrophoresekammer	Mini horizontal submarine unit, HE33	AA Hoefer Scientific Instruments
Exikator	-	Duran group
Exikatoreinsatz	-	Schott
Fluoreszenzmikroskop	BX50W1	Olympus
	Axioskop 2 mot plus	Zeiss
Geldokumentationsmaschine	Transilluminator, MW 312nm	MS Laborgeräte
Gelkammernetzteil	Microcomputer Electrophoresis Power Supply	Consort
	Gene Power Supply GPS 200/400	Pharmacia
Injektionsmaschine	FemtoJet	Eppendorf
Inkubator (25°C)	Friocell	MMM Medcenter Einrichtungen GmbH
Inkubator (37°C)	KB115	WTB Binder
Kamera (Fluoreszenzmikroskop)	AxioCam MRm	Zeiss
	3ccD Color Video Camera MC 3255	Sony
Kapillarschleifgerät	Typ264	Bachofer, Laboratoriumgeräte

Konfokales Laserscanning Mikroskop	TCS SPII DM TCS SP5	Leica Leica
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph
Mikropipettenzieher	P-97, Flaming/Brown Micropipette Puller	Sutter Instrument CO.
Mikroskop (Injektionsmaschine)	Optiphot	Nikon
Mikrowelle	TECHNOSTAR Sharp	- R-210A
Nadeleinspannmaschine	-	Leitz
PCR Maschine	TGradient TPersonal	Biometra Biometra
pH-Meter	pH-Meter CG840	Schott
Photometer	Biophotometer	Eppendorf
Schüttler	IKA-VIBRAX-VXR Certomat SII GFL 3019	Janke & Kunkel Electronic B. Braun Biotech International GFL
Sterilbank	Steril-VBH	W.H. Mahl
Thermomixer	Thermomixer kompakt	Eppendorf
Vortexer	VF 2 Vortex Genie 2	Janke & Kunkel Bender & Hobein AG
Waage	PM 4600 DeltaRange	METTLER
Zentrifuge	Centrifuge 5417R Sigma 3K20 SN 1005 1396	Eppendorf B.Braun Labnet International Inc.

Tab. 7.2: Kits

Kit	Hersteller
Gen Elute Gel Extraction Kit	Sigma-Aldrich
GenElute PCR Clean-Up Kit	Sigma-Aldrich
GenElute™ Plasmid Miniprep Kit	Sigma-Aldrich
KAPAHiFi™ PCR Kit	Peqlab
QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
Taq PCR Master Mix Kit	Qiagen
TSA Kit	Perkin Elmer

Tab. 7.3: Computersoftware

Computersoftware	Hersteller
Chromas Lite 2.01.	Technelysium
FIJI	National Institute of Health
Illustrator CS4	Adobe
LAS AF	Leica
Leica application suite	Leica
Leica Confocal Software lite	Leica
Mendeley	Mendeley Ltd.

NEBcutter V2.0	New England BioLabs
Office	Microsoft
Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator	Kibbe, 2007
Reverse complement	Paul Stothard (University of Alberta)
RNAfold Web Server	Gruber et al., 2008; Universität Wien

7.4 Chemikalien, Lösungen und Verbrauchsmaterialien

7.4.1 Chemikalien und Lösungen

Alle Chemikalien wurden in Analysequalität verwendet und von den Firmen Sigma Aldrich, Paqlab, Perkin Elmer, Roth und Qiagen bezogen. Abweichungen hiervon werden gesondert erwähnt. Weitere verwendete Chemikalien: Ethanol (100% und vergällt), Glycerol, Kaliumacetat, Kohlendioxid, Lithiumchlorid, Methanol.

0,7% Agarosegel

0,7% Agarose in TAE-Puffer aufkochen und auf etwa 60°C abkühlen lassen. Das Ethidiumbromid zufügen (Endkonzentration: 0,4 µg/ml), die noch lauwarmer Flüssigkeit in die Gelkammer mit Taschenkamm einfüllen und erhärten lassen.

3 % Apfelsaftagar für Ablageschälchen

28 g Agar-Agar, dänisch in 1 l Apfelsaft (Rio d'oro, Aldi) in der Mikrowelle aufkochen, bis sich der Agar vollständig gelöst hat. Das Aufkochen und Lösen des Agars erfolgt in 3 Schritten von je 4 min um ein Überlaufen aus dem Gefäß durch zu heftige Blasenbildung zu vermeiden. Die noch heiße Flüssigkeit ca. 0,5-1 cm hoch in mittlere und große Fliegenröhrchen füllen. Am nächsten Tag die Röhrchen mit Stöpseln versehen und bei 4°C lagern.

Apfelsaftagar für Aufreihblöckchen bei der Injektion

6,4g Agar; 200ml Wasser; Spatelspitze Patentblau V (Klinik Apotheke Universitätsklinik Mainz); aufkochen und in große Petrischalen gießen

Fixativ

450 µl PBS; 500 µl Heptan; 50 µl 37% Formaldehyd

Futterbrei für Fliegenaufzucht

2500 g Malzextrakt und 1100 g Zuckerrübensaft in heißem Wasser gut durchmischen. Gleichzeitig 230 g Agar für 15 min in kaltem Wasser quellen lassen und anschließend in 10 l heißes Wasser einrühren bis sich der Agar vollständig gelöst hat. 450 g Hefeflocken, 250 g Sojamehl und 2500 g Maisgries in warmen Wasser einweichen und ebenso wie das Malzextrakt/Zuckerrübensaftgemisch den 10 l aufgewärmten Wasser + Agar unterrühren und 3 weitere Liter Wasser beifügen. Das Ganze bei geringerer Temperatur ca. 90 min köcheln lassen. Um Milbenbefall vorzubeugen werden 55 g Nipagin und 130 ml Propionsäure in 3 l heißem Wasser gelöst und zum Brei gegeben. Den Brei gut durchmischen. Nach weiteren 20 min kochen, kann der Brei in Aufzuchtgefäße ca. 1 Finger

breit eingefüllt werden. Abschließend den Brei über Nacht bei RT erkalten lassen, anschließend mit Stöpseln versehen und bei 4°C lagern.

Injektionspuffer

1mM NaH₂PO₄; 50mM KCl, pH 6,8

„Luria Bertani“ (LB)-Medium (ampicillinhaltig)

10 g/l Trypton; 5 g/l Hefe-Extrakt; 10g/l NaCl; in 1l A. dest. lösen und mit 10M NaOH pH7 einstellen, autoklavieren und bei 4°C lagern; 75 µg Ampicillin pro 1 ml LB-Medium zugeben

PBS (20x)

1,3 M NaCl; 0,07 M Na₂HPO₄; 0,03 M NaH₂PO₄; In 500 ml A. dest. lösen und pH 7,4 einstellen.

PBT

PBS, 0,3% Triton-X-100

SOC

SOB, 20 mM Glucose sterile Lagerung bei 4°C

TAE-Puffer

0,2 M Essigsäure; 0,01 M EDTA (pH 8); 0,4 M Tris; Vor Gebrauch in A. dest. verdünnen (1:50)

SOB

2% Trypton (w/v); 0,5% Hefeextrakt (w/v) 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; sterile Lagerung bei 4°C

TE-Puffer

10 mM Tris, pH 8,0; 1 mM EDTA

PBTween (50ml)

2,5ml 20x PBS; 47,5ml A. dest.-DEPC; 50µl Tween 20

PBS-DEPC

20x PBS; mit H₂O-DEPC 1:1 verdünnt

H₂O-DEPC

1l A. dest.; 1ml DEPC; über Nacht inkubieren und am nächsten Tag autoklavieren

RF-1

100 mM KCl; 50 mM MnCl₂; 30 mM Kaliumacetat; 10 mM CaCl₂; 15% Glycerol; mit 10%iger Essigsäure auf pH 5,8 einstellen; filtrieren und bei 4°C lagern

RF-2

10 mM MOPS; 10 mM KCl; 75 mM CaCl₂; 15% Glycerol; mit 100mM NaOH auf pH 6,8 einstellen; filtrieren und bei 4°C lagern

Hybridisierungslösung (50ml)

12,5ml 20x Saline Sodium Citrat (SSC)-Puffer; 12,5ml A.dest.-DEPC; 25ml Formamid; 50µl Tween 20

Hyb-lsg. A (5ml)

2,5ml Formamid; 1,25ml 20x SSC; 100µl ssDNA; 25µl tRNA; 2,5µl Heparin; 1,12ml DEPC-H₂O

Hyb-lsg. B (50ml)

25ml Formamid; 12,5ml 20xSSC-DEPC; 12,5ml DEPC-H₂O; 50µl Tween 20

TNB

0,1 M TRIS-HCl (pH 7,5); 0,15 M NaCl; 0,5 % blocking reagent; in A. dest. unter Erwärmung lösen; filtrieren; Lagerung bei -20 °C

TNT

0,1 M TRIS-HCl (pH 7,5); 0,15 M NaCl; 0,05 % Tween20; in A. dest. lösen

PLP

3Vol. PBL; 1Vol. PFA (8%); vor Nutzung auf 37°C erwärmen

PBL

1,8g Lysin-HCl; 0,1M Na₂HPO₄ zugeben bis pH7,4; mit 0,1M Natriumphosphatpuffer auf 100ml auffüllen; bei 4°C etwa 3 Monate haltbar

Natriumphosphatpuffer (0,1M)

500ml 0,1M Na₂HPO₄; mit 0,1M NaH₂PO₄ auffüllen bis pH7,4

Chlorbleichlauge (7,5%)

15% Natriumhypochloritlösung mit Leitungswasser 1:1 verdünnt

Glycerol (70%)

70ml 100% Glycerol; 30ml PBS

Paraformaldehyd (PFA, 8%)

1,6g PFA in 20ml A. dest. lösen; 140µl 1M NaOH; auf 37°C erhitzen und durch Schütteln lösen, aliquotieren und bei -20°C aufbewahren

Puffer A

100mM Tris/HCl pH 7,5; 100mM EDTA; 100mM NaCl; 0,5% SDS

7.4.2 Verbrauchsmaterialien

18x18mm- und 22x22mm-Deckgläser, 6x Loading Dye (Fermentas/Thermo Scientific), Agar, Antibiotika (Ampecillin, Chloramphenicol, Kanamycin), Aufzuchtgefäße (10mm/25mm/50mm), BamHI Unique Buffer (Fermentas/Thermo Scientific), DNA-Größenmarker Hyper ladder I, II (Bioline), Einmalküvetten, FD Green Buffer (Fermentas/Thermo Scientific), Futterbrei Formula 4-24 (Carolina Biological), Gaze, Heptankleber, Injektionskapillaren GB100TF-8P (Science Products), Klebeetiketten, Knete,

Nagellack, NEB Buffer 4, Nitrilhandschuhe, Objektträger, Orange Buffer (Fermentas/Thermo Scientific) Patentblau, Parafilm, Petrischalen, gestopfte und ungestopfte Pipettenspitzen, Plastikschauch, Präpariernadeln, Eppendorf Reaktionsgefäße (0,2ml, 1,5ml, 2ml), Falcons (15ml, 50ml), Schaumstoffstopfen, Tango Buffer (Fermentas/Thermo Scientific), Tango Y Buffer (Fermentas/Thermo Scientific), Tesafilm, Trockenhefe, Spritze, Vectashield, Voltalefö 3S/10S, Watte, weiße/blau Wägeschälchen

7.5 Abkürzungsverzeichnis

Tab. 7.4: allgemeines Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celcius
A	Adenin
A.dest.	Aqua destillata
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ant	anterior
attB	bacterial attachment site
attP	phage attachment site
Bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CB	Central brain
CBC	Cap-binding complex
cDNA	komplementäre DNA
CDS	Coding Sequence
Chloramp	Chloramphenicol
cm	Zentimeter
CTN-RNA	cationic amino acid transporter 2 RNA
Cy	Carbocyanin
d	dorsal
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dATP	Deoxyadenosintriphosphate
dCTP	Deoxycytidinetriphosphate
ddH ₂ O	doppelt destilliertes H ₂ O
DEAD box Helikasen	asp-glu-ala-asp box Helikasen
DEPC	Diethylpyrocarbonate
dEpi	dorsale Epidermisanlage
dGTP	Deoxyguanosintriphosphate
DIG	Digoxigenin
DMPK	Myotone Dystrophie Proteinkinase
DNA	Deoxyribonukleinsäure

dNTP	Deoxynukleotide
dTTP	Deoxythymidintriphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic acid
eGFP	enhanced GFP
EJC	Exon junction complex
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
<i>et al.</i>	<i>et alteres</i>
EtOH	Ethanol
FD	Fast Digest
FISH	Fluoreszente In-situ Hybridisierung
G	Guanin
g	Gramm
GEMS	Gemini der Cajal Körper
GLS	<i>grk</i> Lokalisationssignal
GMZ	Ganglionmutterzelle
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HCl	Chlorwasserstoff
HD	Huntington Disease
hnRNP	heterogeneous nuclear RNP
HS	Hemisegment
Hyb.-lsg.	Hybridisierungslösung
INP	Intermediate neural progenitor
ISNb	Intersegmentalnerv b
KAc	Kaliumacetat
Kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH	K-Homologdomäne
KLS	Kernlokalisationssequenz
l	Liter
LB	lysogeny broth
LiCl	Lithiumchlorid
lncRNA	Long nuclear-retained regulatory RNA
LSM	Laser scanning microscope
M	Molar
<i>M. vestita</i>	<i>Marsilea vestita</i>
max.	maximal
MCS	Multiple Cloning Site
MD	Myotone Dystrophie
MeOH	Methanol
Mes	Mesodermanlage
Mesekt	mesektodermale Zellen
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
ML	Mittellinie
ml	Milliliter
mm	Millimeter

mM	Millimolar
MnCl ₂	Mangan(II)-chlorid
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NB	Neuroblast
NCP	Nuclear pore complex
ncRNA	non coding RNA
ng	Nanogramm
NI	Intranukleare Inklusionen
NLS	Nukleares Lokalisationssignal
NO	Stickstoffmonoxid
nrRNA	nuclear retained RNA
NRS	Nukleare Retentionssequenz
NS	Nervensystem
O ₂	Dioxid
OD	Optische Dichte
OL	Optic lobe
ORI	Origin of Replication
PBS	phosphate buffered saline
PBT	PBS + Triton-X-100
PBTween	PBT + Tween-20
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PLP	Periodate-lysine-paraformaldehyde
PML	Promyelozytenleukämie
pmol	Picomol
pNC	proneurales Cluster
pNR	prozepale neurogene Region
PNS	peripheres Nervensystem
PolyQ	Polyglutamine
PZ	Polzellen
RF cloning	Restriction Free cloning
RISC	RNA induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RNP	Ribonucleoproteine
rpm	rounds per minute
RRM	RNA recognition motif
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SCA	Spinozerebrale Ataxie
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
siRNA	small interfering RNA
SOB	super optimal broth

SOC	SOB + Glucose
SOLE	Spliced oskar localization element
spec.	species
SSC	Sodium Citrate Standart
ssDNA	single stranded DNA
St.	Stadium
SV40 UTR	Simian-Virus 40 UTR
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TF	Transkriptionsfaktor
TLS	Transport- und Lokalisationssignal
T _m	melting temperature
TNB	Tris-NaCl Blocking Reagent
TNT	Tris-NaCl-Tween
TREX	TRanscription EXport
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer RNA
TSA	Tyramide Signal Amplification
U	Uracil
u	Unit/Einheit
UAS	Upstream Activating Sequence
ün	über Nacht
usw.	und so weiter
UTR	Untranslated Region
UV	Ultraviolet
v	ventral
Veloc.	Velocity
vNR	ventrale neurogene Region
vNS	ventrales Nervensystem
Vol.	Volumen
w/v	weight per volume
WGA	Wheat germ agglutinin
WLE	Wg Lokalisationselement
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar

Tab. 7.5: Abkürzungsverzeichnis Gene und Proteine

<i>ac</i>	<i>achaete</i>
ADAR	Adenosine deaminase acting on RNA
<i>bcd</i>	<i>bicoid</i>
<i>btz</i>	<i>barentsz</i>
<i>cas</i>	<i>castor</i>

<i>CASZ1, Casz1, casz1</i>	<i>Castor zinc finger 1</i>
<i>Chk2</i>	Checkpoint Kinase 2
CRD-BP	Coding region determinant-Binding protein
<i>Dcr</i>	<i>Dicer</i>
<i>dImp</i>	<i>drosophila IGF-II mRNA-binding protein</i>
eIF4A/B/III	Eukaryotische Translationsinitiationsfaktoren 4A/4B
<i>Eip71CD</i>	<i>Ecdysone-induced protein 28/29kD</i>
<i>elav</i>	<i>embryonic lethal abnormal vision</i>
<i>Elba3</i>	<i>Early boundary activity 3</i>
<i>en</i>	<i>engrailed</i>
<i>fru</i>	<i>fruitless</i>
GFP	Green Fluoreszent Protein
<i>grh</i>	<i>grainyhead</i>
<i>grk</i>	<i>gurken</i>
<i>gsb</i>	<i>gooseberry</i>
<i>hb</i>	<i>hunchback</i>
Hel25E/UAP56	Helikase at 25E
<i>hh</i>	<i>hedgehog</i>
<i>Hrb27c/Hrp48</i>	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein at 27C</i>
<i>Hsp83</i>	<i>Heat shock protein 83</i>
IBP160	Intron-Bindeprotein 160
IMP1-3	Insulin-like Growth-Faktor-II mRNA- Bindeprotein 1-3
<i>ind</i>	<i>intermediate neuroblast defective</i>
<i>insc</i>	<i>inscuteable</i>
<i>Jra</i>	<i>Jun-related antigen</i>
<i>K05F1.5</i>	„cas Ortholog in Nematoden“
KOC	K homology domain containing protein overexpressed in cancer
<i>Kr</i>	<i>Krüppel</i>
<i>kuk</i>	<i>kugelkern</i>
lacZ	β-Galactosidase
<i>lok</i>	<i>loki</i>
<i>mago</i>	<i>mago nashi</i>
Magoh	Mago Homolog
MALAT1	metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1
<i>mb1</i>	<i>muscleblind</i>
<i>MBNL</i>	<i>Muscleblind-like</i>
mCAT2	Mouse cationic amino acid transporter 2
Me31B	Maternal expression at 31B
Mex67	mRNA export factor 67
<i>mfas</i>	<i>midline fasciclin</i>
<i>mira</i>	<i>miranda</i>
MLN51	Metastatic lymph node 51
<i>msh</i>	<i>muscle segment homeobox</i>
MSL	male-specific-lethal
nGFP	nukleares GFP
<i>nos</i>	<i>nanos</i>

NXF-1	Nuclear RNA export factor 1
<i>osk</i>	<i>oskar</i>
p54 ^{nrb}	54kDa nukleares RNA- und DNA-Bindeprotein
PABP	Poly(A) binding protein
<i>PAPLA1</i>	<i>Phosphatidic Acid Phospholipase A</i>
<i>Pdm</i>	<i>POU-domain protein</i>
PH 3	Phospho Histon 3
<i>pros</i>	<i>prospero</i>
PTP	Polypyrimidine tract binding protein
RFP	Red Fluoreszent Protein
roX1/2	RNA on the X1/2
<i>sbr</i>	<i>small bristles</i>
<i>sc</i>	<i>scute</i>
<i>scw</i>	<i>screw</i>
SLBP	Stem loop Bindeprotein
<i>smn</i>	<i>survival motor neuron</i>
<i>sqd</i>	<i>squid</i>
<i>stau</i>	<i>staufen</i>
<i>svp</i>	<i>seven-up</i>
<i>syp</i>	<i>syncrip</i>
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
<i>tor</i>	<i>torpedo</i>
<i>tun</i>	<i>tungus</i>
<i>vas</i>	<i>vasa</i>
Vg1 RBP/Vera	Vg1 RNA-Bindeprotein
<i>vnd</i>	<i>ventral nervous system defected</i>
<i>w</i>	<i>white</i>
<i>wg</i>	<i>wingless</i>
<i>Xlsirt</i>	<i>Xenopus laevis</i> short interspersed repeat transcripts
ZBP-1	Zipcode Bindeprotein 1

7.6 Eidesstattliche Erklärung

Versicherung gemäß §11 der Promotionsordnung

Eidesstattliche Erklärung für die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Analysen zur Kernlokalisierung der *castor* mRNA im sich entwickelnden zentralen Nervensystem von *Drosophila melanogaster*

Hiermit versichere ich, Antje Jüngling, an Eides statt, dass ich die beigefügte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Mainz, Juni 2018

Antje Jüngling