

Funktionelle Analyse von intrazellulären Signalwegen  
bei der Migration der embryonalen peripheren Gliazellen  
von *Drosophila melanogaster*

Dissertation

Zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

vorgelegt von

Jan Dietrich  
geboren in Worms

Mainz, 2014

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Datum der mündlichen Prüfung: 23.09.2014

# **Inhaltsverzeichnis**

Inhaltsverzeichnis.....	I
1. Einleitung .....	1
1.1. Entwicklung des embryonalen Nervensystems .....	2
1.1.1. Embryonale Gliogenese in <i>D. melanogaster</i> .....	3
1.2. Klassifizierung der embryonalen Gliazellen.....	5
1.2.1. Die Gliazellen des ZNS.....	5
1.2.2. Die Gliazellen des PNS .....	6
1.3. Migration der ePG.....	8
1.3.1. Welche Faktoren sind an der Migration der ePG beteiligt? .....	8
1.3.2. Interaktionen zwischen ePG und peripheren Nerven .....	9
1.3.3. Interaktionen zwischen den ePG untereinander .....	11
1.4. Ziel der Arbeit .....	11
2. Material und Methoden.....	13
2.1. Molekularbiologische Methoden.....	13
2.1.1. Herstellung von cDNA .....	13
2.1.2. PCR und Sequenzierung .....	13
2.1.3. Sequenzierung von pUASTattB_ <i>mbc</i> -RA::HA .....	14
2.1.4. Klonierung von pUASTattB_ <i>mbc</i> -RB .....	14
2.1.5. Mutagenese von UAS- <i>mbc</i> -RB.....	18
2.1.6. Herstellung von transgenen Fliegenstämmen.....	20
2.2. Fliegenarbeit .....	20
2.2.1. Fliegenzucht und Kreuzungen .....	20
2.2.2. Balancieren von Mutationen .....	21
2.2.3. Gal4/UAS-System .....	21
2.2.4. Rettungsexperimente .....	22
2.2.5. Fliegenstämme .....	24
2.2.6. Eiablagen .....	27

2.3. Immunohistochemie .....	27
2.3.1. Chemische Dechorionisierung, Fixierung und Devitellinisierung der Embryonen .....	27
2.3.2. Inkubation mit primären und sekundären Antikörpern .....	28
2.3.3. Signaldetektion und Dokumentation der Färbung .....	29
2.4. verwendete Lösungen .....	29
2.5. verwendete Geräte .....	31
2.6. verwendete Software .....	32
3. Ergebnisse .....	33
3.1. Analyse der <i>mbc</i> Mutanten .....	33
3.1.1. In <i>mbc</i> Mutanten treten in mehreren Zellpopulation Phänotypen auf .....	34
3.1.2. Bei den zentral generierten ePG treten Migrationsdefekte auf .....	36
3.1.3. Quantitative Auswertung der glialen Migrationsdefekte in <i>mbc</i> Mutanten .....	38
3.2. Mbc wird in den ePG exprimiert .....	39
3.3. <i>mbc</i> hat eine zellautonome Funktion bei der glialen Migration .....	42
3.4. Interaktionspartner von Mbc und ihre Rolle bei der glialen Migration .....	44
3.4.1. Ced-12 ist an der Migration der ePG beteiligt .....	44
3.4.2. Einfluss des Phospholipids PIP <sub>3</sub> auf die Migration der ePG .....	46
3.4.3. Rac1, nicht jedoch Egfr, Pvr oder Crk sind in die Migration der ePG involviert ....	49
3.5. Im Embryo werden 2 verschiedene Isoformen von <i>mbc</i> exprimiert .....	51
3.6. Die beiden Isoformen von Mbc zeigen funktionelle Unterschiede .....	53
3.6.1. Beide Isoformen können den Muskelphänotyp retten .....	53
3.6.2. Die Migration der ePG kann nur von Mbc-PB gerettet werden .....	56
3.6.3. Überexpression von Mbc-PB führt zu Übermigration von ePG9 .....	60
3.7. Exon 9 ist der einzige Unterschied zwischen den beiden Isoformen von <i>mbc</i> .....	61
3.8. Mbc-PB wird durch Phosphorylierung von Exon 9 reguliert .....	62
3.8.1. <i>In silico</i> Analyse der phosphorylierbaren Aminosäuren im alternativ gespleißten Bereich von Mbc-PB .....	62
3.8.2. Verschiedene Kinasen beeinflussen die Migration der ePG .....	64
3.8.3. Die Kinase <i>wnd</i> ist an der Regulation der glialen Migration beteiligt .....	66
3.8.4. Phosphorylierung ist für die Inaktivierung von Mbc-PB notwendig .....	68

3.9. Mbc-PB spielt eine Rolle bei der Migration von ePG7 und beeinflusst damit indirekt die Migration von ePG9 .....	70
3.9.1. Die Morphologie von ePG7 und ePG9 ist in der <i>mbc</i> Mutante stark verändert.....	70
3.9.2. ePG7 und ePG9 beeinflussen sich gegenseitig bei der Migration .....	73
3.9.3. ePG7 und ePG9 migrieren unabhängig von den übrigen ePG .....	75
3.9.4. Der Verlust von Mbc in ePG7 beeinflusst die Migration von ePG9.....	76
3.9.5. Die Expression von Mbc-PB in ePG7 rettet die Migration von ePG9 in <i>mbc</i> mutantern Hintergrund.....	77
3.9.6. Unterbrechung des Mbc-PB Signalwegs beeinflusst die Migration von ePG7 und ePG9.....	80
3.10. <i>In silico</i> Analyse verschiedener zu <i>mbc</i> orthologer Gene .....	82
3.10.1. Alternatives Spleißen von <i>mbc</i> orthologen Genen in Drosophiliden .....	82
3.10.2. Alternatives Spleißen von <i>mbc</i> orthologen Genen in Dipteren .....	85
3.10.3. Die für <i>mbc</i> annotierten Isoformen sind Arthropoden spezifisch .....	89
3.10.4. Die Bereiche, in denen sich die alternativen Isoformen unterscheiden sind innerhalb der Arthropoden nur schwach konserviert.....	94
3.11. Die 3D-Struktur von Mbc .....	96
3.11.1. Die zentrale Region von Mbc faltet sich zu HEAT- <i>repeats</i> .....	96
3.11.2. Der von Exon 9 kodierte Bereich bildet zwei antiparallele $\alpha$ -Helices .....	99
4. Diskussion.....	101
4.1. Phänotypen der <i>mbc</i> Mutante .....	101
4.1.1. Muskuläre und axonale Phänotypen.....	101
4.1.2. Gliale Migrationsdefekte .....	101
4.2. Funktionelle Unterschiede der beiden Isoformen .....	102
4.3. Regulation von Mbc .....	104
4.3.1. Rekrutierung an die Plasmamembran.....	104
4.3.2. Phosphorylierung von Mbc/DOCK1 .....	106
4.3.3. Phosphorylierung innerhalb von Exon 9 .....	107
4.3.4. Ubiquitinierung von Mbc und Abbau durch das Proteasom.....	109
4.4. Die Kinase Par-1 ist vermutlich unabhängig von Mbc in die Migration der ePG involviert .....	110

4.5. Interaktionspartner von Mbc-PB.....	111
4.5.1. Die Rolle von Rac1 bei der Migration der ePG .....	111
4.5.2. Die Rolle von Ced-12 bei der glialen Migration .....	113
4.6. Funktion der HEAT- <i>repeats</i> .....	114
4.7. Modell des Signalwegs zwischen ePG7 und ePG9 .....	115
5. Zusammenfassung und Ausblick .....	119
6. Literatur .....	120
7. Anhang:.....	126
7.1. Abkürzungsverzeichnis .....	154
7.1.1. Allgemeine Abkürzungen.....	154
7.1.2. Namen und Abkürzungen der Gene .....	155
7.2. Abbildungsverzeichnis .....	157
7.3. Tabellenverzeichnis .....	158
7.4. Eidesstattliche Erklärung.....	159

## 1. Einleitung

Das Nervensystem besteht aus zwei grundlegend unterschiedlichen Zelltypen. Das sind zum einen die reizleitenden Neurone, die seit langer Zeit im Fokus der Neurobiologie stehen, zum anderen die so genannten Gliazellen. Dieser Zelltyp wurde zuerst von dem Berliner Arzt Rudolph Virchow als eine Art Bindegewebe (Nervenkitt) des Nervensystems beschrieben. Ihr Name geht auf das griechische Wort „Glia“ für Leim zurück und deutet die Funktion an, die ihnen ursprünglich zugeschrieben wurde (Somjen, 1988). Erst durch die Forschung der letzten Jahrzehnte wurden weitere Aufgaben der Gliazellen bekannt. Dazu zählt die Versorgung der Nervenzellen mit Nährstoffen, sowie die Aufrechterhaltung der Homöostase im Nervensystem (Treherne and Schofield, 1981). Außerdem sind Gliazellen für die Isolierung einzelner Axone notwendig. Auch die Aufnahme und das Recycling von Neurotransmittern an den Synapsen werden von diesen Zellen übernommen. Zudem beeinflussen Gliazellen über sezernieren Neuromodulatoren die Funktion von Neuronen (Murai and Van Meyel, 2007). Die Gliazellen von Vertebraten und Invertebraten sind sich in ihrer Morphologie sehr ähnlich und übernehmen grundsätzlich die gleichen Aufgaben (Freeman and Doherty, 2006). Außerdem sind grundlegende Mechanismen bei der Entwicklung des Nervensystems in allen höheren Tieren konserviert (Arendt and Nübler-Jung, 1999).

Die Taufliege *Drosophila melanogaster* (ab hier als *D. melanogaster* bezeichnet) bietet als Modellorganismus eine Vielzahl praktischer Vorteile, wie z. B. eine kurze Generationszeit und eine große Anzahl verschiedener mutanter Fliegenstämme. Zudem ist das Fliegen-genom vollständig sequenziert (Adams et al., 2000) und kann aufgrund der geringen Anzahl von nur vier Chromosomenpaaren leicht genetisch manipuliert werden. Mit Hilfe des Gal4/UAS-Systems lassen sich außerdem einzelne Zellen oder Zellgruppen, durch die Expression von Markern wie GFP, visualisieren. Diese Technik kann auch für die ektopische Expression oder die Abschaltung von Genen genutzt werden (Brand and Perrimon, 1993). Bei der Erforschung grundlegender Mechanismen während der Entwicklung des Nervensystems bietet *D. melanogaster* zudem weitere Vorteile, z. B. besteht das Nervensystem aus einzelnen segmental aufgebaute Einheiten (Ganglien), die morphologisch sehr genau beschrieben wurden. Aus diesen Gründen wird *D. melanogaster* bereits seit mehreren Jahrzehnten für die Untersuchung von Entwicklung (Gliogenese) und Funktion der Gliazellen genutzt. Im Rahmen dieser Forschung konnte gezeigt werden, dass Gliazellen während der Entwicklung zum Teil über weite Strecken migrieren. Allerdings ist relativ wenig über Mechanismen und Faktoren bekannt, die den Verlauf der Migration kontrollieren. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern einen Beitrag zu dieser Fragestellung.

## 1.1. Entwicklung des embryonalen Nervensystems

Das gesamte Nervensystem von *D. melanogaster* setzt sich aus dem Zentralnervensystem (ZNS) und dem peripheren Nervensystem (PNS) zusammen, das ZNS kann wiederum in Gehirn und ventrales Bauchmark unterteilt werden. Da das Gehirn und dessen Entwicklung für diese Arbeit nicht relevant sind, wird im Folgenden lediglich auf die Entwicklung der Gliazellen im Bauchmark und dem damit assoziierten PNS eingegangen. Die embryonalen Gliazellen in diesem Bereich können grundsätzlich von zwei unterschiedlichen Zellpopulationen generiert werden. Zum einen von Neuroblasten (NBs), das sind neurale Stammzellen, deren Nachkommen das gesamte ZNS sowie Teile des PNS bilden. Die meisten dieser Zellen teilen sich entsprechend des Stammzellmodus, d. h. der NB bildet bei jeder Teilung eine selbsterneuerte Vorläuferzelle und eine Gangliemutterzelle (GMZ). Die GMZ teilt sich danach nur ein einziges Mal und die beiden Tochterzellen differenzieren sich in Neurone und/oder Gliazellen. Zum anderen gehen außerhalb des ZNS sowohl sensorische Neurone als auch periphere Gliazellen aus *sensory organ precursor cells* (SOPs) hervor. Die Gesamtheit aller NBs eines Segmentes, sowie dessen Nachkommen, bilden ein Neuomer. Entlang der anteriorposterioren Achse des Embryos reihen sich so 16 Neuomere hintereinander und bilden zusammen das ventrale Bauchmark. Entsprechend der Körperregionen lassen sich die drei am weitesten anterior liegenden Neuomere den gnathalen Segmenten und die nächsten drei den thorakalen Segmenten zuordnen. Neuere Arbeiten zeigen, dass darauf insgesamt 10 Neuomere folgen, die sich den abdominalen Segmenten 1 bis 10 (A1-A10) zuordnen lassen (Birkholz et al., 2013). Innerhalb jedes Segments bilden die Expressionsdomänen verschiedener Gene eine Art kartesisches Koordinatensystem. Darüber erhält jeder NB, entsprechend seiner Position innerhalb des Segments, eine eigene Identität. NBs, die an korrespondierenden Positionen in unterschiedlichen Segmenten liegen, erhalten somit die selbe Identität und werden als seriell Homologe bezeichnet (Technau et al., 2006). Im Lauf der Entwicklung produziert jeder NB, entsprechend seiner Identität, einen charakteristischen invarianten Zellstammbaum (Zellklon). Man unterscheidet hierbei zwischen NBs, Glioblasten (GB) und Neuroglioblasten (NGB), deren Zellklone jeweils nur Neurone, nur Gliazellen oder beide Zelltypen enthalten. Ungeachtet dessen werden in der Literatur alle neuronalen Stammzellen als NB bezeichnet, diese Nomenklatur wird in der vorliegenden Arbeit beibehalten. Die Gliazellen des Bauchmarks werden von insgesamt sechs NGBs und einem einzigen GB pro Hemisegment gebildet. Einige dieser Zellklone zeigen segmentale Unterschiede, abhängig davon, ob sie im Thorax oder im Abdomen liegen. Darunter z. B. NB6-4, der im Abdomen ausschließlich Gliazellen generiert, im Thorax dagegen Gliazellen und Neurone. Diese segmentspezifischen Unterschiede werden durch homeotische Gene gesteuert (Technau et al., 2006).



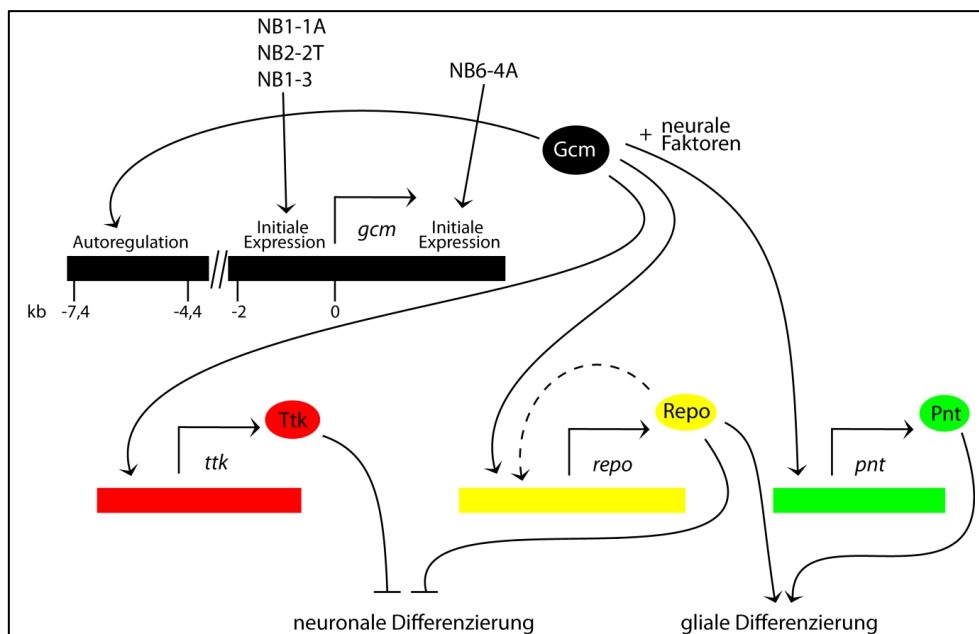
### 1.1.1. Embryonale Gliogenese in *D. melanogaster*

Im ZNS des Embryos unterscheidet man grundsätzlich zwischen zwei Typen von Gliazellen, den Mittellinienglia und den lateralen Gliazellen (Klämbt et al., 1996). Während die lateralen Gliazellen von NGBs und einem GB generiert werden, gehen die Mittellinienglia aus dem Mesektorderm hervor (Klämbt and Goodman, 1991, Bossing and Technau, 1994). Da ich mich im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich mit lateralen Gliazellen beschäftigt habe, möchte ich an dieser Stelle kurz die Entwicklung dieser Gruppe beschreiben.

Der Grundzustand aller von NBs generierten Zellen ist zunächst das neuronale Schicksal, d. h. die Differenzierung zu Neuronen. Damit sich eine neurale Zelle zu einer Gliazelle differenziert, muss das binäre Schalergen *glial cells missing (gcm)* in dieser Zelle exprimiert werden. Die initiale Expression von *gcm* wird in den verschiedenen Zellklonen zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Entwicklung ausgelöst. Beispielsweise generiert NB1-1 im Abdomen Neurone und Gliazellen. In diesem Fall gehen aus einer GMZ sowohl ein Neuron, als auch eine Gliazelle hervor, *gcm* wird also erst postmitotisch aktiviert (Udolph et al., 1993). NB6-4 exprimiert dagegen bereits vor der ersten Teilung *gcm*. Im Thorax kommt es bei der ersten Zellteilung zu einer asymmetrischen Verteilung der *gcm* mRNA, worauf die *gcm* positive Tochterzelle Gliazellen generiert, die *gcm* negative Zelle hingegen Neurone bildet. Im Abdomen erhalten dagegen beide Tochterzellen *gcm* mRNA und bilden ausschließlich Gliazellen (Akiyama-Oda et al., 1999). Auf genomischer Ebene spielen dabei modular aufgebaute *cis*-regulatorische Elemente eine Rolle. Beispielsweise ist für die Expression von *gcm* im Zellklon von NB6-4 im Abdomen ein Element im 3' Bereich von *gcm* verantwortlich (Abb. 1.1). Im Thorax wird *gcm* im selben Zellklon dagegen unabhängig von diesem Element exprimiert (Jones et al., 2004). Ein anderes Element, das im 5' Bereich von *gcm* lokalisiert ist, sorgt für die initiale Expression von *gcm* im Zellklon von NB1-3, NB2-2 im Thorax und NB1-1 im Abdomen (Ragone et al., 2003). Für die initiale Expression von *gcm* ist in jedem Zellklon eine andere Kombination aus positionellen und temporären Signalen notwendig. Um welche Faktoren es sich dabei handelt, ist allerdings weitgehend unbekannt. Für den NB1-1 im Abdomen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Notch für die initiale Aktivierung von *gcm* notwendig ist (Udolph et al., 2001).

*gcm* kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der nach der initialen Expression seine eigene Expression verstärkt (Autoregulation). Dafür ist wiederum ein *cis*-regulatorisches Element im 5' Bereich von *gcm* (-7,4 kb bis -4,4 kb) notwendig (Jones et al., 2004) (Abb. 1.1). An der Autoregulation von *gcm* sind weitere Faktoren beteiligt, die wiederum nur in einzelnen Zellklonen aktiv sind. Beispielsweise der Transkriptionsfaktor Huckebein in den Gliazellen des Zellklons von NB1-1 im Abdomen (De Iaco et al., 2006). Außerdem konnte gezeigt werden,

dass zur Aufrechterhaltung der *gcm* Expression in Gliazellen des Zellklons von NB6-4 im Thorax Prospero benötigt wird (Freeman and Doe, 2001). Neben der Autoregulation aktiviert Gcm die Expression mehrerer glialer Gene, darunter *reversed polarity (repo)* (Xiong et al., 1994, Halter et al., 1995), *pointed (pnt)* (Klaes et al., 1994) und *tramtrack (ttk)* (Giesen et al., 1997). Diese kodieren wiederum für Transkriptionsfaktoren, die wie im Fall von Repo und Pnt, für die Expression weiterer glialer Gene sorgen. Andere Faktoren reprimieren die Expression neuronaler Gene. Hier spielt vor allem Ttk (Badenhorst, 2001), aber auch Repo eine Rolle (Yuasa et al., 2003). Da Gcm auch bei der Differenzierung anderer Zelltypen eine zentrale Rolle spielt, z. B. bei Makrophagen, sind für die Aktivierung glialer Gene weitere bisher unbekannte neurale Faktoren notwendig, die in Kombination mit Gcm für die initiale Expression sorgen (Abb. 1.1). In den embryonalen Gliazellen wird *gcm* nur transient exprimiert, um das gliale Schicksal einzuleiten, und ist im Bauchmark bereits vor dem Ende der Embryogenese vollständig inaktiv. Repo wird dagegen nach der initialen Aktivierung permanent in allen Gliazellen exprimiert. Da Repo auch nach der Inaktivierung von *gcm* konstant in allen Gliazellen exprimiert wird, kann es vermutlich seine eigene Expression aktivieren. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit zur Visualisierung der Gliazellen vor allem Antikörperfärbungen gegen Repo genutzt.



**Abb. 1.1: Transkriptionelle Regulation der Gliogenese**

Die initiale Expression von *gcm* wird in verschiedenen Zellklonen über unterschiedliche *cis*-regulatorische Elemente im 5' oder 3' Bereich von *gcm* reguliert. Nach der initialen Expression verstärkt Gcm die eigene Expression (Autoregulation) und aktiviert in Kombination mit noch unbekanntenen neuronalen Faktoren die Expression der glialen Gene *tramtrack (ttk)*, *reversed polarity (repo)* und *pointed (pnt)*. Im weiteren Verlauf werden zum einen neuronale Gene reprimiert und dadurch die neuronale Differenzierung unterbunden, zum anderen werden gliale Gene aktiviert und so die gliale Differenzierung gefördert. Da Repo unabhängig Gcm konstant exprimiert wird, kann es vermutlich die eigene Expression aktivieren.

## 1.2. Klassifizierung der embryonalen Gliazellen

Die Gliazellen des Embryos lassen sich, je nachdem ob sie im Bauchmark liegen oder mit den peripheren Nerven assoziiert sind, entweder dem ZNS oder dem PNS zuordnen (Abb. 1.2A). In beiden Fällen übernehmen Gruppen von Gliazellen vergleichbare Aufgaben, wie die Bildung der Blut-Hirn-Schranke oder die Isolierung einzelner Axone. Trotzdem zeigen die Gliazellen des PNS einige Unterschiede im Vergleich zu denen im ZNS. Beispielsweise migrieren die embryonalen peripheren Gliazellen (*engl. embryonic peripheral glia* (ePG)) über wesentlich weitere Strecken um ihre finale Position zu erreichen. Im Folgenden wird kurz auf die verschiedenen Klassen von Gliazellen im ZNS und PNS eingegangen, sowie deren Funktion für das Nervensystem erläutert.

### 1.2.1. Die Gliazellen des ZNS

Am Ende der Embryogenese besteht jedes abdominale Hemineuromer (spiegelbildliche Hälfte eines Neuromers) aus 25 lateralen Gliazellen (Beckervordersandforth et al., 2008), 30 Motorneuronen (Landgraf et al., 1997) und etwa 270 Interneuronen (Rickert et al., 2011). Die Gliazellen wurden bereits früh, zunächst anhand ihrer Morphologie und Position innerhalb des Bauchmarks, drei unterschiedlichen Gruppen zugeordnet (Ito et al., 1995). Im Einzelnen sind das die Kortex-assoziierten Gliazellen, die ventral im Bauchmark, dem so genannten Kortex, lokalisiert sind. Die Zellen sind dort eng mit den Zellkörpern der Neurone assoziiert und werden deshalb auch Zellkörperglia genannt. Außerdem gibt es die Neuropil-assoziierten Gliazellen. Dazu gehören die Longitudinalgia, die auf dem Neuropil positioniert und mit den Axonen der longitudinalen Trakte (Konnektive) assoziiert sind. Sowie die Nervenwurzelglia, die die Axone der peripheren Nerven im Bereich zwischen Neuropil und dem Austrittspunkt aus dem ZNS umhüllen. Die dritte Gruppe umfasst die Oberflächen-assoziierten Gliazellen. Hierzu gehören die Subperineurialglia und die Kanalglia, die die Blut-Nerven-Schranke um das Bauchmark bilden bzw. die Dorsoventralkanäle auskleiden. Diese Klassifizierung konnte anhand von molekularen Markern bestätigt werden (Beckervordersandforth et al., 2008). Die Klasse der Perineurialglia wird ebenfalls zur Gruppe der Oberflächen-assoziierten Gliazellen gezählt. Diese Zellen bilden bereits am Ende der Embryogenese eine dicke extrazelluläre Matrix, das Neurilemm, als äußerste Schicht um das ZNS. Gliazellen dieser Klassen konnten bisher allerdings lediglich in den larvalen Stadien identifiziert werden (Stork et al., 2008). Aus welchen Vorläuferzellen sie hervorgehen ist bisher unbekannt.

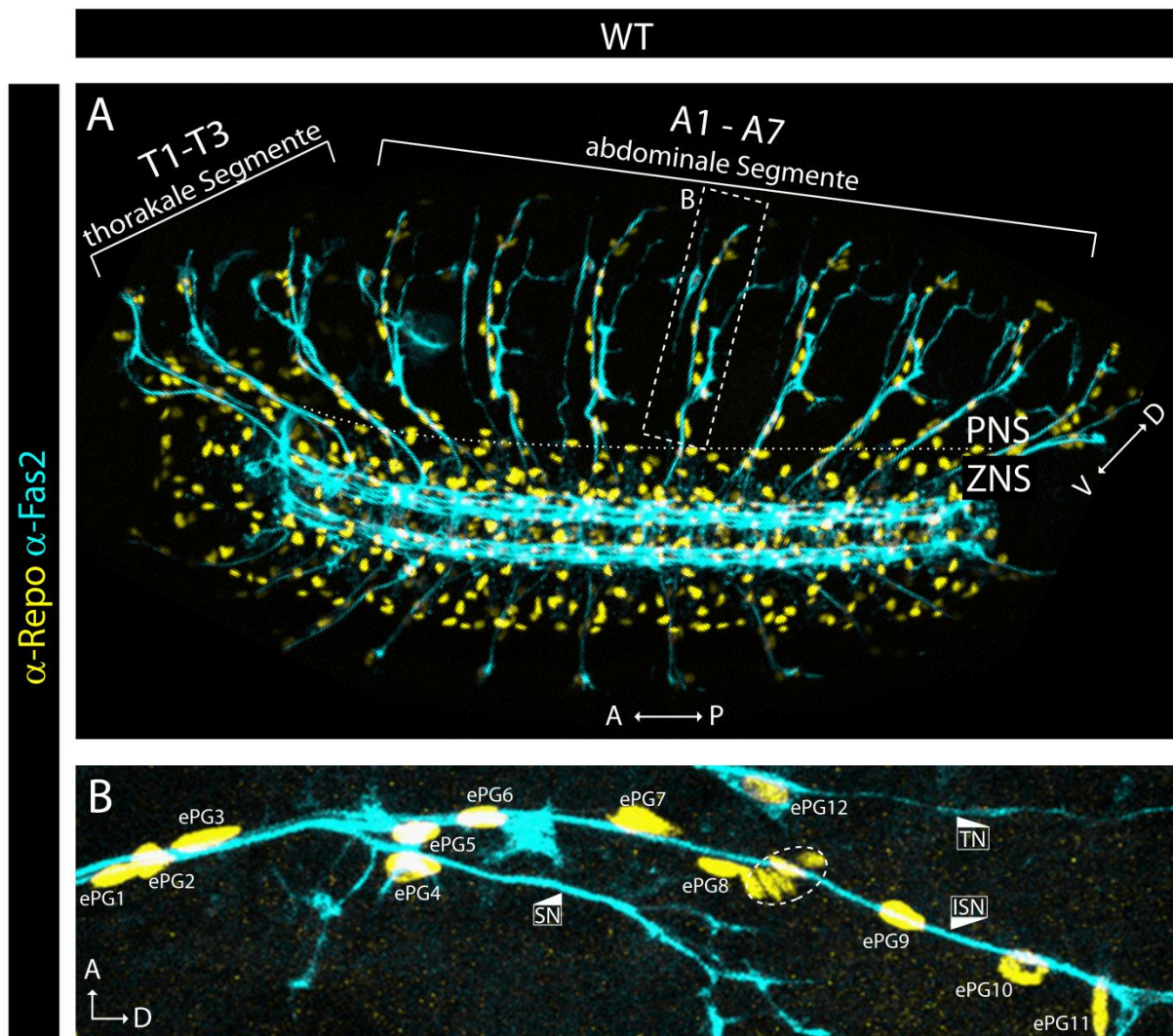
### 1.2.2. Die Gliazellen des PNS

Wie bereits erwähnt, zeigt das Nervensystem segmentale Unterschiede zwischen gnathalen, thorakalen und abdominalen Segmenten, was sich unter anderem auf die Anzahl der ePG auswirkt (Abb. 1.2A). Aus diesem Grund bezieht sich die folgende Beschreibung lediglich auf die abdominalen Segmente A1 bis A7, die eine identische Entwicklung durchlaufen. Der gliale Anteil des PNS wird von insgesamt 12 Zellen pro abdominalen Hemisegment gebildet (Abb. 1.2B). Die Zellen wurden als ePG1 bis 12 benannt, wobei am Ende der Embryogenese jede Zelle an ihrer individuellen Lage entlang der peripheren Nerven identifizierbar ist.

ePG1 bis ePG3 liegen in dem Bereich des ventralen PNS, in dem die beiden peripheren Nerven, Intersegmentalnerv (ISN) und Segmentalnerv (SN), sehr eng miteinander faszikuliert sind. Weiter dorsal spalten sich der ISN und der SN auf. In diesem Bereich liegen ePG4 am SN und ePG5, deren Zellkern meistens zwischen den beiden Nerven positioniert ist. Weiter dorsal liegen am ISN ePG6 bis ePG9, wobei ePG7 an ihrem, im Vergleich zu den übrigen ePG, vergrößerten Zellkern zu erkennen ist. Im dorsalen Bereich des PNS liegen ePG10 am ISN und ePG11, beide Zellen liegen relativ isoliert und sind auf diese Weise leicht zu erkennen. ePG12 ist die einzige Gliazelle, die mit dem Transversalnerv (TN) assoziiert ist. Aufgrund ihrer isolierten Lage ist auch diese Zelle leicht zu identifizieren. Zusätzlich zu ihrer charakteristischen Position lässt sich jede Zelle anhand einer individuellen Kombination von molekularen Markern identifizieren (von Hilchen et al., 2008). Zusätzlich zu den ePG werden bei einer Antikörperfärbung gegen den glialen Transkriptionsfaktor Repo die fünf Ligamentzellen des lateralen Chordotonalorgans (Ich) angefärbt (Abb. 1.2B, gestrichelter Kreis). Dabei handelt es sich um einen internen Streckrezeptor, der unter der Epidermis lokalisiert ist. Diese Zellen werden nicht zu den ePG gezählt.

Interessanterweise überleben alle ePG bis zum Ende der larvalen Entwicklung. Für einzelne Zellen konnte sogar gezeigt werden, dass sie über die Metamorphose hinaus, bis in die adulte Fliege, bestehen bleiben. Im gesamten Zeitraum behalten alle Zellen ihre individuelle Position bei, zudem kommt es lediglich bei ePG2 zu weiteren Zellteilungen (von Hilchen et al., 2013). Aufgrund der morphologischen Unterschiede, die im Laufe der Entwicklung entstehen, können die ePG in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden können (Stork et al., 2008, Xie and Auld, 2011). Jede Gruppe bildet dabei eine Schicht um die Axone der peripheren Nerven und übernimmt, ähnlich wie die Gliazellen des ZNS, eine bestimmte Aufgabe. Die innerste Schicht besteht aus den *wrapping glia*. Diese Gruppe besteht aus ePG1, ePG5 und ePG9. Die Aufgabe dieser Zellen besteht in der Umhüllung und damit der Isolierung einzelner Axone, sie sind damit analog zu den Neuropil-assoziierten Gliazellen des ZNS. Als nächstes folgt die Schicht der Subperineurialglia, bestehend aus ePG3, ePG4, ePG7 und

ePG10. Die Zellen dieser Gruppe sind untereinander über *septate junctions* verbunden und bilden ähnlich wie im ZNS die Blut-Nerven-Schranke. Die äußerste Schicht besteht aus den Perineurialglia, diese Gruppe setzt sich aus ePG2, genauer gesagt aus den Nachkommen dieser Zelle, ePG6 und ePG8 zusammen (von Hilchen et al., 2013). Diese Zellen bilden bereits im späten Embryo das Neurilemm, die äußerste Schicht der peripheren Nerven (Stork et al., 2008).



**Abb. 1.2: Nervensystem des Embryos**

(A) Ventrolaterale Ansicht eines Embryos im späten Stadium 16. Angefärbt sind die Kerne der Gliazellen (gelb) und die Axone der Motorneurone (cyan). Die Grenze zwischen dem ZNS und PNS ist durch eine gepunktete Linie markiert. Die Nerven des PNS lassen sich den einzelnen Segmenten zuordnen. Von anterior (A) nach posterior (P) zuerst den drei thorakalen Segmenten (T1-T3) und den abdominalen Segmenten A1-A7. Am posterioren Ende befinden sich die Nerven der terminalen Segmente. V = ventral, D = dorsal. (B) Vergrößerter Ausschnitt des PNS eines abdominalen Hemisegments. Markiert sind die peripheren Nerven Segmentalnerv (SN), Intersegmentalnerv (ISN) und Transversalnerv (TN); die 12 ePG und die Ligamentzellen des lateralen Chordotonalorgans (Ich, gestrichelter Kreis). (Originalaufnahmen: T. Altenhein/C. von Hilchen)

### 1.3. Migration der ePG

Die Mehrzahl der ePG (ePG1 bis ePG9) wandert von der Grenze zwischen ZNS und PNS in dorsale Richtung. Für diese Zellen wird an dieser Stelle der Begriff der zentral generierten ePG eingeführt. Die Gruppe besteht aus den Nachkommen der folgenden NGB: NB1-3 (ePG1, ePG3, ePG7 und ePG9), NB5-6 (ePG2) und NB2-5 (ePG6 und ePG8) sowie einem SOP (ePG4 und ePG5) (von Hilchen et al., 2008).

Die Migration der zentral generierten ePG beginnt in Stadium 13, nachdem die Axone der ersten Motorneurone die Peripherie erreicht haben (Sepp et al., 2000). *In vivo* 4D-Aufnahmen sowie die Analyse verschiedener molekularer Marker zeigen, dass diese Zellen in einer stereotypen Reihenfolge migrieren (von Hilchen et al., 2008). ePG9 startet als erste Zelle (Abb. 1.3A), gefolgt von ePG7, die anhand ihres vergrößerten Zellkerns identifiziert werden kann (Abb. 1.3B). Die zentral generierten ePG migrieren als perlenschnurartige Zellkette hintereinander (Abb. 1.3C), wobei die Reihenfolge von den meisten Zellen während der gesamten Migration eingehalten wird. Ausnahmen sind ePG6 und ePG8, die sowohl die übrigen ePG als auch teilweise sich gegenseitig überholen (von Hilchen et al., 2008) (vgl. Abb. 1.3B und C). Die übrigen ePG (ePG10 bis ePG12) werden von SOPs gebildet und zeigen ein individuelles Migrationsverhalten. ePG10 wird im späten Stadium 13 sehr weit dorsal geboren (Abb. 1.3A) und migriert ab Stadium 14 am ISN in ventrale Richtung (Abb. 1.3B). Am Ende der Embryogenese liegt sie dorsal von ePG9 am ISN (Abb. 1.3D). ePG11 migriert dagegen während der gesamten Embryonalentwicklung nicht. ePG12 ist die einzige Zelle dieser Gruppe, die während der Migration den Nerv und damit das Substrat wechselt. Zunächst wandert sie, noch bevor die Migration von ePG9 startet, am ISN entlang (Abb. 1.3A), wechselt dann jedoch die Migrationsrichtung und wandert nach anterior weiter (Abb. 1.3B). Dort ist sie am Ende der Embryogenese mit dem TN assoziiert (Abb. 1.3C und D). Im Folgenden möchte ich zunächst einen kurzen Überblick über die bisher bekannten Faktoren geben, die an der Migration der ePG beteiligt sind. Außerdem gehe ich kurz auf zelluläre Interaktionen der Gliazellen während der Migration ein.

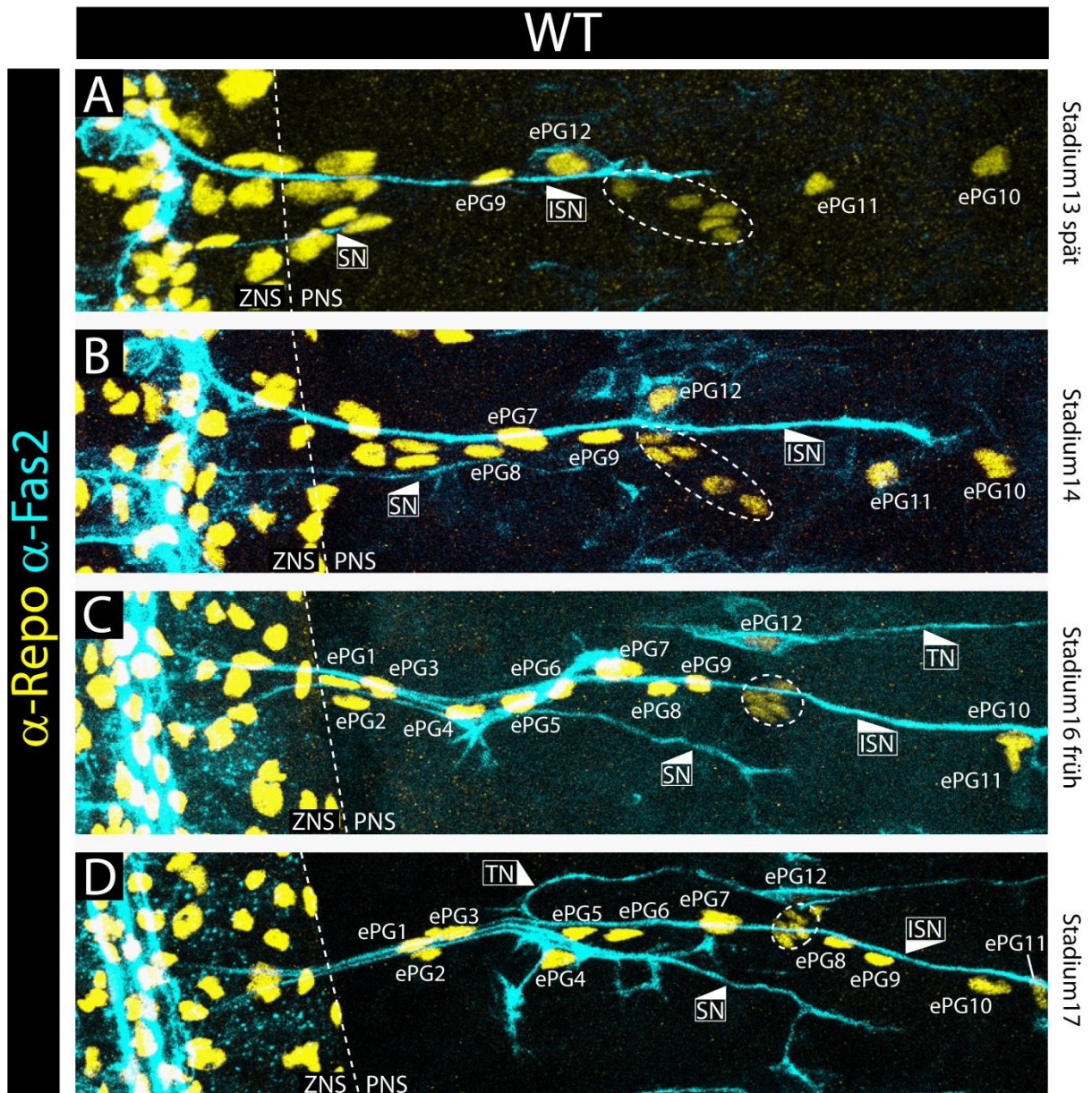
#### 1.3.1. Welche Faktoren sind an der Migration der ePG beteiligt?

Die ePG sind in vielen Aspekten eine sehr heterogene Gruppe. Das betrifft sowohl die Herkunft der Zellen, die von verschiedenen NGBs oder SOPs generiert werden. Außerdem exprimiert fast jede Zelle eine individuelle Kombination an molekularen Markern. Diese Unterschiede zeigen sich auch bei der Migration der ePG. So konnte gezeigt werden, dass die Migration von zwei Zellen (ePG6 und ePG8) über den Transmembranrezeptor Unc-5 und seinen Liganden Netrin-B (NetB) gesteuert wird (von Hilchen et al., 2010). Des Weiteren zei-

gen die ePG bei Mutanten verschiedener anderer Gene Migrationsdefekte, darunter *Notch* (Edenfeld et al., 2007) *fear-of-intimacy (foi)* (Pielage et al., 2004), *nejire (nej)*, *tango (tgo)* (Schmidt et al., 2011), *crooked neck (crn)* und *held out wings (how)* (Edenfeld et al., 2006). Wobei der Transmembranrezeptor Notch eine Rolle bei der Initialisierung der Migration übernimmt, das Transmembranprotein Foi dagegen das Ende der Migration kontrolliert. Bei Nej und Tgo handelt es sich wiederum um Transkriptionsfaktoren, die vermutlich für die Expression von Faktoren verantwortlich sind, die während der Migrationsphase benötigt werden. Crn ist ein Spleißfaktor, der in Kombination mit dem RNA-bindenden Protein How für die terminale Differenzierung der ePG und somit für die Umhüllung der Axone wichtig ist. Ob diese Faktoren bei der Migration aller ePG, bei einer Untergruppe oder sogar nur bei einzelnen ePG eine Rolle spielen, konnte bisher jedoch nicht gezeigt werden. Wie bei vielen anderen migrierenden Zellen scheint auch bei den ePG die Reorganisation des Aktinzytoskellets durch die kleinen GTPasen Rac1 und Rho1 reguliert zu werden (Sepp and Auld, 2003).

### **1.3.2. Interaktionen zwischen ePG und peripheren Nerven**

Neben den Faktoren, die eine zellautonome Funktion bei der Migration der ePG übernehmen, spielen vor allem Interaktion zwischen den ePG und den peripheren Nerven eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des PNS. Die ePG sind im frühen Stadium 12, bevor sie das ZNS verlassen und in dorsale Richtung migrieren, trichterförmig an der Grenze zwischen ZNS und PNS angeordnet und markieren dort den Austrittspunkt für das Axon des Pioniermotorneurons aCC (Sepp et al., 2000). Dieses Axon dient sowohl für die später auswandernden Motoraxone als auch für die Axone der sensorischen Neurone, die von der Peripherie ins ZNS projizieren, als Leitstruktur (Sepp et al., 2001). Kurz nachdem das Pionieraxon das ZNS verlassen hat (Stadium 13), beginnt die Migration der ePG. Die Zellen bleiben dabei immer eng mit den Axonen der peripheren Nerven assoziiert und nutzen diese als Substrat. Die ePG scheinen dabei bevorzugt mit den sensorischen Axonen zu interagieren (Sepp et al., 2000, Edenfeld et al., 2007). Neuere Arbeiten zeigen, dass die Migration der ePG mittels eines Gradienten des Adhäsionsmoleküls Fas2 entlang der peripheren Nerven reguliert wird (Silies and Klämbt, 2010).



**Abb. 1.3: Migration der ePG**

Abgebildet ist je ein Hemisegment eines präparierten Embryos in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Die Grenze zwischen dem ZNS auf der linken Seite und dem PNS ist durch eine gestrichelte Linie dargestellt. Mit Hilfe eines Antikörpers gegen den glialen Transkriptionsfaktor Repo können die Zellkerne der Gliazellen (gelb) detektiert werden. Ein Antikörper gegen das axonale Adhäsionsmolekül Fas2 (cyan) markiert Motoraxone. Markiert sind die peripheren Nerven SN, ISN und TN, die eindeutig identifizierbaren Gliazellen ePG7, ePG9, ePG10, ePG11 und ePG12 sowie die Ligamentzellen des lateralen Chordotonalorgans (Ich, gestrichelter Kreis). Die Migration der ePG beginnt im Stadium 13. Zu diesem Zeitpunkt sind fast alle zentral generierten ePG an der Grenze zwischen ZNS und PNS lokalisiert. Lediglich ePG9 migriert entlang des ISN in dorsale Richtung. ePG12 ist zu diesem Zeitpunkt noch mit dem ISN assoziiert. ePG10 liegt dorsal von ePG11 in der Peripherie. Im Stadium 14 folgen ePG7 und die übrigen zentral generierten ePG ePG9 in dorsale Richtung. ePG12 löst sich vom ISN und wandert in anteriore Richtung. Der ISN ist deutlich verlängert und reicht zu diesem Zeitpunkt bis zu ePG11. ePG10 wandert in ventrale Richtung. Im Stadium 16 haben die ePG ihre charakteristischen Positionen an den peripheren Nerven fast erreicht, ePG12 liegt jetzt am TN. Im Stadium 17 ist die Migration der ePG abgeschlossen. (Originalaufnahmen von C. von Hilchen)



### 1.3.3. Interaktionen zwischen den ePG untereinander

Während der Migration interagieren die ePG nicht nur mit den Axonen der peripheren Nerven, die ihnen als Substrat dienen, sondern auch untereinander. Beispielsweise können ePG6 und ePG8 die übrigen ePG, die als perlenschnurartige Zellkette hintereinander migrieren, ihrerseits überholen. Das deutet darauf hin, dass diese beiden Zellen die anderen ePG, die direkt mit dem Nerv assoziiert sind, als Substrat nutzen. Außerdem scheint ePG9 als Pionierglia die Migration der übrigen ePG zu leiten. Darauf deutet zum einen die Morphologie der Zelle hin, die im Vergleich zu den übrigen ePG vermehrt Membranausläufer bildet (Sepp and Auld, 2003). Zum anderen zeigen Experimente, dass die Ablation von ePG9, die Migration aller zentral generierten ePG stoppt (Altenhein et al., in Vorbereitung).

### 1.4. Ziel der Arbeit

Wie aus der Darstellung ersichtlich wurde, handelt es sich bei den ePG um keine homogene Zellpopulation, vielmehr lässt sich bei fast allen Zellen ein individuelles Verhalten beobachten. Das gilt sowohl für die Funktion innerhalb des PNS, als auch für die Migration während der Embryogenese. Auf zellulärer Ebene ist die Migration der ePG bereits sehr detailliert untersucht. So konnte gezeigt werden, dass einige Zellen einzeln und unabhängig von den übrigen ePG migrieren, andere wandern in Gruppen, wobei eine Zelle als Pionierglia die Migration der übrigen lenkt. Bisher weitgehend unbekannt ist jedoch, welche Signalmoleküle die Migration der einzelnen Zellen, bzw. der Zellgruppen steuern. Lediglich für ePG6 und ePG8 konnte der Transmembranrezeptor Unc-5 und der sezernierte Ligand NetB identifiziert werden.

Während meiner Diplomarbeit wurden von mir einige Faktoren untersucht, die als Bestandteil von intrazellulären Signalkaskaden an der Migration unterschiedlicher Zellpopulationen beteiligt sind. Dabei wurde ursprünglich das Ziel verfolgt, Faktoren zu identifizieren, die Teil des von Unc-5 ausgehenden Signalwegs in ePG6 und ePG8 sind. Dazu wurden Mutanten der verschiedenen Faktoren analysiert und gezielt nach dem Phänotyp gesucht, der für *unc-5* bzw. *NetB* Mutanten beschrieben wurde. Zwar konnte dabei kein Faktor als Teil des Unc-5 Signalwegs identifiziert werden, allerdings traten bei einem Großteil der analysierten Faktoren Veränderungen im Muster der ePG auf. Aufgrund des starken glialen Phänotyps rückte im Weiteren der Faktor *myoblast city (mbc)* in den Fokus meiner Arbeit. *mbc* kodiert für einen nicht kanonischen GTP-Austauschfaktor (*engl. non canonical guanine nucleotide exchange factor*, GEF) für die kleine GTPase Rac1. *Mbc* ist damit an der Aktivierung von Rac1 durch den Austausch von GDP zu GTP beteiligt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Funktion von *Mbc* während der Migration der ePG zu analysieren. Im Einzelnen wurde un-

tersucht, ob Mbc eine zellautonome Funktion während der glialen Wanderung übernimmt oder ob es sich bei den glialen Phänotypen um sekundäre Effekte handelt. Außerdem wurden bereits bekannte Interaktionspartner von Mbc analysiert, um einen möglichst vollständigen Überblick über den Signalweg während der glialen Migration zu erlangen. Zuletzt wurde untersucht, ob Mbc bei der Migration aller ePG oder lediglich bei einer Untergruppe oder einzelnen Zellen notwendig ist.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1. Herstellung von cDNA

Für die Herstellung von cDNA wurde zunächst RNA aus wildtypischen Embryonen von *D. melanogaster* und *Drosophila virilis* isoliert. Beide Spezies wurden von der Stammsammlung des Instituts für Genetik (Mainz) bezogen. Die Daphnien (*Daphnia species*), die in der Aquaristik als Lebendfutter verwendet werden, wurden über den Zoofachhandel bezogen (Amtra Croci, Castronno, Italien). In diesem Fall wurde RNA aus adulten Tieren isoliert. Welcher Spezies die Tiere angehören, konnte nicht ermittelt werden. Für die Isolation der RNA wurde das *Rneasy Mini Kit* (Qiagen) nach dem angegebenen Protokoll verwendet. Für die reverse Transkription der mRNA wurde das *Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit* (Roche) nach Angaben des Herstellers verwendet.

#### 2.1.2. PCR und Sequenzierung

Bei allen Standard-PCRs wurde die *Taq DNA-Polymerase* (Qiagen) nach dem angegebenen Protokoll verwendet. Für das Design der Primer wurde das Programm *Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator 3.26* (Kibbe, 2007) verwendet. Die Annealingtemperatur der Primer wurde mit Hilfe des Programms *Tm Calculator* der Firma NEB berechnet. Die Primer wurden von den Firmen Sigma-Aldrich und biomers.net bezogen. Alle Sequenzierungen wurden von der Firma StarSEQ durchgeführt. In Tab. 2.1 sind alle verwendeten Sequenzierprimer aufgeführt.

Tab. 2.1: Liste der verwendeten Sequenzierprimer

Name	Sequenz
P1-HSP70pcr	CCA GCA ACC AAG TAA ATC AAC TG
Mbc Exon 1 fwd	GTG TGT GGA GCG ACT GCA ATG CC
Mbc Exon4 (1129bp) fwd	ATG CAC GCT GTT CAG CGC
Mbc Exon5 (1808bp) fwd nested	AGC AGA TAA AGG AAG AAT TTC CAC GC
Mbc Exon 5 fwd	TAT CGG TGG ACT TAC TCT CTT GCC
Mbc-Exon8	TAC TGC CCG TGT TCT GCA AAC AC
Mbc Exon10 (4526bp) rev	TGT GCA GCT TAA GCG TGA ACG CCG
Mbc Exon10 (4492bp) fwd	GCT CTG CAC ATG GAG TTC G
Mbc Exon10 (5008bp) fwd	TGA GCT CAT GCA AAC GC

Mbc Exon10 (5513bp) fwd	GGA TCC GGC TGT AAT GGG
MBC seq-1F	GCG ACG CTG AAT ACA AGC
P4-sv40UTRnested	GTC CAA TTA TGT CAC ACC ACA AG

### 2.1.3. Sequenzierung von pUASTattB\_ *mbc-RA*::HA

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere UAS-Konstrukte auf der Basis des Vektors pUASTattB\_ *mbc-RA*::HA (im weiteren als UAS-*mbc-RA* bezeichnet) aus dem Labor von Susan Abmayr hergestellt. Als Insert trägt der Vektor Teile des 5' UTR (*engl. untranslated region*), sowie die gesamte kodierende Sequenz von *mbc-RA*. Am 3' Ende schließt sich statt des endogenen Stopcodons die kodierende Sequenz eines *HA-tags* an. Dabei handelt es sich um einen kleinen Teil des Oberflächenproteins *Human influenza hemagglutinin* (Aminosäure 98-106) das dem Protein Mbc-PA angehängt wird und als Epitop für Antikörper fungiert. Mit Hilfe des *HA-tags* kann z. B. die Expression des rekombinanten Proteins detektiert werden. Zusätzlich trägt der Vektor eine *PhiC31 attB site*, die genutzt werden kann um den Vektor an einer definierten Stelle im Genom zu integrieren, und ein *mini-white* Gen, das genutzt wird, um transgene Fliegen zu selektieren. Um zunächst die vollständige Sequenz des Inserts zu erhalten, wurde dieser Bereich des Vektors vollständig sequenziert (Anhang 1). Alle im Rahmen dieser Arbeit klonierten UAS-Konstrukte basieren auf diesem Vektor und verfügen somit über alle genannten Merkmale.

### 2.1.4. Klonierung von pUASTattB\_ *mbc-RB*

Um den Vektor pUASTattB\_ *mbc-RB*::HA (im weiteren als UAS-*mbc-RB* bezeichnet) herzustellen wurde zunächst mit Hilfe von Standard-PCRs zwei benachbarte Bereiche von *mbc-RB* aus embryonaler cDNA amplifiziert (Abb. 2.1). Beide PCR-Produkte beinhalten Exon 9 und überlappen in diesem Bereich. Von jedem der beiden PCR-Produkte wurde durch eine zweite PCR ein etwas kleineres Fragment amplifiziert. Durch die verwendeten Primer wurden bei diesen PCRs Schnittstellen für das Restriktionsenzym *AvrII* (CCTAGG) im überlappenden Bereich der beiden Fragmente eingeführt (die Sequenzen von allen verwendeten Primern sind in Tab. 2.2 angegeben). Dabei wurde darauf geachtet, dass die veränderte Sequenz für die selben Aminosäuren kodiert wie im Template. Die beiden PCR-Produkte wurden anschließend direkt in einen Vektor kloniert. Dazu wurde das *TOPO TA Cloning® Kit Dual Promotor pCT®II-TOPO® Vector* (Invitrogen) nach dem angegebenen Protokoll verwendet. Um die klonierten Fragmente auf Fehler zu untersuchen und die Orientierung in den Vektoren zu bestimmen, wurden die Fragmente sequenziert. Die Sequenzen zeigen mehrere Unterschiede zu der annotierten Sequenz von *mbc-RB* (siehe Anhang 2, rot markiert), die allerdings nicht zu einem Austausch der kodierten Aminosäuren

führen. Zwei Vektoren mit einer geeigneten Orientierung der Fragmente (TOPO\_Frag1 und TOPO\_Frag2, Abb. 2.1) wurden anschließend mit *KpnI* und *AvrII* verdaut. Im Fall von TOPO\_Frag1 wurden die beiden entstehenden Fragmente mittels Gelextraktion (*QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen)) voneinander getrennt und das Fragment, das das PCR-Produkt der zweiten PCR enthält wurde mit dem geschnittenen TOPO\_Frag2 ligiert. Der so gewonnene Vektor TOPO\_Frag1+2 der einen Teil der kodierenden Sequenz von *mbc-RB* enthält wurde wiederum mit *Bsu36I* und *BstEII* verdaut und die beiden entstehenden Fragmente durch Gelextraktion voneinander getrennt. Gleichzeitig wurde der Vektor UAS-*mbc-RA* ebenfalls mit den Restriktionsenzymen *Bsu36I* und *BstEII* geschnitten und auch hier die beiden entstehenden Fragmente durch Gelextraktion getrennt. Durch die Ligation des Fragments, das den durch die beiden PCRs amplifizierte Bereich umfasst, mit dem größeren Fragment des verdauten Vektors UAS-*mbc-RA*, konnte der Vektor UAS-*mbc-RB* generiert werden (Abb. 2.2). Um auszuschließen, dass es bei der Klonierung zu Veränderungen der Sequenz kam die zu Aminosäureaustauschen führen, wurde der Bereich zwischen der *Bsu36I* und der *BstEII* Schnittstelle sequenziert (Anhang 2).

**Tab. 2.2: Liste der verwendeten Primer zur Klonierung von UAS-*mbc-RB* (Primerpaare sind durch gestrichelte Linien getrennt)**

Name	Sequenz
Mbc Exon5 (1660bp) fwd	GAC TTC CGA GGC AAC ATA GAC CTG C
Mbc Grenze Exon9 (3382bp)rev	TTG ATG CAC TCG GCA ATC TTT TTG TTG GC
Mbc Grenze Exon9 (3273bp) fwd	GAG GAG GGA GAC TCG AAA ACC G
Mbc Exon10 (4526bp) rev	TGT GCA GCT TAA GCG TGA ACG CCG
Mbc Exon5 (1808bp) fwd nested	AGC AGA TAA AGG AAG AAT TTC CAC GC
Mbc Exon9 (3329bp) mit <u>AvrII</u> rev	TTT CTG <u>TCC TAG GAC</u> TTT GGC GG
Mbc Exon9 (3333bp) mit <u>AvrII</u> fwd	CAA AGT <u>CCT AGG ACA</u> GAA AAA ATC CC
Mbc Exon10 (4386bp) rev nested	GCG ATT CTC CTT GCT CTC ATC C

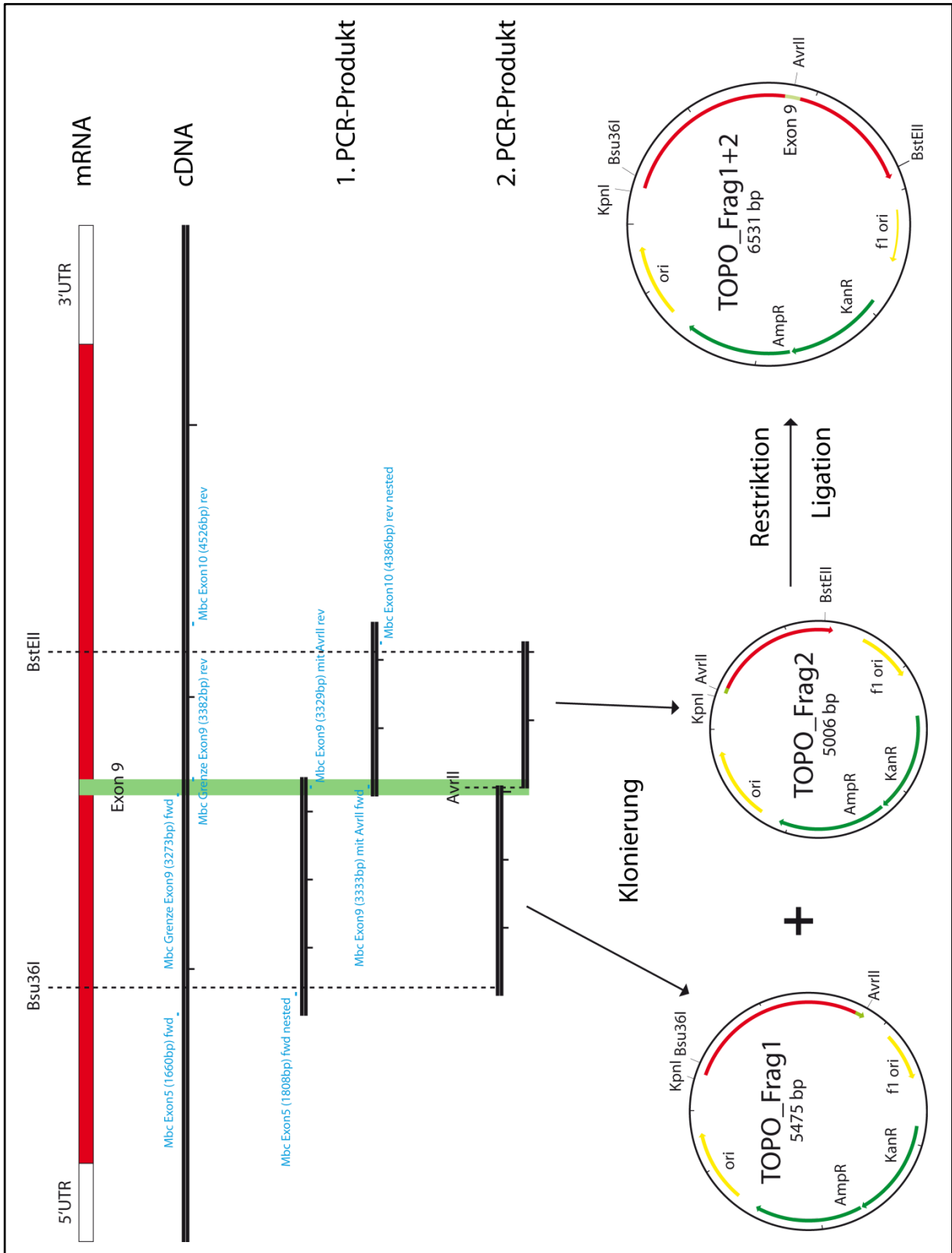
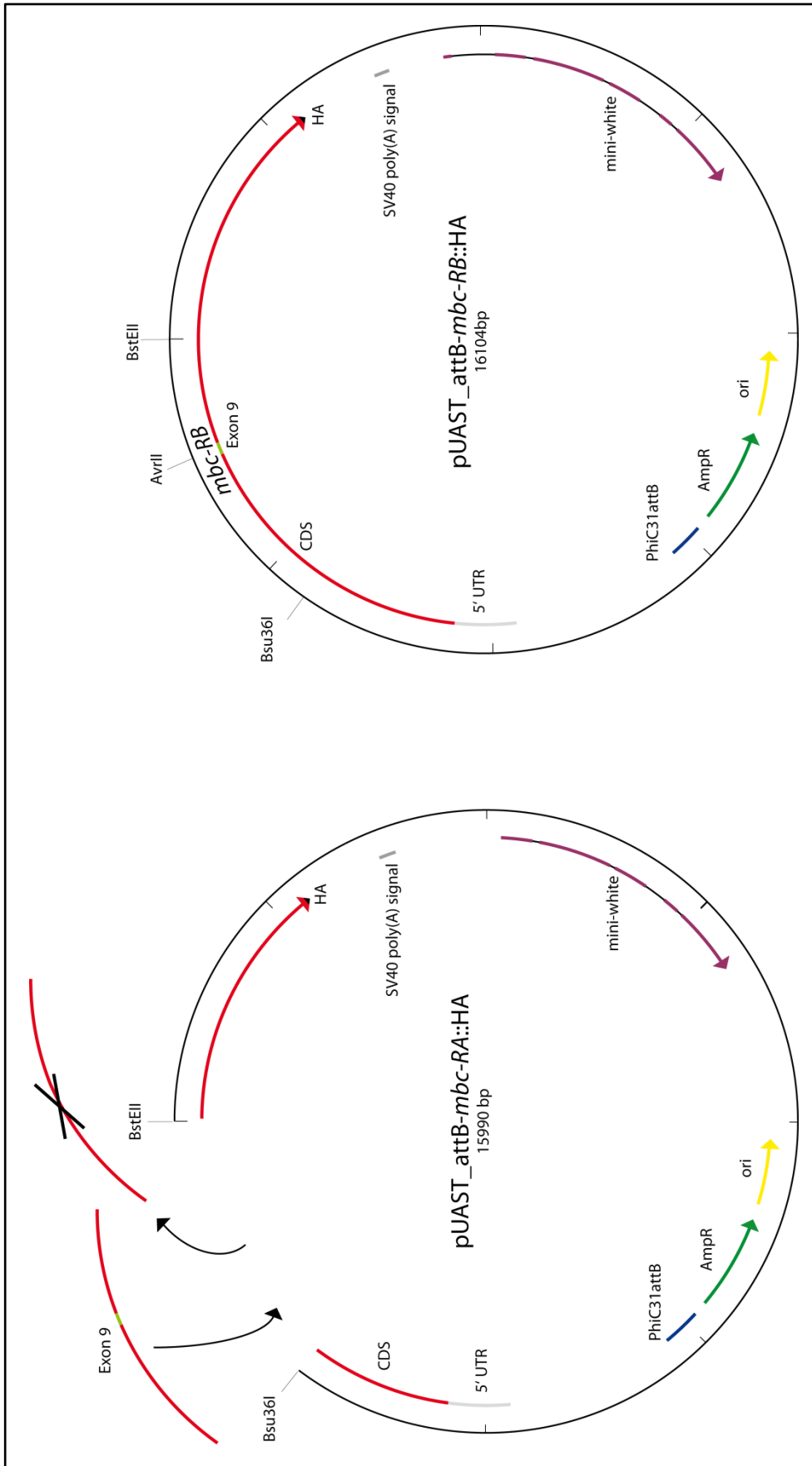


Abb. 2.1: Klonierungsstrategie für UAS-*mbc-RB* (Teil 1)

Details siehe Text.



**Abb. 2.2: Klonierungsstrategie für UAS-*mbc-RB* (Teil 2)**

Vektorkarte von UAS-*mbc-RA* und UAS-*mbc-RB*. Details siehe Text.

### 2.1.5. Mutagenese von UAS-*mbc-RB*

Die potenziellen Phosphorylierungsstellen in dem von Exon 9 kodierten Bereich wurden mit Hilfe einer restriktionsfreien Klonierung (RF-Klonierung) mutiert (Unger et al., 2010). Mit dieser Methode ist es möglich gezielt einzelne Nukleotide in einem Vektor zu verändern und so die gewünschten Mutationen hervorzurufen. Zunächst müssen dazu Primerpaare entworfen werden, von denen einer die Stelle überspannt, die mutiert werden soll und die gewünschte Mutation trägt. Der zweite Primer muss etwa 100 bp entfernt binden. Auf diese Weise kann in einer ersten PCR ein Megaprimer produziert werden, der sich über die Sequenz zwischen den beiden Primern erstreckt. Die Primer, die für die Herstellung der phosphomutanten Konstrukte benutzt wurden sind in Tab. 2.3 aufgelistet. Zusätzlich zu den Veränderungen in der Sequenz die zum Austausch der phosphorylierbaren Aminosäuren führen (rot markiert) ist in der Primersequenz eine neue *AleI* Schnittstelle (unterstrichen) enthalten, die die Identifikation der mutierten Vektoren durch eine Testrestriktion ermöglicht. Die Primer wurden in der Kombination 1-2 (MP1), 3-4 (MP2), 1-4 (MP3), 3-5 (MP4) und 1-5 (MP5) verwendet.

**Tab. 2.3: Liste der verwendeten Primer für die Mutagenese von UAS-*mbc-RB* (Die rot markierten Mutationen führen zum Austausch der phosphorylierbaren Aminosäuren. Die gelb markierten Mutationen führen zu einer neuen *AleI* Schnittstelle (unterstrichen).)**

	Name	Sequenz
1	Mbc Grenze Exon9 (3273bp) fwd mut	GAG GAG GGA GAC <b>G</b> CG AAA ACC G
2	Mbc Exon9 (3364bp) rev	TTG GCAG TCG TAT <u>CAC ATG T</u> <b>G</b> T GC
3	Mbc Grenze Exon9 (3273bp) fwd	GAG GAG GGA GAC TCG AAA ACC G
4	Mbc Exon9 (3364bp) rev mut	CAG <b>G</b> GG <b>C</b> AT <u>CAC ATG T</u> <b>G</b> T GC
5	Mbc Exon9 rev mut neu	TTG TTG GCA G <b>C</b> C G <b>C</b> A TCA C

Um die Megaprimer herzustellen wurde folgende PCR durchgeführt:

#### PCR-Ansatz:

2 µl	5' Primer (10 µM)
2 µl	3' Primer (10 µM)
0,5 µl	dNTPs (10 mM)
0,25 µl	Q5® High-Fidelity DNA-Polymerase (NEB)
5 µl	5X Q5 Reaction Buffer (NEB)
0,2 µl	Template-DNA (UAS- <i>mbc-RB</i> , 183,5 ng/µl)
10,05 µl	ddH <sub>2</sub> O



### Thermocyclerprogramm:

Denaturierung	98 °C	30 sek	← 35x
Denaturierung	98 °C	10 sek	
Annealing	71 °C	20 sek	
Elongation	72 °C	20 sek	
finale Elongation	72 °C	5 min	

Die Sequenzen der Megaprimer sind in Tab. 2.4 angegeben.

**Tab. 2.4: Sequenzen der Megaprimer (Primer sind kursiv dargestellt. Die rot markierten Mutationen führen zum Austausch der phosphorylierbaren Aminosäuren. Die gelb markierten Mutationen führen zu einer neuen *AleI* Schnittstelle (unterstrichen).)**

MP1	<i>GAGGAGGGAGAC</i> <u>CG</u> AAAAACCGATATCTGGCAGCAAGAAAAGAATCTTTGAAAAGCCGCCAAAGTCTAGGACAGAAAAATCCCAACTGCA <u>CACATGTGATACGACTGCCAA</u>
MP2	<i>GAGGAGGGAGACTCG</i> AAAAACCGATATCTGGCAGCAAGAAAAGAATCTTTGAAAAGCCGCCAAAGTCTAGGACAGAAAAATCCCAACTGCA <u>CACATGTGAT</u> <u>CC</u> <u>CTG</u>
MP3	<i>GAGGAGGGAGAC</i> <u>CG</u> AAAAACCGATATCTGGCAGCAAGAAAAGAATCTTTGAAAAGCCGCCAAAGTCTAGGACAGAAAAATCCCAACTGCA <u>CACATGTGAT</u> <u>CC</u> <u>CTG</u>
MP4	<i>GAGGAGGGAGACTCG</i> AAAAACCGATATCTGGCAGCAAGAAAAGAATCTTTGAAAAGCCGCCAAAGTCTAGGACAGAAAAATCCCAACTGCA <u>CACATGTGAT</u> <u>CC</u> <u>CTGCCAACAA</u>
MP5	<i>GAGGAGGGAGA</i> <u>CG</u> AAAAACCGATATCTGGCAGCAAGAAAAGAATCTTTGAAAAGCCGCCAAAGTCTAGGACAGAAAAATCCCAACTGCA <u>CACATGTGAT</u> <u>CC</u> <u>CTGCCAACAA</u>

Nach der Aufreinigung mit dem *PCR-Purification Kit* (Qiagen) wurde die Megaprimer MP1-MP3 für eine weitere PCR verwendet. Das Ziel hierbei ist, ausgehend vom Megaprimer den gesamten als Template-DNA dienenden Vektor zu amplifizieren.

### PCR-Ansatz:

3 µl	Megaprimer (≈100 ng)
1,5 µl	dNTPs (10 mM)
1,5 µl	KAPAHiFi™ DNA-Polymerase (peqlab)
10 µl	5x Reaktionspuffer(peqlab)
0,1 µl	Template-DNA (TOPO_Frag1+2, ≈20 ng)
33,9 µl	ddH <sub>2</sub> O

### Thermocyclerprogramm:

	95 °C	Hot Start	← 30x
Denaturierung	95 °C	5 min	
Denaturierung	95 °C	20 sek	
Annealing	63 °C	45 sek	
Elongation	72 °C	3,5 min	
finale Elongation	72 °C	10 min	

Die Template-DNA für diese PCR wurde ursprünglich aus Bakterien isoliert und ist deshalb teilweise methyliert. Die während der PCR synthetisierten DNA-Moleküle weisen dagegen keine Methylierung auf. Aus diesem Grund ist es möglich mit dem Restriktionsenzym *DpnI*, das ausschließlich methylierte DNA schneiden kann, selektiv die Template-DNA zu verdauen. Bei der anschließenden Transformation sollten somit mehrheitlich neusynthetisierte Vektoren vorliegen, die die gewünschten Mutationen tragen. Anhand der zusätzlichen *AleI* Schnittstelle konnte in nächsten Schritt zwischen den Ausgangsvektoren und den Vektoren

mit der gewünschten Mutation unterschieden werden. Allerdings stellte sich bei der Sequenzierung der Vektoren heraus, dass lediglich eine der beiden Mutationen am 3' Ende von MP2 und MP3 im Vektor vorhanden waren. Daher wurden neue Megaprimer (MP4 und MP5) hergestellt und für eine zweite PCR eingesetzt. Als Template diente ein Vektor, der bereits über die *AleI* Schnittstelle und die erste Mutation verfügte. Auf diese Weise war es möglich Vektoren herzustellen, die über alle gewünschten Mutationen verfügen. Um den mutierten Teil von *mbc-RB* in den Vektor UAS-*mbc-RA* zu integrieren, wurde, genau wie bei der Herstellung von UAS-*mbc-RB*, der Bereich zwischen der *Bsu36I*- und *BstEII*-Schnittstelle ausgetauscht. Bei allen drei Vektoren pUASTattB-*mbc-RB*<sup>S905A</sup>::HA, pUASTattB-*mbc-RB*<sup>T935AT936A</sup>::HA und pUASTattB-*mbc-RB*<sup>S905AT935AT936A</sup>::HA (ab hier jeweils als UAS-*mbc-RB*<sup>S905A</sup>, UAS-*mbc-RB*<sup>T935AT936A</sup> und UAS-*mbc-RB*<sup>S905AT935AT936A</sup> bezeichnet) wurde jeweils die Sequenz des ausgetauschten Stücks ermittelt und auf Fehler überprüft (siehe Anhang 3).

### 2.1.6. Herstellung von transgenen Fliegenstämmen

Für die Herstellung der transgenen Fliegenstämmen wurde die *PhiC31 attB site* der Vektoren für eine gerichtete Integration genutzt (Groth et al., 2004). Als Integrationsort wurde die *attachment site* (attP2) in der zytologische Bande 68A4 des dritten Chromosom im 5'-UTR des Gens *Molybdenum cofactor synthesis 1 ortholog (Mocs1)* gewählt. Sowohl die Injektion der verschiedenen UAS-Konstrukte als auch die Selektion von transgenen Fliegen wurde von der Firma BestGene Inc übernommen. In den meisten Fällen entstanden bei der Injektion eines Konstrukts mehrere transgene Individuen, von denen einzelne Fliegenstämmen etabliert wurden. Um sicherzugehen, dass von den UAS-Konstrukten das vollständige Transgen exprimiert werden kann, wurden Testkreuzungen mit einer geeigneten Gal4-Linie durchgeführt und das transgene Protein mittels Antikörperfärbung gegen den C-terminalen *HA-tag* detektiert. Für die späteren Experimente wurde immer der gleiche Stamm verwendet.

## 2.2. Fliegenarbeit

### 2.2.1. Fliegenzucht und Kreuzungen

Die verschiedenen Fliegenstämmen wurden in Kulturgefäßen gehalten, die mit Hilfe eines Schaumstoffstopfens luftdurchlässig verschlossen werden können. Als Nahrung diente sowohl den adulten Fliegen als auch den Larven *Drosophila*-Standardnährmedium. Die Stämme wurden während eines laufenden Experiments bei 25 °C gehalten. Um Fliegen mit unterschiedlichen Genotypen zu verkreuzen, mussten von einem der beiden Stämme jungfäuliche Weibchen gesammelt werden. Dazu wurden die adulten Fliegen eines Kulturgefäßes nach der Eiablage entfernt und die adulten Fliegen der nächsten Generation direkt nach dem

Schlüpfen betäubt, nach ihrem Geschlecht selektiert und die frisch geschlüpften Weibchen getrennt von den Männchen gesammelt. Da Männchen erst nach etwa vier Stunden nach dem Schlüpfen ihre Geschlechtsreife erhalten, musste die Selektion spätestens nach diesem Zeitraum erfolgen. Wenn genug jungfräuliche Weibchen vorhanden waren, wurden sie mit Männchen des zweiten Stammes in einem frischen Kulturgefäß verkreuzt.

### 2.2.2. Balancieren von Mutationen

Da die meisten Mutation homozygot letal wirken, würden sie normalerweise sehr schnell aus einer Population verschwinden. Um dies zu verhindern, werden bei *D. melanogaster* Balancerchromosomen benutzt. Durch große Inversionen und Translokationen, können diese Chromosomen nicht mit dem Chromosom paaren, auf dem die Mutation liegt. Auf diese Weise wird *Crossing over* zwischen den beiden Schwesterchromosomen verhindert. Außerdem tragen Balancerchromosomen eine rezessive Mutation, was dazu führt, dass Individuen mit zwei Balancerchromosomen sterben. Auf diese Weise können nur Fliegen überleben, die heterozygot für das Chromosom mit der Mutation und das Balancerchromosom sind. Zusätzlich tragen Balancerchromosomen verschiedene Marker, die es erlauben adulte Fliegen mit und ohne Balancerchromosom zu unterscheiden. Um homozygot mutante Embryonen zu selektieren, werden *Blue-* oder *Green-Balancer* verwendet. Embryonen, die einen dieser Balancer tragen, exprimieren bereits sehr früh während der Embryonalentwicklung  $\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -Gal) oder GFP und können so leicht von den homozygot mutanten Embryonen unterschieden werden.

### 2.2.3. Gal4/UAS-System

Mit Hilfe des Gal4/UAS-Systems (Brand and Perrimon, 1993) lässt sich jede beliebige RNA räumlich und zeitlich gerichtet exprimieren. Dazu sind zwei verschiedene Fliegenstämme nötig. Zum einen, eine so genannten Gal4- oder Treiberlinie, die unter der Kontrolle eines Enhancers den Transkriptionsfaktor Gal4 aus Hefe exprimiert und zum anderen ein Stamm der ein UAS-Konstrukt trägt, das sich seinerseits aus einem „*upstream activating sequences*“ (UAS)-Element und der Sequenz des Gens, das exprimiert werden soll zusammensetzt. Wenn die beiden Fliegenstämme miteinander verkreuzt werden, kommt es zur Vereinigung beider Faktoren in einem Genom. Gal4 kann an das UAS-Element binden und aktiviert die Expression des *downstream* liegenden Gens. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieses System für verschiedene Experimente genutzt, z. B. um die Expression von Genen zellspezifisch herunter zu regulieren oder Proteine ektopisch zu exprimieren. Um die Expression von proteinkodierenden Genen zellspezifisch herunter zu regulieren wurden RNAi-Linien von verschiedenen Quellen benutzt. Zum einen aus der Sammlung des *Vienna Drosophila Re-*

source Center (VDRC) (Dietzl et al., 2007) und zum anderen vom *Transgenic RNAi Project* (TRiP) (Ni et al., 2008). Um die Expression der RNAi-Konstrukte zu verstärken wurden diese Experimente bei 29 °C durchgeführt. Da der Transkriptionsfaktor Gal4 bei dieser Temperatur die größte Affinität zur UAS-Sequenz hat, wird die maximale Menge von dem gewünschten Genprodukt gebildet. Um die Effizienz des Systems zusätzlich zu steigern, wurde bei manchen Experimenten die Endoribonuklease Dicer2 exprimiert.

#### 2.2.4. Rettungsexperimente

Das Gal4/UAS-System wurde außerdem für Rettungsexperimente benutzt. Bei dieser Art von Experiment wird ein Protein lediglich in einer bestimmten Zellpopulation im mutanten Hintergrund exprimiert. Auf diese Weise kann untersucht werden, ob dieses Protein eine zellautonome Aufgabe übernimmt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion der beiden Isoformen von Mbc während der Wanderung der ePG untersucht. Dazu mussten zunächst sowohl gliaspzifischen Gal4-Linien als auch die UAS-Konstrukte der beiden Isoformen mit *mbc* Allelen in einem Genom vereint werden. Da *mbc*, genau wie die beiden UAS-Konstrukte, auf dem 3. Chromosom liegt, musste jeweils ein UAS-Konstrukt mittels Rekombination mit einem *mbc* Allel auf einem Chromosom vereinigt werden. Die dazu nötigen Kreuzungen sind in Abb. 2.3 dargestellt. Zunächst wurden Fliegen, die entweder ein UAS-Konstrukt oder das mutante Allel *mbc*<sup>D11.2</sup> tragen miteinander verkreuzt (P-Generation). Aus den Fliegen der F1-Generation wurden dann jungfräuliche Weibchen selektiert, die jeweils eins der beiden Ereignisse auf den homologen Chromosomen tragen. Diese wurden dann mit Männchen verkreuzt, die über zwei drittchromosomale Balancer verfügen. Da die Weibchen über keinen drittchromosomalen Balancer verfügen, kann es in der Keimbahn zu *Crossingover* zwischen den homologen Chromosomen kommen. In der F2-Generation können die rekombinanten Fliegen an zwei Merkmalen identifiziert werden: erstens können Fliegen mit einem UAS-Konstrukt an ihrer Augenfarbe erkannt werden und zweitens verfügen Fliegen mit einer dunklen Körperfarbe über den Marker *ebony* (*e*<sup>1</sup>). Da *e* relativ nah bei *mbc* liegt, besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass Fliegen mit einer dunklen Körperfarbe auch über das mutante *mbc* Allel verfügen. Dementsprechend wurden aus der F2-Generation Fliegen mit gelben Augen und dunkler Körperfarbe selektioniert und mit Fliegen verkreuzt, die über zwei drittchromosomale Balancer verfügen. Aus jeder potenziell rekombinanten Fliege wurde ein eigener Stamm etabliert. Bei jedem dieser Stämme wurde im Anschluss experimentell getestet, ob sie sowohl über das *mbc* Allel als auch über das UAS-Konstrukt verfügen.

Da die für die Rettungsexperimente verwendeten Gal4-Linien alle auf dem 2. Chromosom liegen, musste das Gal4 tragende Chromosom mit dem *mbc* Allel auf dem 3. Chromosom

kombiniert werden. Dazu wurden Vierfachbalancer verwendet, die sowohl über zwei zweit-chromosomale, als auch über zwei drittchromosomale Balancer verfügen. Die einzelnen Kreuzungen die für eine Kombination eines 2. und eines 3. Chromosoms notwendig sind, sind in Abb. 2.4 beispielhaft für die Kombination von *gcm>nGFP* mit *mbc<sup>C1</sup>* dargestellt. Zunächst müssen beide Ausgangsstämme mit Fliegen des Vierfachbalancerstamms verkreuzt werden (Generation P(A) und P(B)). Von der F1A-Generation werden Fliegen gesammelt, die *gcm>nGFP* und den zweitchromosomalen Balancer Cyo *twi-lacZ* verfügen und auf dem 3. Chromosom wildtypisch über dem Balancer TM6b *iab2-lacZ* sind. Von der F1B-Generation werden genau die anderen Balancerchromosomen selektiert, d. h. von den 2. Chromosomen ist eins wildtypisch, das andere der Balancer Pm. Auf dem 3. Chromosom trägt eins der Homologen die *mbc* Mutation und das andere ist der Balancer CxD. Durch die Kreuzung der selektierten Fliegen ist es möglich in der F2-Generation Fliegen zu selektionieren, die auf dem zweiten Chromosom *gcm>nGFP* über dem Balancer Pm und auf dem dritten Chromosom das *mbc* Allel über dem Balancer TM6b *iab2-lacZ* tragen. Durch die Verkreuzung genetisch identischer Fliegen kann aus den selektionierten Fliegen der F2-Generation ein Stamm etabliert werden.

<u>Generation</u>	♀	X	♂
P:	$w^- ; ; \text{UAS-}mbc/\text{TM3}$		$w^-/y ; ; st^1, e^1, mbc^{D11.2}/\text{TM3}$
	- Selektion von jungfräulichen Weibchen ohne TM3		
F1:	$w^- ; ; st^1, e^1, mbc^{D11.2}/\text{UAS-}mbc$		$w^-/y ; ; \text{TM6b}/\text{TM3}$
	- Selektion von Fliegen mit dunkler Körperfarbe ( $e^1$ ) und gelben Augen ( <i>UAS-<i>mbc</i></i> )		
F2:	$w^- ; ; \text{UAS-}mbc, e^1, mbc^{D11.2}/\text{TM6b oder TM3}$		$w^-/y ; ; \text{TM6b}/\text{TM3}, Sb^1$
Einzelkreuzung	$w^-/y ; ; \text{TM6b}/\text{TM3}, Sb^1$		$w^- ; ; \text{UAS-}mbc, e^1, mbc^{D11.2}/\text{TM6b oder TM3}$
	- aus einzelnen ♀ oder ♂ einen Stamm etablieren		

**Abb. 2.3: Kreuzungsschema für die Rekombination von *UAS-*mbc** und *mbc<sup>D11.2</sup>***

Details siehe Text.

Generation	♀		♂
P(A):	$w^-; ; red^1, e^1, mbc^{C1}$	X	$w^-/y; Cyo twi-lacZ/Pm; TM6b iab2-lacZ/CxD$
P(B):	$w^-; gcm>nGFP/Cyo twi-lacZ$	X	$w^-/y; Cyo twi-lacZ/Pm; TM6b iab2-lacZ/CxD$
F1(A und B):	$w^-; gcm>nGFP/Cyo twi-lacZ; +/TM6b iab2-lacZ$	X	$w^-/y; +/Pm; red^1, e^1, mbc^{C1}/CxD$
F2:	$w^-; gcm>nGFP/Pm; red^1, e^1, mbc^{C1}/TM6b iab2-lacZ$	X	$w^-/y; gcm>nGFP/Pm; red^1, e^1, mbc^{C1}/TM6b iab2-lacZ$

Abb. 2.4: Kreuzungsschema für die Kombination von *gcm>nGFP* und *mbc<sup>C1</sup>*

Details siehe Text.

## 2.2.5. Fliegenstämme

Tab. 2.5: Liste der verwendeten Fliegenstämme (*Drosophila melanogaster*)

Name	Genotyp	Quelle
<b>wildtypische Stämme</b>		
Oregon R	Wildtyp	Stammsammlung Institut für Genetik (Mainz)
<b>mutante Stämme (sortiert nach Chromosomen)</b>		
<i>Ck1a<sup>G0492</sup></i>	$w^+, P(lacW) Ck1a^{G0492}/FM7c, P(Dfd-GMR-nvYFP)1$	BL# 12303
<i>elmo<sup>KO</sup></i>	$w^*; elmo^{KO}/Cyo P(ry[+t7.2]=en1-lacZ)wg^{en11}$	(Bianco et al., 2007)
<i>for<sup>k04703</sup></i>	$; P(lacW)for^{k04703}/CyO, P(GAL4-twi.G)2.2, P(UAS-2xEGFP)AH2.2$	BL# 10382
<i>grp<sup>06034</sup></i>	$; P(PZ)grp^{06034}, cn^1/CyO, P(GAL4-twi.G)2.2, P(UAS-2xEGFP)AH2.2$	BL# 12219
<i>par-1k05603</i>	$; P(w[+mC]=lacW)mei-W68^{k05603}, par-1^{k05603}/CyO, P(GAL4-twi.G)2.2, P(UAS-2xEGFP)AH2.2$	BL# 10574
<i>par-1k06323</i>	$; P(w[+mC]=lacW)par-1^{k06323}/CyO, P(GAL4-twi.G)2.2, P(UAS-2xEGFP)AH2.2$	BL# 10615
<i>Pka-C1<sup>H2</sup></i>	$; Pka-C1^{H2}/CyO, P(GAL4-twi.G)2.2, P(UAS-2xEGFP)AH2.2$	BL# 4101
<i>Ilk<sup>1</sup></i>	$mwh^1, Ilk^1, red^1, e^4/TM3, P(GAL4-twi.G)2.3, P(UAS-2xEGFP)AH2.3, Sb^1, Ser^1$	BL# 4861
<i>JIL-1<sup>3</sup></i>	$; ; JIL-1^3/TM3, P(Dfd-GMR-nvYFP)3, Sb^1$	BL# 6347
<i>Lk6<sup>1</sup></i>	$; ; Lk6^1/TM3, P(GAL4-twi.G)2.3, P(UAS-2xEGFP)AH2.3, Sb^1, Ser^1$	BL# 8706

<i>mbc</i> <sup>D11.2</sup>	; ; <i>st</i> <sup>1</sup> , <i>e</i> <sup>1</sup> , <i>mbc</i> <sup>D11.2</sup> /TM3, P(Dfd-GMR-nvYFP)3, <i>Sb</i> <sup>1</sup>	BL# 4952
<i>mbc</i> <sup>C1</sup>	; ; <i>red</i> <sup>1</sup> , <i>e</i> <sup>1</sup> , <i>mbc</i> <sup>C1</sup> /TM3, P(Dfd-GMR-nvYFP)3, <i>Sb</i> <sup>1</sup>	BL# 1671
<i>SNF4λ</i> <sup>KG00325</sup>	P(y[+mDint2] w[BR.E.BR]=SUPor-P) <i>SNF4λ</i> <sup>KG00325</sup> /TM3, P(Dfd-GMR-nvYFP)3, <i>Sb</i> <sup>1</sup>	BL# 13088
<i>wnd</i> <sup>1</sup>	; ; <i>wnd</i> <sup>1</sup> , <i>e</i> <sup>1</sup> / TM3, P(Dfd-GMR-nvYFP)3, <i>Sb</i> <sup>1</sup>	BL# 51641
<i>wnd</i> <sup>2</sup>	; ; <i>wnd</i> <sup>2</sup> / TM3, P(Dfd-GMR-nvYFP)3, <i>Sb</i> <sup>1</sup>	(Collins et al., 2006)
<i>wnd</i> <sup>3</sup>	; ; <i>wnd</i> <sup>3</sup> /TM3, P(Dfd-GMR-nvYFP)3, <i>Sb</i> <sup>1</sup>	BL# 51999
<i>wnd</i> <sup>M100494-GFSTF.2</sup>	; ; M({PT-GFSTF.2) <i>wnd</i> <sup>M100494-GFSTF.2</sup> /TM3, P(Dfd-GMR-nvYFP)3, <i>Sb</i> <sup>1</sup>	BL# 39656
<i>Crk</i> <sup>KG00336</sup>	; ; ; <i>Crk</i> <sup>KG00336</sup> /P(ActGFP) <i>unc-13</i> <sup>GJ</sup>	BL# 13652
<b>Gal4-Stämme</b>		
<i>repo&gt;Dicer2</i>	<i>w</i> <sup>*</sup> ; P(UAS-Dcr-2.D)2; P(w[+m*]=GAL4)repo/TM6B, P(Dfd-EYFP93, <i>Sb</i> <sup>1</sup> , <i>Tb</i> <sup>1</sup> , <i>ca</i> <sup>1</sup>	Vef, O
<i>Mz97&gt;Dicer2</i>	P(w[+mC]=UAS-Dcr-2.D)1, <i>w</i> <sup>*</sup> ; P(w[+mW.hs]=GawB)Mz97	Vef, O
<i>repo4.3&gt;CD4::tdGFP</i>	<i>w</i> <sup>*</sup> ; P(repo4.3-Gal4), P(UAS-CD4-tdGFP) 8M2	Vef, O
<i>gcm&gt;nGFP</i>	<i>gcm</i> -Gal4, UAS-nGFP/Cyo <i>twi-lacZ</i>	Giangrande, A.
<i>Mz97&gt;nGFP</i>	<i>w</i> ; P(w[+mW.hs]=GawB)Mz97 P(w[+mC]=UAS-Stinger)2	BL# 32219
<i>Mz97&gt;CD4::tdGFP</i>	<i>w</i> ; P(w[+mW.hs]=GawB)Mz97, P(UAS-CD4-tdGFP)8M2	eigene Linie: Rekombination auf dem 2. Chromosom
<i>Mz97&gt;CD8::RFP</i>	<i>w</i> ; P(w[+mW.hs]=GawB)Mz97, P(10XUAS-IVS-mCD8::RFP)attP40	eigene Linie: Rekombination auf dem 2. Chromosom
<i>Nrv2&gt;GFP</i>	<i>w</i> ; P(w[+mC]=nrv2-GAL4.S)3, P(w[+mC]=UAS-GFP.S65T)Myo31DF <sup>T2</sup> ; P(nrv2-GAL4.S)8, P(UAS-GFP.S65T)eg <sup>T10</sup>	BL# 6796
<i>Gli-Gal4</i>	<i>w</i> ; P(GAL4, <i>w</i> <sup>+</sup> ) <i>Gli</i> <sup>LB2</sup>	(Sepp and Auld, 1999)
<i>Oaz-Gal4</i>	<i>w</i> ; P(w[+mW.hs]=GawB)NP <sup>5288</sup>	DGRC# 104937
<i>Oaz&gt;CD8::RFP</i>	<i>w</i> ; P(w[+mW.hs]=GawB)NP <sup>5288</sup> , P(10XUAS-IVS-mCD8::RFP)attP40	eigene Linie: Rekombination auf dem 2. Chromosom
<i>cas&gt;nGFP</i>	; ; <i>cas</i> <sup>3927</sup> -Gal4, UAS-nGFP	(Hitier et al., 2001)
NGT40	<i>y</i> <sup>1</sup> <i>w</i> <sup>*</sup> ; P(GAL4-nos.NGT)40	BL# 4442
NGTA	<i>y</i> <sup>1</sup> <i>w</i> <sup>*</sup> ; ; P(w[+mC]=GAL4-nos.NGT)A	BL# 32563
NGT40; NGTA	<i>y</i> <sup>1</sup> <i>w</i> <sup>*</sup> ; P(GAL4-nos.NGT)40; P(w[+mC]=GAL4-nos.NGT)A	eigene Linie: Kombination 2. und 3. Chromosom

gcm>nGFP; NGTA	<i>w*</i> ; <i>gcm-Gal4</i> , <i>UAS-nGFP</i> ; P( <i>w</i> [+ <i>mC</i> ]=GAL4-nos.NGT)A	eigene Linie: Kombination 2. und 3. Chromosom
<b>UAS-Stämme</b>		
UAS- <i>mbc-RA</i> <sup>64C13</sup>	<i>w*</i> ; ; P(UAS- <i>mbc-RA</i> ::HA)	(Balagopalan et al., 2006)
UAS- <i>mbc-RA</i>	<i>w*</i> ; ; P(UAS- <i>mbc-RA</i> ::HA)attP2	eigene Linie
UAS- <i>mbc-RB</i>	<i>w*</i> ; ; P(UAS- <i>mbc-RB</i> ::HA)attP2	eigene Linie
UAS- <i>mbc-RB</i> <sup>S905A</sup>	<i>w*</i> ; ; P(UAS- <i>mbc-RB</i> <sup>S905A</sup> ::HA)attP2	eigene Linie
UAS- <i>mbc-RB</i> <sup>T935AT936A</sup>	<i>w*</i> ; ; P(UAS- <i>mbc-RB</i> <sup>T935AT936A</sup> ::HA)attP2	eigene Linie
UAS- <i>mbc-RB</i> <sup>S905AT935AT936A</sup>	<i>w*</i> ; ; P(UAS- <i>mbc-RB</i> <sup>S905AT935AT936A</sup> ::HA)attP2	eigene Linie
UAS-Rac1.N17	<i>y</i> <sup>1</sup> , <i>w*</i> ; ; P( <i>w</i> [+ <i>mC</i> ]=UAS-Rac1.N17)1	BL# 6292
UAS-Rho1.V14	<i>w</i> ; P(UAS-Rho1.V14)5.1/CyO <i>wg-lacZ</i>	BL# 7330
UAS-Egfr <sup>DN</sup> ; UAS-Egfr <sup>DN</sup>	<i>y</i> <sup>1</sup> , <i>w*</i> ; P( <i>w</i> [+ <i>mC</i> ]=UAS-Egfr.DN.B)29-77-1; P( <i>w</i> [+ <i>mC</i> ]=UAS-Egfr.DN.B)29-8-1	BL# 5364
UAS-Pvr <sup>DN</sup>	<i>w</i> ; P(UAS-Pvr.DN)	(Duchek et al., 2001)
UAS-Pvr <sup>DN</sup> ; UAS-Egfr <sup>DN</sup>	<i>w</i> ; P(UAS-Pvr.DN); P(UAS-Egfr.DN.B)29-77-1;	eigene Linie: Kombination 2. und 3. Chromosom
UAS-Pten	UAS-Pten/TM3	(Goberdhan et al., 1999)
UAS-PKCi	<i>w*</i> ; P(UAS-PKCi.B)4A	BL# 4589
UAS- <i>wnd</i>	<i>w*</i> ; P( <i>w</i> [+ <i>mC</i> ]=UAS- <i>wnd</i> .C)2/CyO Dfd- EYFP	BL# 51642
UAS- <i>wnd</i> <sup>K188A</sup>	<i>w*</i> ; P( <i>w</i> [+ <i>mC</i> ]=UAS- <i>wnd</i> .K188)2/CyO Dfd- EYFP	BL# 51643
UAS-CD4::tdGFP	P(UAS-CD4-tdGFP)8M2	BL# 35839
UAS-CD8::RFP	P(10XUAS-IVS-mCD8::RFP)attP40	BL# 32219
<b>RNAi-Stämme</b>		
UAS- <i>mbc</i> <sup>RNAi(VDRC# 16044)</sup>	<i>w</i> ; P(GD6965)v16044	VDRC# 16044
UAS- <i>mbc</i> <sup>TRiP-RNAi (BL# 32355)</sup>	<i>y</i> <sup>1</sup> , <i>sc*</i> , <i>v</i> <sup>1</sup> ; P( <i>y</i> [+t7.7] <i>v</i> [+t1.8]=TRiP.HMS00346)attP2	BL# 32355
UAS-Ced-12 <sup>RNAi (VDRC# 107590)</sup>	P(KK102788)VIE-260B	VDRC# 107590
UAS-Ced-12 <sup>RNAi (VDRC# 10455)</sup>	<i>w*</i> ; ; P(GD4186)v10455	VDRC# 10455
UAS-Ced-12 <sup>RNAi (VDRC# 10455)</sup> ; UAS-Ced-12 <sup>RNAi (VDRC# 107590)</sup>	<i>w*</i> ; P(KK102788)VIE-260B; P(GD4186)v10455	eigene Linie: Kombination 2. und 3. Chromosom
<b>Stämme für Rettungsexperimente</b>		
UAS- <i>mbc-RA</i> <sup>64C13</sup> , <i>mbc</i> <sup>D11.2</sup>	<i>w*</i> ; ; P(UAS- <i>mbc-RA</i> .HA), <i>e</i> <sup>1</sup> , <i>mbc</i> <sup>D11.2</sup> / TM3, P(Dfd-GMR-nvYFP)3, <i>Sb</i> <sup>1</sup>	eigene Linie: Rekombinati- on auf dem 3. Chromosom



UAS- <i>mbc-RB</i> , <i>mbc</i> <sup>D11.2</sup>	<i>w</i> <sup>*</sup> ; P(UAS- <i>mbc-RB.HA</i> )attP2, <i>e</i> <sup>1</sup> , <i>mbc</i> <sup>D11.2</sup> / TM3, P(Dfd-GMR-nvYFP)3, <i>Sb</i> <sup>1</sup>	eigene Linie: Rekombination auf dem 3. Chromosom
<i>gcm</i> >nGFP/Pm; <i>mbc</i> <sup>C1</sup> /TM3 Dfd-EYFP	<i>w</i> <sup>*</sup> ; <i>gcm</i> >nGFP/Pm; <i>red</i> <sup>1</sup> , <i>e</i> <sup>1</sup> , <i>mbc</i> <sup>C1</sup> / TM3, P(Dfd-GMR-nvYFP)3, <i>Sb</i> <sup>1</sup>	eigene Linie: Kombination 2. und 3. Chromosom
<i>repo4.3</i> >CD4::tdGFP/Pm; <i>mbc</i> <sup>C1</sup> /TM3 Dfd-EYFP	<i>w</i> <sup>*</sup> ; P( <i>repo4.3-Gal4</i> ), P(UAS-CD4-tdGFP) 8M2/Pm; <i>red</i> <sup>1</sup> , <i>e</i> <sup>1</sup> , <i>mbc</i> <sup>C1</sup> / TM3, P(Dfd-GMR-nvYFP)3, <i>Sb</i> <sup>1</sup>	eigene Linie: Kombination 2. und 3. Chromosom
Mz97>CD4::tdGFP/Cyo Dfd-EYFP; <i>mbc</i> <sup>C1</sup> /TM3 Dfd-EYFP	<i>w</i> <sup>*</sup> ; P( <i>w[+mW.hs]=GawB</i> )Mz97,P(UAS- CD4-tdGFP)8M2/ CyO, P(Dfd-EYFP)2; <i>red</i> <sup>1</sup> , <i>e</i> <sup>1</sup> , <i>mbc</i> <sup>C1</sup> /TM3, P(Dfd-GMR-nvYFP)3, <i>Sb</i> <sup>1</sup>	eigene Linie: Kombination 2. und 3. Chromosom
<i>twi</i> >EGFP/Pm; <i>mbc</i> <sup>C1</sup> /TM3 Dfd-EYFP	<i>w</i> <sup>*</sup> ; CyO, P( <i>GAL4-twi.G</i> )2.2, P(UAS- 2xEGFP)AH2.2/Pm; <i>red</i> <sup>1</sup> , <i>e</i> <sup>1</sup> , <i>mbc</i> <sup>C1</sup> / TM3, P(Dfd-GMR-nvYFP)3, <i>Sb</i> <sup>1</sup>	eigene Linie: Kombination 2. und 3. Chromosom
<b>vierfach Balancer</b>		
<i>w</i> <sup>-</sup> ; Cyo <i>twi-lacZ</i> /Pm; TM6b <i>iab2-lacZ</i> /CxD	<i>w</i> <sup>-</sup> ; Cyo <i>twi-lacZ</i> /Pm; TM6b <i>iab2-lacZ</i> , Ant-Hu, <i>e</i> ,/CxD	Vef, O

## 2.2.6. Eiablagen

Um Embryonen eines Stammes oder von der F1-Generation einer Kreuzung zu erhalten wurden die adulten Fliegen auf ein Ablagerörchen überführt. Dabei handelt es sich um ein Kulturgefäß, dessen Boden mit Apfelsaftagar bedeckt ist. Um die Fliegen zur Eiablage zu animieren, kann zusätzlich etwas Trockenhefe eingestreut werden. Zur Herstellung von Ablagerörchen, werden 28 g Agaragar in 1 l Apfelsaft aufgekocht und danach auf die leeren Kulturgefäße verteilt.

## 2.3. Immunohistochemie

### 2.3.1. Chemische Dechorionisierung, Fixierung und Devitellinisierung der Embryonen

Um das Chorion, die äußerste Schutzhülle der Embryonen, zu entfernen, werden die Eier in den Ablagerörchen für 2 min mit 7,5 %iger Chlorbleiche überschichtet und nach gründlichem Spülen mit Wasser in ein Reaktionsgefäß mit Fixierlösung überführt. Die Fixierung erfolgt unter starkem Schütteln für 22 min. Anschließend wird die untere wässrige Phase der Fixierlösung aus dem Reaktionsgefäß entfernt und durch Methanol ersetzt. Danach wird durch sehr schnelles Schütteln die Vitellinmembran der Embryonen entfernt. Die devitellinierten Embryonen sinken im Reaktionsgefäß ab und es wird erneut die untere Phase abge-

zogen und durch Methanol ersetzt. Dieser Vorgang wird so lange wiederholt, bis sich möglichst viele Embryonen am Boden des Reaktionsgefäßes befinden. Anschließend wird die gesamte Flüssigkeit abgezogen und mehrfach mit Methanol gespült. Die Embryonen können nach diesem Schritt bei -20 °C für mehrere Monate gelagert werden oder direkt für eine Antikörperfärbung genutzt werden.

### 2.3.2. Inkubation mit primären und sekundären Antikörpern

Bevor die Embryonen mit den primären Antikörpern inkubiert werden, muss das Methanol durch mehrmaliges Waschen mit PBT entfernt werden. Anschließend werden die Embryonen in der Antikörperlösung über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die ungebundenen Antikörper werden danach durch intensives Waschen mit PBT entfernt. Die Antikörperlösung kann bei 4 °C gelagert und für weitere Experimente verwendet werden. Die Inkubation mit den sekundären Antikörpern erfolgt für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Diese werden im Verhältnis 1:500 (bzw. 1:250 wenn sie 1:1 mit Glycerol verdünnt vorliegen) in PBT verdünnt. Alle sekundären Antikörper wurden entweder von der Firma *Jackson ImmunoResearch Laboratories* oder der Firma *Life Technologies* bezogen. Durch erneutes intensives Waschen mit PBT, werden auch die ungebundenen sekundären Antikörper entfernt. Als letztes werden die Embryonen mit PBS gespült, um das gewebsschädigende Triton-X zu entfernen und anschließend in 70 %iges Glycerol überführt.

Tab. 2.6: Liste der verwendeten primären Antikörper

Name	Spezies	Verdünnung	Quelle
$\alpha$ - $\beta$ -Gal	Huhn	1:1000	abcam
$\alpha$ -Fas2 (1D4)	Maus	1:10	DSHB
$\alpha$ -GFP	Maus	1:125	Roche
$\alpha$ -GFP	Kaninchen	1:500	Torrey Pines Biolabs Inc
$\alpha$ -HA	Kaninchen	1:500	dianova
$\alpha$ -Mhc	Ratte	1:500	abcam
$\alpha$ -Mbc	Ratte	1:50	(Erickson et al., 1997)
$\alpha$ -Repo	Meerschwein	1:1000	(von Hilchen et al., 2013)
$\alpha$ -RFP	Kaninchen	1:500	MBL International

### 2.3.3. Signaldetektion und Dokumentation der Färbung

Die fluoreszent gefärbten Embryonen werden zunächst auf einen Objektträger überführt und dort nach ihrem Entwicklungsstadium und ihrem Genotyp (erkennbar an der Markerexpression der Balancerchromosomen) sortiert. Die Embryonen im späten Stadium 16 mit dem gewünschten Genotyp wurden filetiert und mit 19,5 µl *mounting medium* (Vectashield) bedeckt, um das Ausbleichen der Fluorophore zu verhindern. Um die Embryonen auf dem Objektträger zu fixieren, wurden sie mit einem Deckgläschen (22 mm x 22 mm) bedeckt und die Ränder mit Nagellack versiegelt. Um die Embryonen zu analysieren, wurden Aufnahmen mit einem konfokalen Laserscan-Mikroskop gemacht. Die Analyse der Aufnahmen und Auswertung der Phänotypen fand im Anschluss mit Hilfe der Software LCS (Lite) oder LAS AF (Lite) (beide von der Firma Leica) statt.

### 2.4. verwendete Lösungen

Es wurden ausschließlich Chemikalien in Analysequalität verwendet, die von Roth, Sigma-Aldrich oder VWR bezogen wurden.

#### Drosophila Standardnährmedium:

230 g	Agar-Agar
700 g	Hefeflocken
250 g	Sojamehl
1500 g	Maismehl
2200 g	Malzextrakt
1100 g	Zuckerrübensaft
70 g	Nipagin
130 ml	Propionsäure

alle Zutaten werden in insgesamt 42 l Wasser gelöst und aufgekocht

#### Chlorbleiche (7,5 %):

15% Natriumhypochloritlösung mit Leitungswasser 1:1 verdünnt

#### Fixierlösung:

450 µl	PEMS
500 µl	Heptan
50 µl	Formaldehyd (37 %)

#### 20x PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7,4):

75,97 g	NaCl
4,14 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
9,94 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
500 ml	Aqua dest. (autoklaviert)

pH 7,4 mit HCl einstellen

PBT (0,3 %):

300 ml		PBS
900 µl		Triton X-100

SOC-Medium:

20 g		Trypton
5 g		Hefeextrakt
0,5 g		NaCl
10 ml		KCl (250 mM)

pH 7 mit 5 M NaOH einstellen

mit Aqua dest. auf 990 ml auffüllen

10 ml steriles MgCl<sub>2</sub> (1M) zugeben

20 ml steril filtrierte 20 %ige Glukoselösung zugeben

LB-Medium:

10 g		Trypton
5 g		Hefeextrakt
10 g		NaCl
10 ml		KCl (250 mM)

mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen

pH 7 mit 10 M NaOH einstellen

autoklavieren und bei 4 °C lagern

von den verwendeten Antibiotika wurden 50 µl je ml LB-Medium zugegeben

50x TAE-Puffer

242 g		Tris-HCl
57,1 ml		Eisessig
0,5 ml		EDTA (0,5 M)

pH 8 mit HCl einstellen

mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen

PEMS:

15,1185 g		PIPES, pH 6,9 (0,1 M)
123,24 mg		MgSO <sub>4</sub> (1 mM)
146,125 mg		EDTA (1 mM)
109,305 g		Sorbit (1,2 M)

in 500 ml Aqua dest. lösen

pH 6,9 einstellen

## 2.5. verwendete Geräte

Tab. 2.7: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Binokular	M80	Leica
Eismaschine	AF100	Scotsman
Feinwaage	AM50	Mettler
Fluoreszenzbinokular	MZFLIII	Leica
Fluoreszenzmikroskop	BX50WI	Olympus
Heizblock	TB 1	Biometra
Inkubator	Fricocell	MMM Medcenter
Inkubator	WTB Binder	Labotec
Kamera	AxioCam MRm	Zeiss
Lampe	KL1500LCD	Leica
konfokales Laserscan-Mikroskop	DMRE TCS SP2	Leica
konfokales Laserscan-Mikroskop	DM TCS SP5	Leica
Magentrührer	MR3001	Heidolph
Thermocycler	TGradient	Biometra
Thermocycler	TPersonal	Biometra
Thermocycler	T1000 Touch	Bio-Rad
pH-Meter	CG840	Schott
Pipettensatz	pipetman	Gilson
Schüttler	TPM-2	Sarstedt
Thermomixer	Thermomixer kompakt	Eppendorf
Waage	PM 4600	Mettler
Zentrifuge	5417R	Eppendorf

## 2.6. verwendete Software

Tab. 2.8: Liste der verwendeten Software

Name	Entwickler/Quelle
<b>Sequenzanalyse</b>	
SnapGene® Viewer 2.3.2	SnapGene
InterProScan 4 (Server nicht mehr im Dienst)	EMBL EBI
EMBOSS Needle (Server für Pairwise Alignment)	EMBL EBI
Launch Clustal Omega (Server für Multiple Alignment)	EMBL EBI
The Sequence Manipulation Suite (Server)	(Stothard, 2000)
Translate tool (Server)	ExpPASy
<b>Vorhersage von Phosphorylierungsstellen</b>	
GPS (Server) und GPS 2.1.2	(Xue et al., 2008)
NetPhos 2.0 (Server)	(Blom et al., 1999)
NetPhosK 1.0 (Server)	(Blom et al., 2004)
<b>Vorhersage und Darstellung von 3D-Strukturen</b>	
RaptorX structure prediction (Server)	(Källberg et al., 2012)
RasMol 2.7.5	ARCiB laboratory
<b>Darstellung und Bearbeitung von Mikroskopaufnahmen</b>	
LCS (Lite)	Leica
LAS AF (Lite)	Leica
<b>Sonstiges</b>	
Illustrator CS4	Adobe
Photoshop CS4	Adobe
Office 2010	Microsoft
EndNote X4	Thomson
Firefox	Mozilla

### **3. Ergebnisse**

Die vorliegende Arbeit unterteilt sich in zwei Abschnitte. Der Erste beschäftigt sich mit der Rolle von *myoblast city* (*mbc*) bei der Migration der embryonalen peripheren Gliazellen (ePG) von *D. melanogaster*. Der zweite Teil befasst sich damit, inwieweit das für *mbc* beschriebene alternative Spleißen in orthologen Genen anderer Spezies konserviert ist und ob das alternativ gespleißte Exon über konservierte Bereiche verfügt.

Zunächst wurde *mbc* im Rahmen eines screens untersucht, dessen Ziel es war intrazelluläre Signalmoleküle zu identifizieren, die *downstream* des Transmembranrezeptors Unc-5 in die Migration der ePG involviert sind. Zum Großteil sind die Ergebnisse dieser Analyse in meine Diplomarbeit eingeflossen, *mbc* war allerdings ein Faktor, der aus Zeitgründen nicht mehr bearbeitet werden konnte. Für die Analyse wurde die Position der ePG am Ende der Embryogenese in Mutanten der verschiedenen Faktoren untersucht. Insgesamt konnte bei keinem der untersuchten Faktoren eine Verbindung zu Unc-5 gefunden werden, allerdings beeinflusst die Mutation einiger Faktoren die Migration der ePG.

#### **3.1. Analyse der *mbc* Mutanten**

Um *mbc* zu untersuchen, wurden ebenfalls zunächst mutante Embryonen analysiert. Dazu wurden zwei verschiedenen Allele verwendet, auf der einen Seite *mbc*<sup>D11.2</sup>, bei dem Codon 97 zu einem Stopcodon mutiert ist. So wird nur ein stark verkürztes Protein gebildet (Erickson et al., 1997) und auf der anderen Seite das Nullallel *mbc*<sup>C1</sup> (Rushton et al., 1995, Prokop et al., 1996). Die beiden Allele sind Mutationen, die durch Ethylmethansulfonat (EMS) induziert wurden. Um eventuell auftretende sekundäre Mutation auszuschließen, wurden in dieser Arbeit sofern nicht explizit erwähnt transheterozygote Embryonen analysiert.

Um im Embryo Phänotypen im Bereich des peripheren Nervensystem (PNS) zu untersuchen, muss der Embryo zunächst präpariert werden. Dafür wird er an der dorsalen Mittellinie geöffnet, anschließend beide Hälften der Körperwand auseinander geklappt (Abb. 3.1A) und der dazwischen liegende Darm entfernt. Auf diese Weise ist sowohl eine Aufsicht auf das Zentralnervensystem (ZNS) als auch auf das PNS möglich. Um die Migration der ePG zu analysieren, wurden ausschließlich die abdominalen Segmente A1-A7 von Embryonen im späten Stadium 16 untersucht. Zu diesem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung ist die Migration der ePG im Wildtyp (WT) vollständig abgeschlossen (von Hilchen et al., 2008). Die ePG, die peripheren Nerven, sowie die somatischen Muskeln, die in diesem Bereich liegen, sind in einem repetitiven Muster entlang der anterior-posterioren Achse organisiert (Abb 3.1A').

### 3.1.1. In *mbc* Mutanten treten in mehreren Zellpopulation Phänotypen auf

Gegen Ende der Embryogenese treten in der Mutante mehrere Veränderungen im Vergleich zum WT (Abb. 3.1B) auf. Zum einen sind die somatischen Muskeln nicht vorhanden. Statt der syncytialen Muskeln finden sich hier kleine abgerundete Zellen, die Myoblasten (Abb. 3.1C). Dieser Phänotyp wurde bereits beschrieben und entsteht durch die fehlende Fusion der Myoblasten während der Muskelentwicklung (Rushton et al., 1995). Zum anderen treten im PNS deutliche Veränderungen auf, wobei sowohl die axonale Wegfindung der Motorneurone als auch die Positionierung der ePG betroffen sind. Im Fall der Motorneurone ist erstens eine deutliche Defaszikulation von Intersegmentalnerv (ISN) und Segmentalnerv (SN) im ventralen Bereich des PNS zu erkennen (Abb. 3.1C, eckige Klammer) und zweitens sind die terminalen Verzweigungen des SN, wie SNc und SNa, nicht ausgebildet. Außerdem ist der Transversalnerv (TN) oft stark verkürzt und teilweise mit dem ISN fusioniert (Abb. 3.1C, Stern). Die ePG wurden mit Hilfe eines Antikörpers gegen den glialen Transkriptionsfaktor Reversed polarity (Repo) detektiert, auf diese Weise lassen sich die glialen Zellkerne darstellen. In der Mutante lassen sich 12 Gliazellen pro abdominalen Hemisegment identifizieren, was der Anzahl im WT entspricht. Allerdings liegen die ePG nicht an ihren wildtypischen Positionen entlang der peripheren Nerven. Anhand ihrer individuellen Position lassen sich nur drei ePG eindeutig identifizieren, das sind im einzelnen ePG10, ePG11 und ePG12. Im dorsalen Bereich des PNS ist anhand ihres anterior-posterior orientierten Zellkerns ePG11 erkennbar. Des weiteren ePG10, die am weitesten dorsal positionierte Glia am ISN. Diese Zelle liegt im WT ventral von ePG11 (Abb. 3.1B), in der *mbc* Mutante dagegen teilweise dorsal oder auf gleicher Höhe von ePG11 (Abb. 3.1C). Die dritte Gliazelle, die eindeutig identifiziert werden kann, ist ePG12. Diese Zelle liegt im WT immer am TN. In der *mbc* Mutante ist sie ebenfalls immer mit dem TN assoziiert, liegt allerdings in den Hemisegmenten, in denen ISN und TN fusioniert sind (Abb. 3.1C, Stern), zwischen den beiden Nerven. Außerdem lassen sich die ebenfalls Repo positiven Ligamentzellen des lateralen Chordotonalorgans (lch, in Abb. 3.1B und C mit einer gestrichelten Linie umrandet) aufgrund ihrer Position und Anordnung zueinander eindeutig identifizieren. Die übrigen neun Repo positiven Zellen, die so genannten zentral generierten ePG, liegen im ventralen Bereich des PNS, direkt an der Grenze zum ZNS. Die Kerne der Zellen liegen teilweise sehr dicht zusammen und bilden ein Zellcluster (Abb. 3.1C). Da diese ePG nicht ihre wildtypischen Positionen einnehmen, können sie auf diese Weise auch nicht eindeutig identifiziert werden.





### Abb. 3.1: Gliale, axonale und muskuläre Phänotypen der *mbc* Mutante (vorherige Seite)

(A) Schematische Darstellung der somatischen Muskulatur eines Embryos im späten Stadium 16. Angedeutet sind die Schritte der Filetpräparation: Öffnen des Embryos entlang der dorsalen Mittellinie (gestrichelte Linie) und anschließendes Auseinanderklappen der beiden Körperhälften (gebogene Pfeile), anterior ist oben, ventral rechts. Übernommen und modifiziert aus Hartenstein, 1993. (A') Schematische Darstellung der Muskulatur und peripheren Nerven eines abdominalen Hemisegments nach der Filetpräparation. Dargestellt sind Segmentalnerv (bestehend aus SNa, SNb, SNC und SNd), Intersegmentalnerv (ISN) und Transversalnerv (TN), sowie die somatischen Muskeln, besonders hervorgehoben ist der *segmental border muscle* (SBM). Anterior ist oben, ventral links, übernommen und modifiziert aus Landgraf et al., 1997. (B-C) Abgebildet ist ein Ausschnitt (zwei Hemisegmente) eines präparierten Embryos im späten Stadium 16. Mit Hilfe eines Antikörpers gegen den glialen Transkriptionsfaktor Repo können die Zellkerne der ePG (magenta) detektiert werden. Ein Antikörper gegen das axonale Adhäsionsmolekül Fas2 (weiß) markiert die Motoraxone der peripheren Nerven und ein Antikörper gegen das muskuläre Protein Mhc (grün) die somatischen Muskeln. Markiert sind die peripheren Nerven SNa, SNb, SNC, SNd, ISN und TN, die eindeutig identifizierbaren Gliazellen ePG10, ePG11 und ePG12 sowie die Ligamentzellen des lateralen Chordotonalorgans (Ich, gestrichelter Kreis). (B) Die wildtypische Anordnung der ePG entlang der peripheren Nerven, sowie die somatischen Muskeln, darunter der SBM mit dem eng assoziierten TN und ePG12. (C) In der *mbc* Mutante sind zum einen die Verzweigungen des SN stark reduziert, zum anderen die SN und ISN im ventralen Bereich defaszikuliert (eckige Klammer), ISN und TN sind teilweise fusioniert (Stern). Außerdem liegen die zentral generierten ePG sehr weit ventral. Eindeutig identifizieren lassen sich lediglich ePG10, ePG11 und ePG12 sowie das Ich. Anstatt der somatischen Muskeln liegen nicht fusionierte Myoblasten vor. In beiden Bildern ist anterior oben und ventral links.

#### 3.1.2. Bei den zentral generierten ePG treten Migrationsdefekte auf

Die Identität einzelner ePG spiegelt sich allerdings nicht nur in ihrer Position an den peripheren Nerven sondern auch in einer individuellen Kombination verschiedener Marker wieder (von Hilchen et al., 2008). Ein oft verwendeter Marker ist die Treiberlinie Mz97-Gal4 (Ito et al., 1995), bei der es sich um einen *enhancer trap* des Gens *SP2637* handelt. Durch die Rekombination von Mz97-Gal4 mit UAS-nGFP (Mz97>nGFP) können einzelne ePG spezifisch über die Expression von nGFP angesprochen werden. Je nach dem ob Mz97-Gal4 heterozygot oder homozygot im Genom vorliegt, ist eine unterschiedlich große Anzahl von ePG GFP positiv (von Hilchen et al., 2008). In diesem Fall wurde Mz97-Gal4 homozygot verwendet, d. h. von den zentral generierten ePG exprimieren insgesamt 6 Zellen nGFP, darunter sowohl die Pionierglia ePG9 als auch die direkt nachfolgende ePG7. Dagegen exprimieren lediglich 3 der Zellen kein GFP, darunter ePG6 und ePG8 (Abb. 3.2A). Um herauszufinden, ob die Zusammensetzung des glialen Zellclusters am Rand des ZNS in der *mbc* Mutante den zentral generierten ePG entspricht, wurde Mz97>nGFP mit *mbc*<sup>D11.2</sup> kombiniert und anschließend die homozygoten Mutanten analysiert. In den untersuchten Hemisegmenten befinden sich innerhalb des Zellclusters 6 GFP positive und 3 GFP negative Zellen (Abb. 3.2B und C), was der wildtypischen Anzahl entspricht. Die am weitesten ventral liegende Zelle innerhalb des Clusters ist immer GFP positiv, in den meisten Fällen gefolgt von einer GFP negativen Zelle. Dabei handelt es sich vermutlich um ePG9 und ePG8, die im WT von allen zentral generierten ePG die weiteste Strecke migrieren. Teilweise liegen diese beiden Zellen relativ isoliert am ISN, zwischen dem Ich und dem Cluster der übrigen zentral generierten

ePG (Abb. 3.2C). ePG7 ist ebenfalls GFP positiv und meistens durch ihren im Vergleich zu den übrigen ePG vergrößerten Zellkern identifizierbar. In der *mbc* Mutante nimmt sie immer eine Position im dorsalen Bereich innerhalb des Clusters ein (Abb. 3.2B und C). Außerdem lassen sich die beiden übrigen GFP negativen Zellen ePG6 und ePG2 anhand ihrer Position im Cluster identifizieren, ePG6 liegt anterior am ISN, ePG2 dagegen posterior am SN. Die übrigen ePG des Clusters lassen sich nicht individuell ansprechen. Insgesamt scheint aber die Anordnung der zentral generierten ePG in der *mbc* Mutante der im WT beschriebenen Reihenfolge entlang des ISN zu entsprechen. Der hier auftretende Phänotyp wird also durch eine fehlerhafte Migration der zentral generierten ePG hervorgerufen.

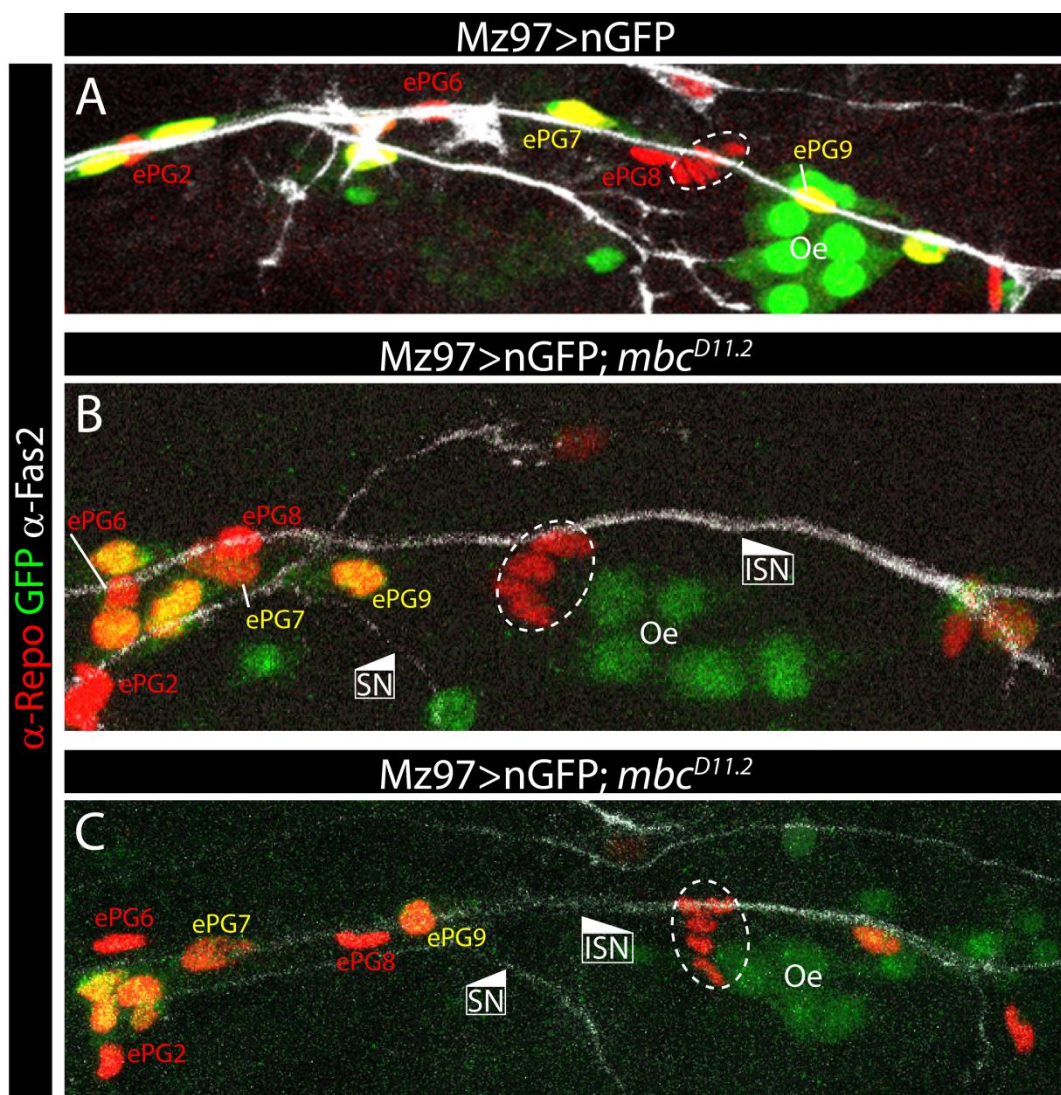


Abb. 3.2: In *mbc* Mutanten ist die Anzahl der Mz97 positiven ePG wildtypisch (Legende siehe nächste Seite)

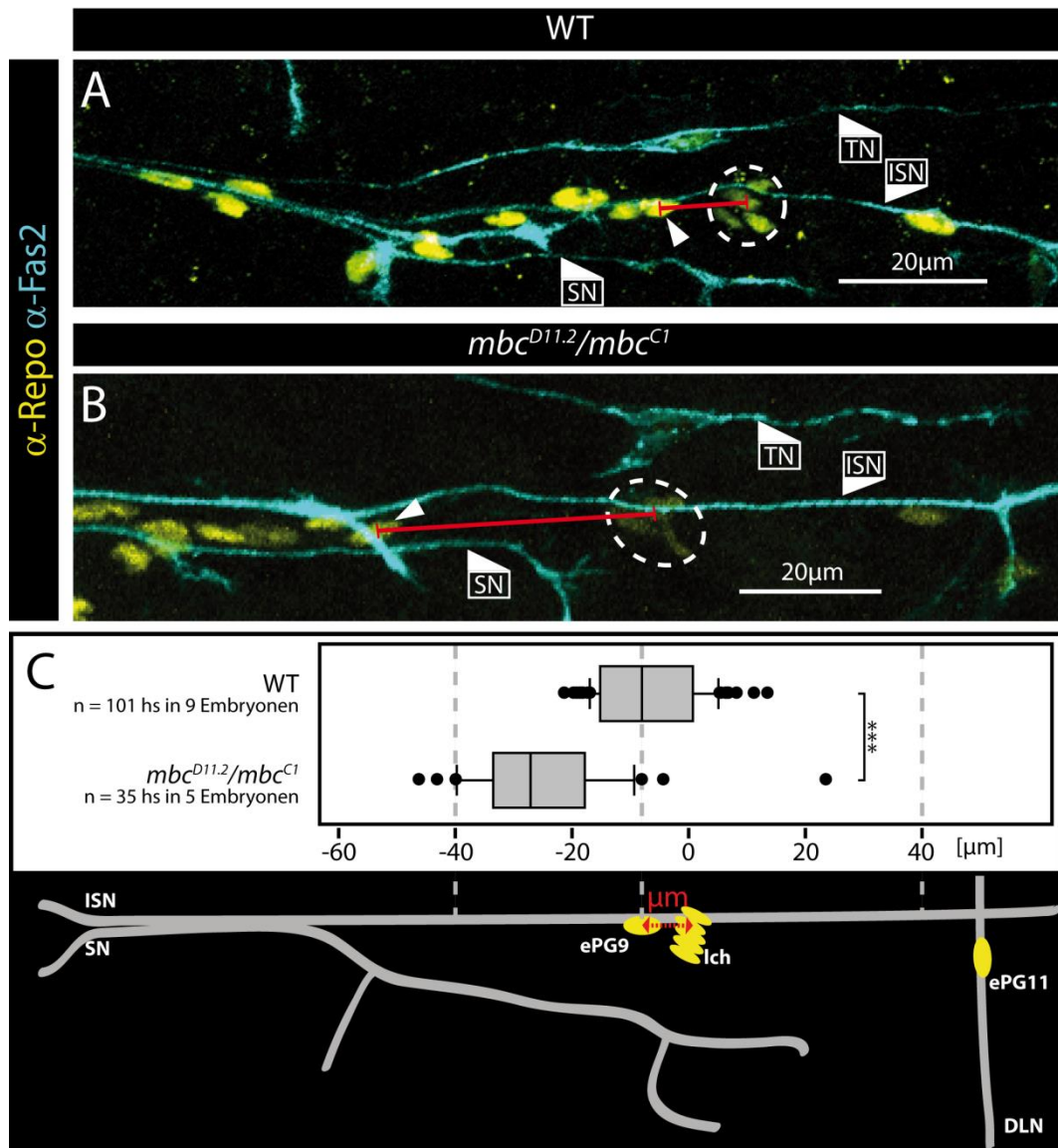
**Abb. 3.2: In *mbc* Mutanten ist die Anzahl der Mz97 positiven ePG wildtypisch (vorherige Seite)**

(A-C) Abgebildet ist jeweils ein abdominales Hemisegment (Filetpräparat) von Embryonen im späten Stadium 16. Angefärbt sind die Zellkerne der ePG (rot), die peripheren Nerven (weiß) und Mz97 positive Zellen (grün). (A) Die wildtypische Anordnung der ePG entlang der peripheren Nerven. Markiert sind die nGFP positiven Gliazellen ePG7 und ePG9, sowie die nGFP negativen ePG2, ePG6 und ePG8, außerdem das Ich (gestrichelter Kreis) und die nGFP exprimierenden Oozyten (Oe). (Originalaufnahme von C. von Hilchen) (B-C) Innerhalb des ePG Clusters in *mbc* Mutanten nimmt immer eine nGFP positive Zelle die Position an der dorsalen Spitze ein (ePG9), gefolgt von einer nGFP negativen Zelle (ePG8). Innerhalb des Clusters kann ePG7 anhand ihres vergrößerten Zellkerns, sowie die beiden nGFP negativen Gliazellen ePG2 am SN und ePG6 am ISN identifiziert werden. In allen Bildern ist anterior oben und ventral links.

---

### **3.1.3. Quantitative Auswertung der glialen Migrationsdefekte in *mbc* Mutanten**

Um die Möglichkeit zu haben, die wildtypische Migration der zentral generierten ePG direkt mit verschiedenen Mutanten zu vergleichen, wurde ein quantitatives Maß für die Migration am Ende der Embryogenese etabliert. Dazu wurden die Repo positiven Ligamentzellen des Ich als Landmarke genutzt und die Distanz zum Zellkern der Pionierglia ePG9 bestimmt (Abb. 3.3A). Die Ligamentzellen eignen sich besonders als Landmarke, da es zum einen bei der Präparation der Embryonen immer auch zu Verschiebungen des Gewebes kommt, durch die relativ nahe Lage von ePG9 und Ich zueinander wird dieser Fehler minimiert. Zum anderen, da die fünf Zellen, anders als z. B. die peripheren Nerven, in fast allen untersuchten Hemisegmenten eine wildtypische Anordnung zeigen und sich somit vermutlich unabhängig von *mbc* bzw. den benachbarten Muskeln entwickeln. Hemisegmente, bei denen die Ligamentzellen nicht wildtypisch angeordnet waren, wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Ausgewertet wurden außerdem nur Hemisegmente, in denen alle 12 ePG vorhanden, sowie keine offensichtlichen Schäden, wie z. B. der Abriss der peripheren Nerven, bei der Präparation entstanden waren. Ein dritter Aspekt von eher praktischer Bedeutung ist, dass die Ligamentzellen ohnehin durch die Antikörperfärbung gegen Repo detektiert werden. Somit musste kein zusätzlicher Antikörper verwendet werden, um weitere Strukturen anzufärben. Wie anhand des Markers Mz97>nGFP gezeigt werden konnte, liegt ePG9 auch in der *mbc* Mutante an der dorsalsten Stelle des glialen Zellclusters. Aus diesem Grund wurden für die Identifizierung der Pionierglia kein weiterer Marker verwendet (Abb. 3.3B). Im WT liegt ePG9 in den meisten Fällen ventral des Ich (Abb. 3.3A und C, Median = -8  $\mu\text{m}$ , n = 101 Hs), die Hälfte der hier gemessenen Abstände liegt zwischen -15,2  $\mu\text{m}$  und 0,1  $\mu\text{m}$  (Abb. 3.3C). Eine ähnliche Variation zeigt ePG9 in den transheterozygoten *mbc* Mutanten (-18,2  $\mu\text{m}$  bis -33,2  $\mu\text{m}$ ), allerdings ist die gemessene Distanz zum Ich signifikant größer (Abb. 3.3B und C, Median = -27,1  $\mu\text{m}$ , n = 35 Hs).



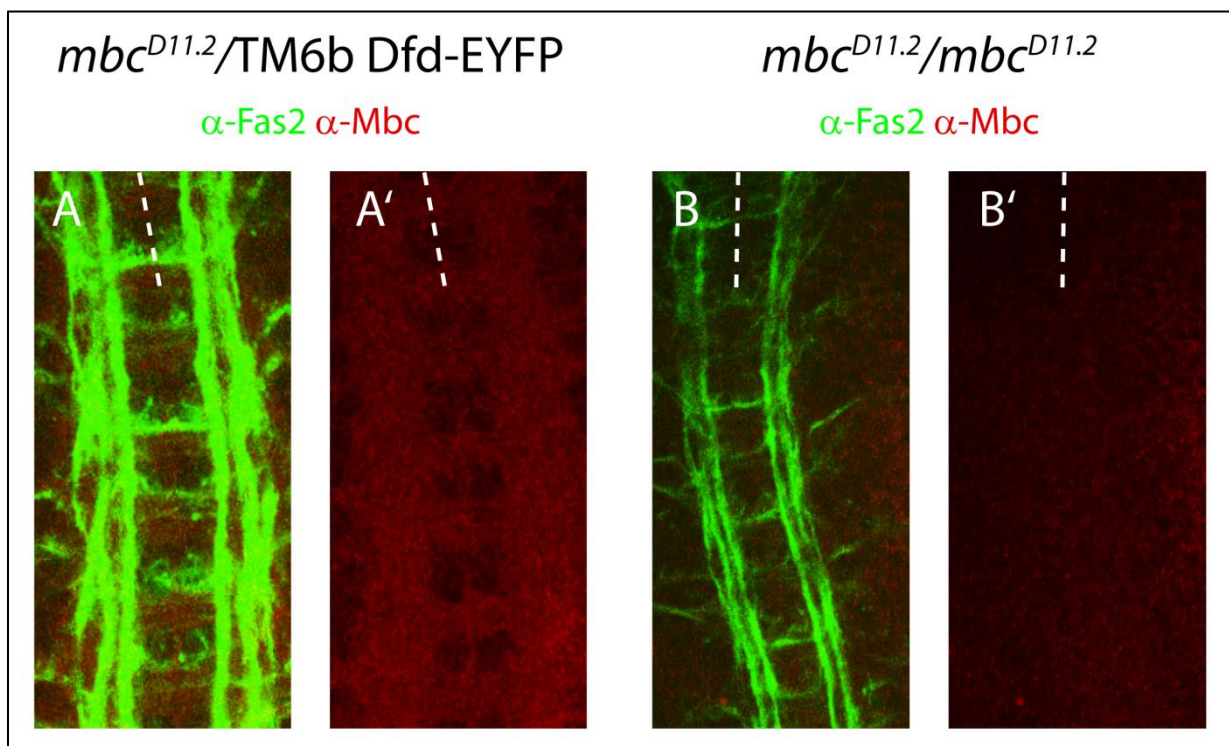
**Abb. 3.3: Signifikante Unterschiede bei der Positionierung von ePG9 zwischen WT und *mbc* Mutante**

(A-B) Abgebildet ist jeweils ein abdominales Hemisegment (Filetpräparat) von Embryonen im späten Stadium 16. Anfärbt sind die Zellkerne der ePG (gelb) und die peripheren Nerven (cyan). Markiert sind die peripheren Nerven SN, ISN und TN, das Ich (gestrichelter Kreis) und ePG9 (Pfeilspitze). Der gemessene Abstand zwischen ePG9 und Ich ist durch eine rote Linie gekennzeichnet. Anterior ist oben und ventral links. (A) Die wildtypische Anordnung der ePG entlang der peripheren Nerven. (B) ePG Cluster und axonale Wegfindungsdefekte in der *mbc* Mutante. (C) Um die Migration der ePG quantitativ zu analysieren, wurde der Abstand zwischen dem Zellkern von ePG9 und dem Ich gemessen. Die Messwerte für WT (Median = -8,02  $\mu$ m) und transheterozygote *mbc* Mutanten (*mbc<sup>D11.2</sup>/mbc<sup>C1</sup>*) (Median = -27,1  $\mu$ m) sind als Boxplot dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit einem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test überprüft. \*\*\*:  $p \leq 0,001$ .

### 3.2. Mbc wird in den ePG exprimiert

Um zu untersuchen, ob Mbc in den ePG exprimiert wird, wurde ein polyklonaler Antikörper aus Ratte, der gegen den C-Terminus von Mbc (Aminosäure 1717 bis 1970) gerichtet ist, verwendet (Erickson et al., 1997). Um zunächst die Spezifität des Antikörpers zu testen,

wurden sowohl homozygote als auch heterozygote  $mbc^{D11.2}$  mutante Embryonen gefärbt. Bei diesem Allel wird lediglich ein kurzer N-terminaler Teil des Proteins gebildet, die Epitope für den Antikörper fehlen hier also vollständig. In den heterozygoten Embryonen (Stadium 16) sind axonale Strukturen im ZNS angefärbt. Diese Färbung fehlt bei den homozygoten Embryonen vollständig (Abb. 3.4), der Antikörper scheint also Mbc spezifisch zu erkennen. In heterozygoten Embryonen sind zusätzlich die somatischen Muskeln schwach angefärbt, wie es bereits in älteren Publikationen gezeigt wurde (Erickson et al., 1997), allerdings findet man bei den homozygoten Mutanten auch eine starke unspezifische Färbung in der Epidermis (nicht gezeigt).

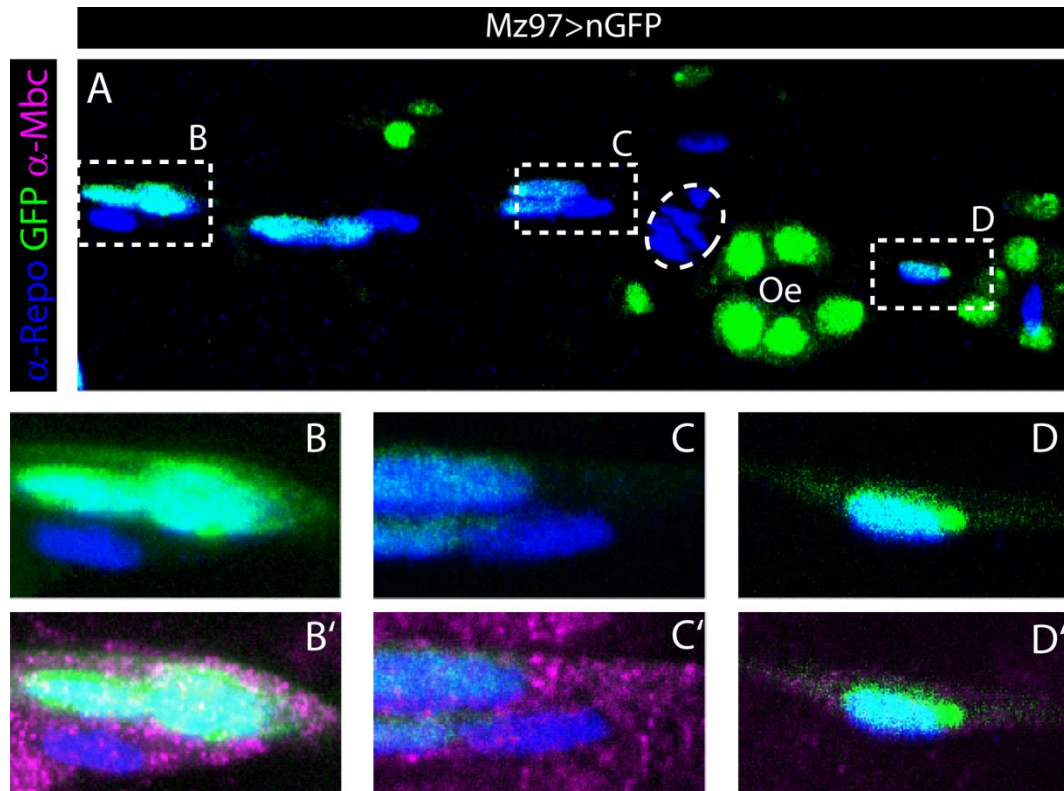


**Abb. 3.4: Expression von Mbc im embryonalen ZNS**

(A-B') Abgebildet ist das ZNS eines Embryos im Stadium 16, gefärbt gegen Fas2 (grün) und Mbc (rot). Die ventrale Mittellinie ist als gestrichelte Linie eingezeichnet. (A-A') In heterozygot mutanten Embryonen ist eine deutliche Mbc Färbung im gesamten Neuropil zu sehen. (B-B') In homozygoten  $mbc^{D11.2}$  Embryonen dagegen fehlt diese Färbung.

Aufgrund der Expression von Mbc in den somatischen Muskeln, die sich in direkter Nachbarschaft zu den ePG befinden (Abb. 3.1B), ist es sehr schwierig zu unterscheiden, ob das Mbc-Signal von den Gliazellen oder den Muskeln stammt. Um gezielt Expression in den ePG zu detektieren, wurden deshalb Embryonen des Stamms  $Mz97>nGFP$  gefärbt (Abb. 3.5A). Da die GFP Expression in diesem Stamm sehr stark ist, ist das GFP-Signal nicht nur um

Kern, sondern in der gesamten Zelle erkennbar (Abb. 3.5B, C und D). Auf diese Weise lässt sich klar zwischen Muskel und ePG unterscheiden und über die Colokalisation mit GFP definitiv spezifische Mbc Färbung in den zentral generierten ePG erkennen (Abb. 3.5B' und C'). Da die ePG sehr eng miteinander interagieren, lässt sich die Mbc Expression allerdings nicht einzelnen ePG zuordnen. Im Vergleich zu den zentral generierten ePG zeigt ePG10 eine sehr schwache Färbung (Abb. 3.5D'). Vermutlich handelt es sich dabei um unspezifische Hintergrundfärbung.



**Abb. 3.5 Mbc Expression in den ePG**

(A) Abgebildet ist ein abdominales Hemisegment (Filetpräparat) eines Embryos im späten Stadium 16. Anfärbt sind die Zellkerne der ePG (blau) und Mz97 positive Zellen (grün). Markiert sind das Ich (gestrichelter Kreis) und die Oenozysten (Oe) (Maximalprojektion der Aufnahme). (B-D) Vergrößerte Darstellung einzelner ePG, wie in A markiert. Zu sehen sind die Zellkerne der ePG (blau). Mz97 positive Zellen sind zusätzlich grün gefärbt, aufgrund der starken GFP Expression ist neben dem Zellkern auch das Zytoplasma leicht anfärbt. (B'-D') Gleiche Ausschnitte wie in B-D, allerdings ist hier zusätzlich Mbc anfärbt (magenta). (B'-C') Die zentral generierten ePG zeigen eine deutliche Expression von Mbc im Zytoplasma. (D') ePG10 zeigt im Vergleich zu den übrigen ePG eine sehr schwache Färbung. (Separation einzelner Ebenen). In allen Bildern ist anterior oben und ventral links.

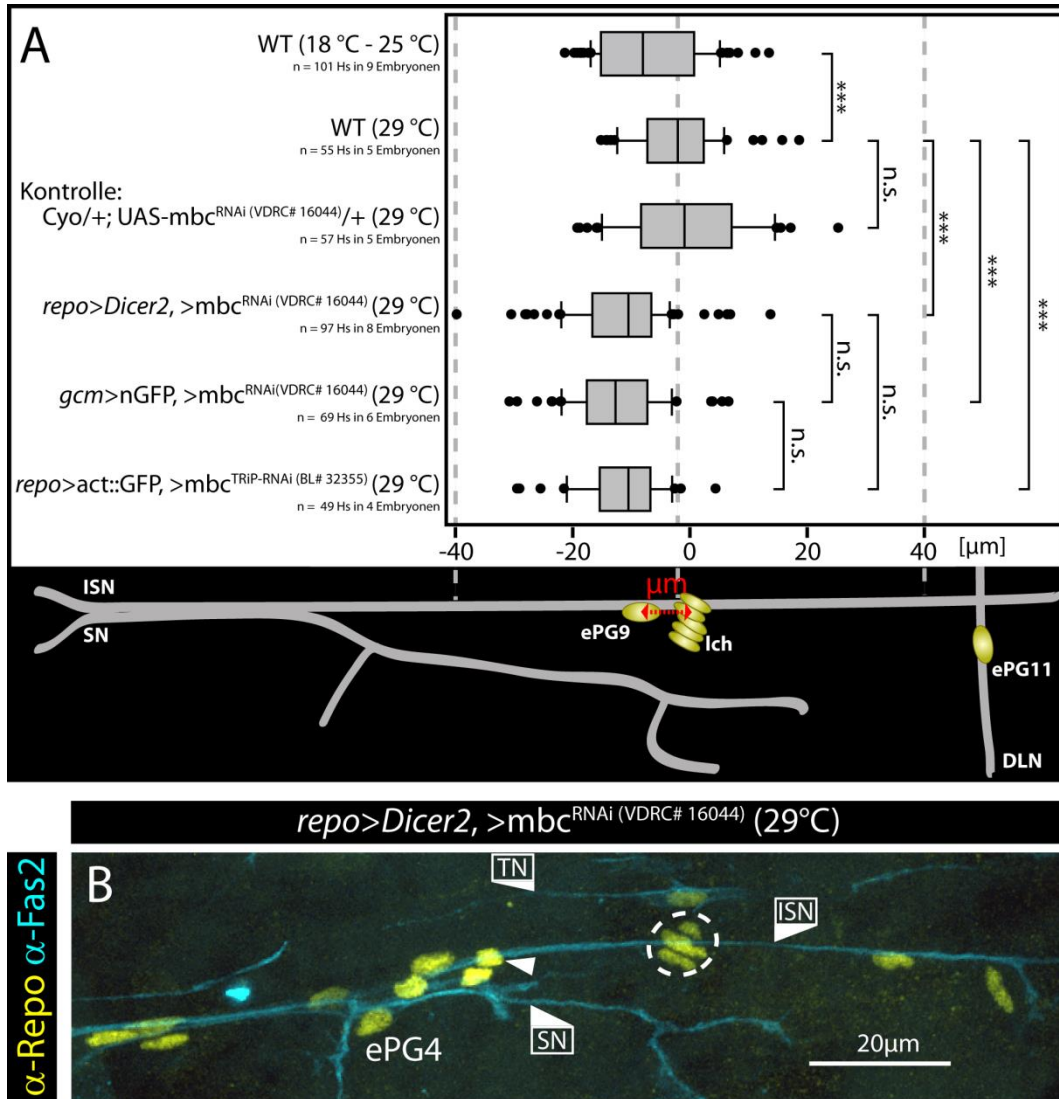
### 3.3. *mbc* hat eine zellautonome Funktion bei der glialen Migration

Da in *mbc* Mutanten neben der Migration der ePG auch die axonale Wegfindung und die Fusion der Myoblasten gestört ist, muss zunächst geklärt werden, ob die glialen Migrationsdefekte zellautonom sind oder ob es sich um sekundäre Effekte handelt. Um dies zu überprüfen, wurden mehrere RNA Interferenz (RNAi) Experimente (im weiteren Verlauf der Arbeit als *knock-down* Experimente bezeichnet) durchgeführt. Dazu wurden sowohl zwei unterschiedliche gliaspezifischen Treiberlinien benutzt, *repo*-Gal4 und *gcm*-Gal4, als auch zwei verschiedene *mbc* spezifische RNAi-Linien (UAS-*mbc*<sup>RNAi(VDRC# 16044)</sup> und UAS-*mbc*<sup>TRIP-RNAi (BL# 32355)</sup>). Durch Kombination einer Gal4- und einer RNAi-Linie wird so *mbc* ausschließlich in Gliazellen herunter reguliert. Um die Effektivität des Gal4/UAS-Systems zu steigern, wurden sämtliche Experimente bei 29 °C durchgeführt. Als Kontrollgruppe wurden Embryonen genutzt, die zwar über ein *mbc*-spezifisches RNAi-Konstrukt verfügen, aber anstatt eines Gal4-Treibers das Balancerchromosom *Cyo* tragen (*Cyo/+*; UAS-*mbc*<sup>RNAi (VDRC# 16044)</sup> /+).

Zunächst fällt auf, dass bei Embryonen der Kontrollgruppe, welche die Embryonalphase bei 29 °C durchlaufen, die Distanz zwischen ePG9 und dem Ich signifikant kleiner ist (Median = -1,03 µm, n = 57 Hs) als bei wildtypischen Embryonen, die sich bei einer Umgebungstemperatur zwischen 18 °C und 25 °C entwickeln (Median = -8,02 µm, n = 101 Hs, Abb. 3.6A). Um zu überprüfen, ob dieser Effekt ausschließlich auf die Umgebungstemperatur während der Embryonalentwicklung zurückzuführen ist, wurden wildtypische Embryonen untersucht, die sich bei 29 °C entwickelt hatten. In diesem Fall lässt sich derselbe Effekt beobachten. Die Distanz zwischen ePG9 und dem Ich (Median= -2,19 µm, n = 55 Hs) ist signifikant kleiner als bei WT (18 °C – 25 °C), zur Kontrollgruppe besteht kein signifikanter Unterschied. Damit wird deutlich, dass die Umgebungstemperatur, die während der Embryonalentwicklung herrscht, einen signifikanten Einfluss auf die Migration der ePG hat. Bei den eigentlichen *knock-down* Experimenten wurden die Gal4-Linien und die RNAi-Linien auf drei verschiedene Arten kombiniert: *repo>Dicer2* + *mbc*<sup>RNAi(VDRC# 16044)</sup>, *gcm>nGFP* + *mbc*<sup>RNAi(VDRC# 16044)</sup> und *repo>act::GFP* + *mbc*<sup>TRIP-RNAi (BL# 32355)</sup>. Untereinander zeigen die drei Experimente bei der Distanz zwischen ePG9 und dem Ich keinen signifikanten Unterschied. Im Vergleich zur Kontrolle ist der Abstand allerdings in allen drei Fällen signifikant größer. Der Unterschied in der Distanz zwischen ePG9 und dem Ich fällt allerdings im Vergleich zwischen den *knock-down* Experimenten und WT (29 °C) (≈ 9 µm) sehr viel schwächer aus als zwischen der transheterozygoten *mbc* Mutante und dem WT(18 °C – 25 °C) (≈ 19 µm). Zudem liegen anders als in der *mbc* Mutante nicht alle ePG als Cluster in der Nähe des ZNS (Abb. 3.3B), sondern die zentral generierten ePG, die dorsal von ePG4 lokalisiert sind, liegen näher zusammen (Abb. 3.6B). Außerdem treten die in der *mbc* Mutante beobachteten Wegfindungsdefekte der Motoraxone hier nicht auf und auch ePG12 liegt an ihrer wildtypischen Position (Abb. 3.6B). Die Ergeb-



nisse der *knock-down* Experimente ergeben somit eine zellautonome Funktion von Mbc während der Migration der zentral generierten ePG. Allerdings scheinen in der *mbc* Mutante zusätzlich sekundäre Effekte die Migration der ePG zu beeinflussen.



**Abb. 3.6: Der Verlust von *mbc* in allen ePG führt zu Migrationsdefekten bei ePG9**

(A) Um die Migration der ePG quantitativ zu analysieren, wurde der Abstand zwischen dem Zellkern von ePG9 und dem Ich gemessen. Die Messwerte für WT (18 °C – 25 °C) (Median = -8,02 μm), WT (29 °C) (Median = -2,19 μm), Kontrolle: *Cyo/+; UAS-*mbc*<sup>RNAi</sup> (VDRC# 16044)/+* (29 °C) (Median = -1,03 μm), *repo>Dicer2, >*mbc*<sup>RNAi</sup> (VDRC# 16044)* (29 °C) (Median = -10,6 μm), *gcm>nGFP, >*mbc*<sup>RNAi</sup> (VDRC# 16044)* (29 °C) (Median = -12,8 μm) und *repo>act::GFP, >*mbc*<sup>TRIP-RNAi</sup> (BL# 32355)* (29 °C) (Median = -10,6 μm) sind als Boxplot dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit einem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test überprüft. \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; n.s.: nicht signifikant. (B) Abgebildet ist ein abdominales Hemisegment (Filetpräparat) von einem Embryo (*repo>Dicer2, >*mbc*<sup>RNAi</sup> (VDRC# 16044)* (29 °C)) im späten Stadium 16. Angefärbt sind die Zellkerne der ePG (gelb) und die peripheren Nerven (cyan). Markiert sind die peripheren Nerven SN, ISN und TN, das Ich (gestrichelter Kreis), ePG4 und ePG9 (Pfeilspitze). Die ePG dorsal von ePG4 liegen sehr eng zusammen, axonale Wegfindungsdefekte treten nicht auf. Anterior ist oben und ventral links.

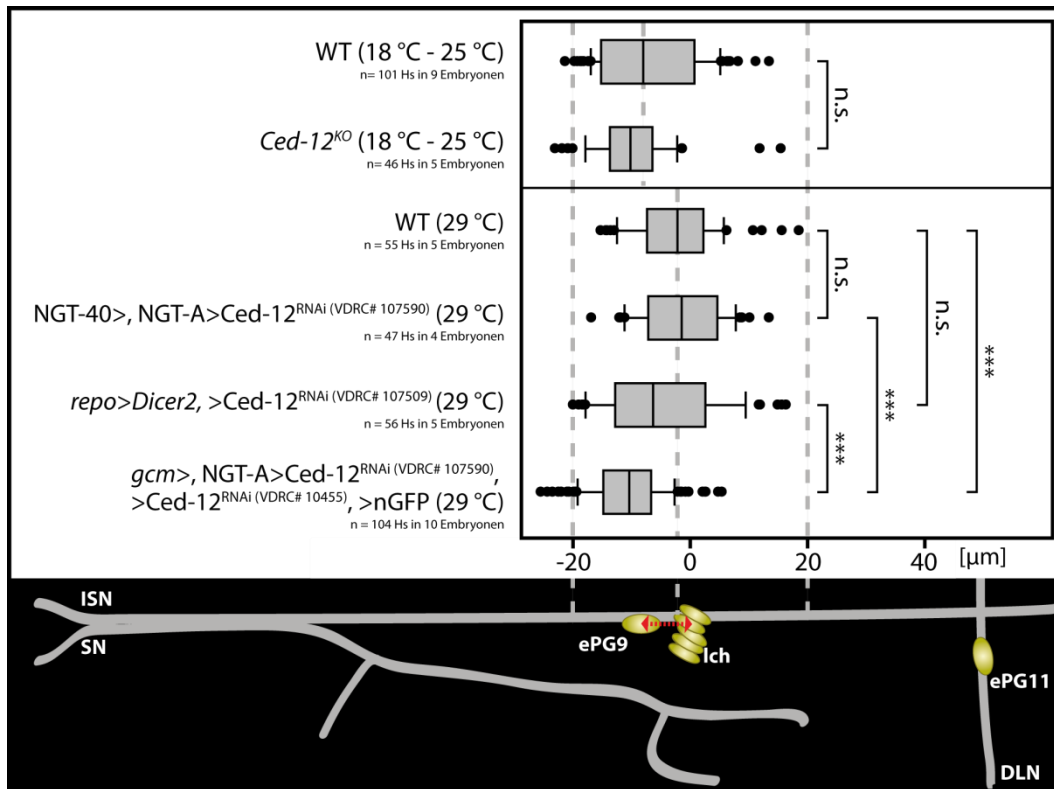
### 3.4. Interaktionspartner von Mbc und ihre Rolle bei der glialen Migration

Mbc spielt neben der bereits erwähnten Entwicklung der somatischen Muskeln bei verschiedenen anderen Prozessen eine Rolle, darunter bei der Migration der *border cells* (Duchek et al., 2001). Bei diesen Zellen handelt es sich um ein Cluster aus 6 bis 10 spezialisierten somatischen Follikelzellen, die während der frühen Oogenese vom anterioren Ende der Eikammer bis zur Oozyte wandern (Montell et al., 2012). Aus mehreren Arbeiten zur Muskelentwicklung bzw. zur Migration der *border cells* sind Faktoren bekannt, die mit Mbc interagieren können. Der wichtigste davon ist die kleine GTPase Rac1, die von Mbc aktiviert werden kann, was für das orthologe Protein DOCK1 (Dock180) bei Vertebraten gezeigt werden konnte (Brugnera et al., 2002). Ein weiterer wichtiger Interaktionspartner ist Ced-12, das sowohl bei der Fusion der Myoblasten (Geisbrecht et al., 2008) als auch bei der Migration der *border cells* (Bianco et al., 2007) eine Rolle spielt. Allerdings konnte bisher nicht geklärt werden, welche Rolle es bei der Aktivierung von Rac1 einnimmt. Zudem ist bekannt, dass die Migration der *border cells* über einen Signalweg, ausgehend von den Transmembranrezeptoren Epidermal growth factor receptor (Egfr) und PDGF- and VEGF-receptor related (Pvr), gesteuert wird (Duchek and Rorth, 2001, Duchek et al., 2001, Bianco et al., 2007). In diesem Zusammenhang ist das Adapterprotein Crk für die Rekrutierung von Mbc zu den Transmembranrezeptoren von Bedeutung (Geisbrecht et al., 2008). Für die Interaktionen mit den verschiedenen Faktoren verfügt Mbc insgesamt über drei konservierte Domänen. Am N-Terminus eine *Src homology 3* (SH3)-Domäne (Aminosäure 10 bis 72), die mit der prolinreichen C-terminalen Region von Ced-12 interagieren kann. Bei den beiden anderen Domänen handelt es sich zum einen um eine *DOCK homology region-1* (DHR-1) (Aminosäure 444 bis 623), die an den sekundären Botenstoff Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>) in der Zellmembran binden kann. Auf diese Weise wird Mbc an die Zellmembran rekrutiert. Zum anderen um eine *DOCK homology region-2* (DHR-2) (Aminosäure 1251 bis 1664), welche die katalytische Domäne des Proteins darstellt. An dieser Stelle wird Rac1 gebunden und durch den Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) zu Guanosintriphosphat (GTP) aktiviert. Am C-Terminus folgt noch eine prolinreiche Region, von der aus z. B. bei der Migration der *border cells* über das Adapterprotein Crk eine Verbindung zu Egfr oder Pvr hergestellt wird.

#### 3.4.1. Ced-12 ist an der Migration der ePG beteiligt

Um herauszufinden ob *Ced-12* (auch bekannt als *elmo*) eine Rolle bei der Migration der ePG spielt, wurde analog zur *mbc* Mutante die Position der ePG in *Ced-12* mutanten Embryonen im späten Stadium 16 analysiert. Dazu wurden verschiedene Allele verwendet, u. a. die

EMS-Allele *Ced-12*<sup>19F3</sup> und *Ced-12*<sup>9F4</sup> (Geisbrecht et al., 2008); außerdem das Nullallel *Ced-12*<sup>KO</sup> (Bianco et al., 2007). Bei allen verwendeten Allelen handelt es sich um homozygot letale Mutationen. Die Analyse der beiden Allele *Ced-12*<sup>19F3</sup> und *Ced-12*<sup>9F4</sup> ergab im homozygoten Zustand sehr starke Phänotypen sowohl im PNS als auch im ZNS, die sowohl die axonale Wegfindung als auch Position und Anzahl der Gliazellen betrifft (Daten nicht gezeigt). Allerdings konnten die Phänotypen in transheterozygoten Mutanten nicht reproduziert werden. Daher gehen sie vermutlich auf sekundäre Mutationen zurück, die zusätzlich zu den beschriebenen Mutationen im *Ced-12* Locus vorhanden sind. Um die Migration der ePG zu analysieren, wurde deshalb das Allel *Ced-12*<sup>KO</sup> verwendet. Diese Mutation wurde über homologe Rekombination induziert, wobei der gesamte *Ced-12* Locus gegen ein *white* Gen ausgetauscht wurde. Da es bei dieser Methode mit hoher Wahrscheinlichkeit zu keinen sekundären Mutation kommt, kann man davon ausgehen, dass es sich um ein reines Nullallel von *Ced-12* auf einem ansonsten wildtypischen Chromosom handelt. Die quantitative Auswertung der glialen Migration in homozygoten *Ced-12*<sup>KO</sup> Mutanten ergab keinen signifikanten Unterschied zum WT (Abb. 3.7). Allerdings ist bekannt, dass *Ced-12* über eine sehr starke maternale Komponente verfügt, die z. B. die Muskelentwicklung in *Ced-12* Mutanten retten kann (Geisbrecht et al., 2008). Um zu untersuchen, ob die maternale Komponente von *Ced-12* auch für die Migration der ePG ausreichend ist, wurden verschiedene *knock-down* Experimente durchgeführt. Auch hier bei 29 °C um das Gal4/UAS-Systems zu verstärken. Dazu wurden zwei verschiedene maternale Gal4-Treiberlinien (NGT-40 und NGT-A) benutzt. Bei diesem System wird mRNA, die über die kodierende Sequenz von Gal4 und den 3'-UTR des Gens *αTub84B* verfügt, unter Kontrolle des *nanos* Promotors in den Nährzellen der Eikammer exprimiert und in die Oozyte transportiert. Dies ermöglicht in Kombination mit einem *Ced-12* spezifischen RNAi Konstrukt eine Reduzierung der maternalen Komponente (NGT-40>, NGT-A>*Ced-12*<sup>RNAi</sup> (VDRC# 107590)). In diesem Experiment konnte allerdings bei der Distanz zwischen ePG9 und dem Ich kein signifikanter Unterschied zum WT bei 29 °C gefunden werden (Abb. 3.7). Ein *knock-down* Experiment mit der glialen Treiberlinie *repo*-Gal4 in Kombination mit einem *Ced-12* spezifischen RNAi Konstrukt (*repo*>*Dicer2*, >*Ced-12*<sup>RNAi</sup> (VDRC# 107590)) hatte ebenfalls keine signifikante Auswirkung auf die Position von ePG9 (Abb. 3.7). Die Kombination einer maternalen und einer glialen Treiberlinie dagegen (*gcm*-Gal4>, NGT-A> *Ced-12*<sup>RNAi</sup> (VDRC# 107590), >*Ced-12*<sup>RNAi</sup> (VDRC# 10455), >nGFP) führt zu einer signifikanten Vergrößerung des Abstands zwischen Ich und ePG9 (Median = -10,4 µm, n = 104 Hs, Abb. 3.7). Das bedeutet *Ced-12* ist in die Migration der ePG involviert und diese Funktion kann entweder durch maternales oder durch glial exprimiertes Genprodukt erfüllt werden.



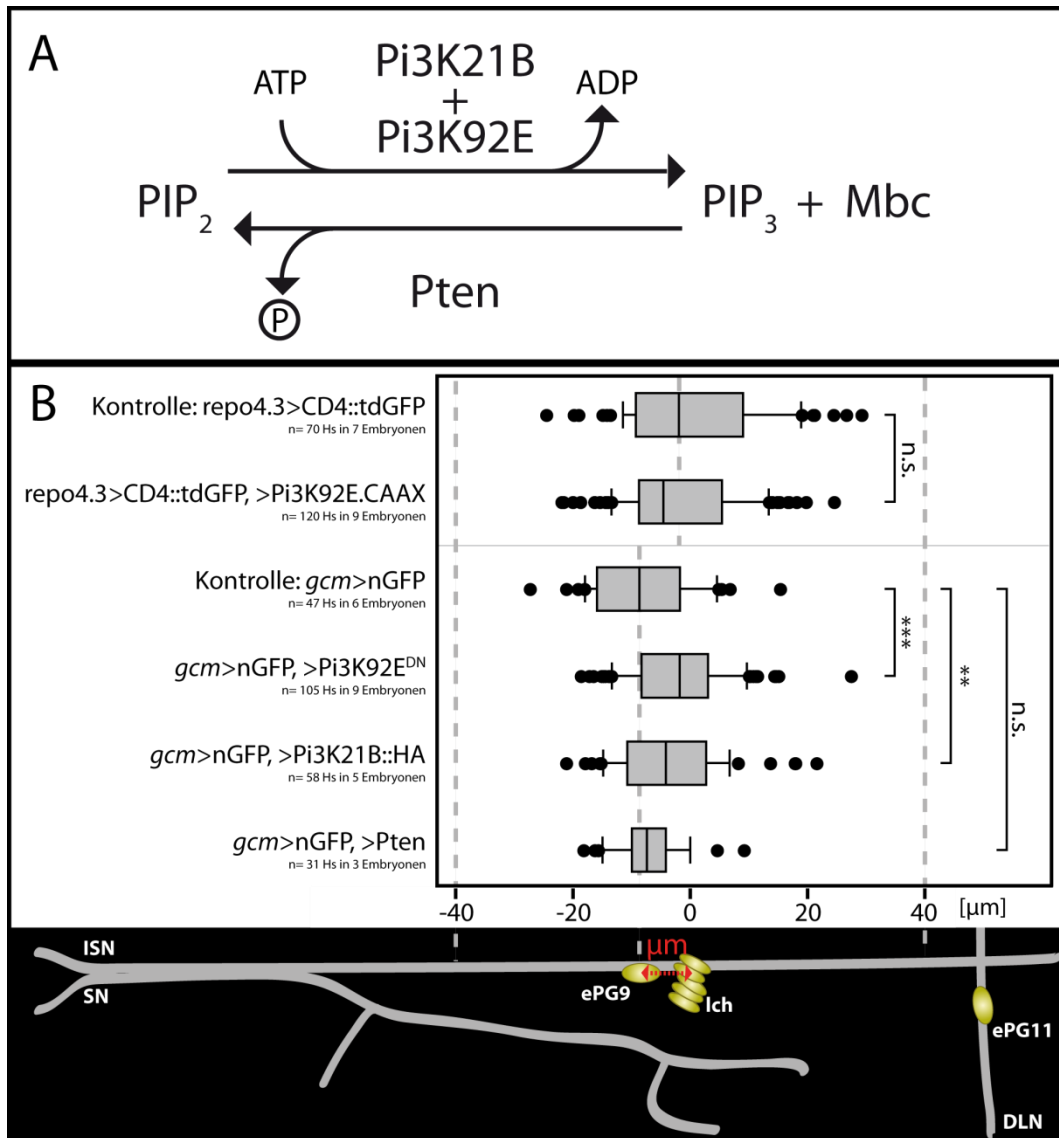
**Abb. 3.7: Ced-12 spielt eine Rolle bei der Migration der ePG**

Um die Migration der ePG quantitativ zu analysieren, wurde der Abstand zwischen dem Zellkern von ePG9 und dem Ich gemessen. Die Messwerte für WT (18 °C – 25 °C) (Median = -8,02 μm), homozygote *Ced-12<sup>KO</sup>* Mutanten (Median = -10,2 μm), WT (29 °C) (Median = -2,19 μm), *NGT-40>, NGT-A>Ced-12<sup>RNAi</sup>* (VDR# 107590) (29 °C) (Median = -1,48 μm), *repo>Dicer2, >Ced-12<sup>RNAi</sup>* (VDR# 107590) (29 °C) (Median = -6,33 μm), und *gcm>, NGT-A>Ced-12<sup>RNAi</sup>* (VDR# 107590), *>Ced-12<sup>RNAi</sup>* (VDR# 10455), *>nGFP* (29 °C) (Median = -10,4 μm) sind als Boxplot dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit einem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test überprüft. \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; n.s.: nicht signifikant.

### 3.4.2. Einfluss des Phospholipids PIP<sub>3</sub> auf die Migration der ePG

Jede Zelle muss für eine gerichtete Migration eine Polarität aufweisen. Schlüsselmoleküle bei der Polarisierung von Zellen sind die beiden Phospholipide PIP<sub>3</sub> und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>). Beide Moleküle sind Bestandteil der Plasmamembran und können durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung ineinander umgewandelt werden. Dieser Schritt wird durch Phosphoinositid-3-Kinasen (Pi3K) der Klasse I bzw. der antagonistisch wirkenden Phosphatase Pten katalysiert (Goberdhan et al., 1999) (Abb. 3.8A). In migrierenden Zellen befindet sich am vorderen Ende, dem so genannten Leitsaum, eine erhöhte Konzentration von PIP<sub>3</sub>. Über spezielle Domänen, die mit PIP<sub>3</sub> interagieren, können in diesem Bereich Proteine aus dem Zytoplasma an die Membran rekrutiert werden. Klasse I-Pi3K bestehen aus einer katalytischen Untereinheit und einer Adapteruntereinheit, die zusammen ein funktionales Heterodimer bilden. In *D. melanogaster* kodiert das Gen *Pi3K92E* für die katalytische Untereinheit (Leevers et al., 1996) und *Pi3K21B* für den Adapter (Weinkove et

al., 1997). Die Aktivität von Pi3K92E wird über die intrazelluläre Lokalisation reguliert. Im inaktiven Zustand liegt Pi3K92E im Zytoplasma vor und ist somit räumlich von PIP<sub>2</sub> in der Membran getrennt. Erst durch die Rekrutierung, über die Adapteruntereinheit Pi3K21B, an die Membran kommt Pi3K92E in Kontakt mit PIP<sub>2</sub> und kann es in PIP<sub>3</sub> umwandeln. Da das Pi3K Heterodimer am Leitsaum der Zelle lokalisiert ist, ist dort die Konzentration an PIP<sub>3</sub> am höchste. Die Phosphatase Pten liegt dagegen in allen Bereichen der Zelle, außer dem Leitsaum vor. Durch die Lokalisierung der beiden Antagonisten in unterschiedlichen Bereichen der Zelle kann der Gradient zwischen PIP<sub>3</sub> und PIP<sub>2</sub> und somit die Polarität der Zelle aufrechterhalten werden. Mbc bindet über seine DHR1-Domäne an PIP<sub>3</sub> und kann auf diese Weise an die Membran rekrutiert werden. Um die Rolle von PIP<sub>3</sub> bei der Migration der ePG zu untersuchen, wurden verschiedene Konstrukte ektopisch in Gliazellen exprimiert, um den Gradienten zwischen PIP<sub>3</sub> und PIP<sub>2</sub> zu verändern. Hierzu wurde zum einen eine konstitutiv aktive Form von Pi3K92E (Pi3K92E.CAAX) verwendet. Diese Form wird posttranskriptionell, durch die kovalente Anheftung einer hydrophoben Prenylgruppe, modifiziert, was die Anlagerung von Pi3K92E.CAAX an die Zellmembran ermöglicht. An der Membran kann Pi3K92E.CAAX PIP<sub>2</sub> umsetzen. Da in diesem Fall die Rekrutierung durch die Adapteruntereinheit umgangen wird ist das Enzym in allen Bereichen der Zelle aktiv und sollte so die Bildung eines Gradienten zwischen PIP<sub>3</sub> und PIP<sub>2</sub> stören. Die Position der am weitesten ausgewanderten zentral generierten ePG wird durch die Überexpression von Pi3K92E.CAAX im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant verändert (Abb. 3.8B). Erstaunlicherweise führt dagegen die Überexpression einer dominant negativen Form der katalytischen Untereinheit (Pi3K92E<sup>DN</sup>) mit einer Mutation in der ATP Bindestelle (D954A) zu einer signifikanten Übermigration von ePG9 (Median = -1,8 µm, n = 105 Hs) im Vergleich zur Kontrolle (Median = -8,7 µm, n = 47 Hs). Ebenso führt die Überexpression der Adapteruntereinheit (Pi3K21B::HA) zu einer signifikanten Übermigration (Median = -4,2 µm, n = 58 Hs). Die Überexpression der Phosphatase Pten führt dagegen zu keinem signifikanten Unterschieden bei der Migration (Abb. 3.8B).



**Abb. 3.8: Der Einfluss von PIP3 auf die Migration der ePG**

(A) Ein Heterodimer aus Pi3K21B und Pi3K92E phosphoryliert Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>). Die Phosphatase Pten dagegen dephosphoryliert PIP<sub>3</sub> zu PIP<sub>2</sub>. Mbc kann über die DHR1-Domäne mit PIP<sub>3</sub> interagieren. (B) Um die Migration der ePG quantitativ zu analysieren, wurde der Abstand zwischen dem Zellkern von ePG9 und dem Ich gemessen. Die Messwerte für *repo4.3>CD4::tdGFP* (Median = -1,9 μm), *repo4.3>CD4::tdGFP, >Pi3K92E.CAAX* (Median = -4,6 μm), *gcm>nGFP* (Median = -8,68 μm), *gcm>nGFP, >Pi3K92E<sup>DN</sup>* (Median = -1,8 μm), *gcm>nGFP, >Pi3K21B::HA* (Median = -4,2 μm), *gcm>nGFP, >Pten* (Median = -7,4 μm) sind als Boxplot dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit einem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test überprüft. \*\*\*: p ≤ 0,001; \*\*: p ≤ 0,01; n.s.: nicht signifikant.

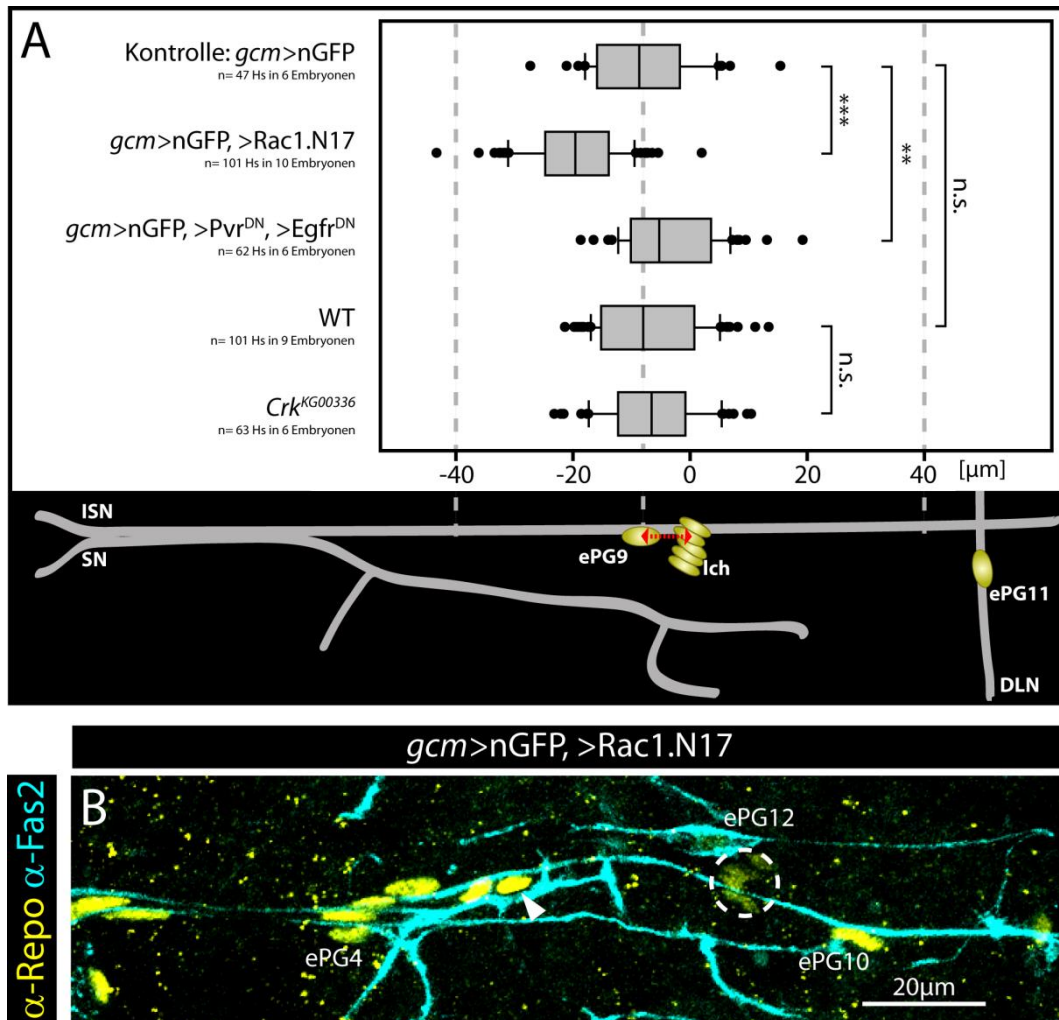
### 3.4.3. Rac1, nicht jedoch Egfr, Pvr oder Crk sind in die Migration der ePG involviert

Im Folgenden wurden Rac1, das Substrat von Mbc, und drei weitere Faktoren, die als Interaktionspartner von Mbc an der Migration der *border cells* beteiligt sind, auf eine mögliche Funktion während der Migration der ePG getestet. Um die Rolle von Rac1 bei der Migration der ePG zu untersuchen, wurde eine dominant negative Form von Rac1 (UAS-Rac1.N17) mit Hilfe der glialen Treiberlinie *gcm-Gal4* exprimiert. Dies führt zu einer signifikanten Vergrößerung der Distanz zwischen ePG9 und dem Ich (Median = -19,6  $\mu\text{m}$ , n = 101 Hs) im Vergleich zur Kontrolle (Median = -8,68  $\mu\text{m}$ , n = 47 Hs) (Abb. 3.9A). Allerdings ist der Unterschied der Mediane mit  $\approx 11 \mu\text{m}$  schwächer als der Unterschied zwischen WT und der transheterozygoten *mbc* Mutante ( $\approx 19 \mu\text{m}$ ). Der Phänotyp erinnert stattdessen stark an die glialen *knock-down* Experimente, bei denen *mbc* herunter reguliert wurde. In beiden Fällen liegen, anders als in der *mbc* Mutante, lediglich die zentral generierten ePG, die dorsal von ePG4 positioniert sind enger zusammen. Außerdem fällt auf, dass ePG10 und ePG12, die unabhängig von den zentral generierten ePG migrieren, an ihrer wildtypischen Position liegen und somit nicht von der ektopischen Expression von Rac1.N17 beeinflusst werden (Abb. 3.9B).

Im Übrigen wurden die beiden Transmembranrezeptoren Egfr, Pvr und das Adapterprotein Crk näher untersucht. Eine Analyse von *Egfr* Mutanten ist nicht möglich, da dieser Faktor während der Embryogenese an einer Vielzahl von Entwicklungsprozessen beteiligt ist (Katzen et al., 1991), was schwere Missbildungen nach sich zieht. Dazu kommt, dass Pvr die Funktion von Egfr während der Migration der *border cells* übernehmen kann (Duchek et al., 2001). Um sekundäre Effekte und redundante Funktionen auszuschließen, wurden deshalb dominant negative Formen der beiden Rezeptoren (UAS-Egfr<sup>DN</sup> und UAS-Pvr<sup>DN</sup>) gliaspezifisch mit der Treiberlinie *gcm-Gal4* exprimiert. Durch die ektopischen Expression kommt es zu einer leichten Übermigration von ePG9 (Median = -5,275  $\mu\text{m}$ , n = 62 Hs) im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.9A). Um zu testen ob *Crk* in die gliale Migration involviert ist, wurden mutante *Crk*<sup>KG00336</sup> Embryonen analysiert. Bei diesem Allel handelt es sich um die Insertion eines transgenen Transposons in den 5'-UTR des Gens *Crk* (Ishimaru et al., 2004). In homozygot mutanten Embryonen ist der Abstand zwischen ePG9 und Ich (Median = -6,59  $\mu\text{m}$ , n = 63 Hs) nicht signifikant unterschiedlich zum WT (Median = -8,02  $\mu\text{m}$ , n = 101 Hs) (Abb. 3.9A).

Zusammengefasst zeigt die Analyse der Interaktionspartner, dass es anscheinend einen Kernkomplex aus Mbc, Ced-12 und Rac1 gibt, der ähnlich wie bei der Fusion der Myoblasten oder der Migration der *border cells*, auch in die Migration der ePG involviert ist. Weitere Fak-

toren, die für die Migration der *border cells* beschrieben sind (Egfr, Pvr und Crk), scheinen allerdings bei der glialen Zellwanderung keine Rolle zu spielen, d. h. Mbc muss in den ePG über einen alternativen Signalweg aktiviert werden. Die Rolle von PIP<sub>3</sub> konnte anhand der durchgeführten Experimente nicht eindeutig bestimmt werden, eventuell müssten dazu weitere Versuche durchgeführt werden.



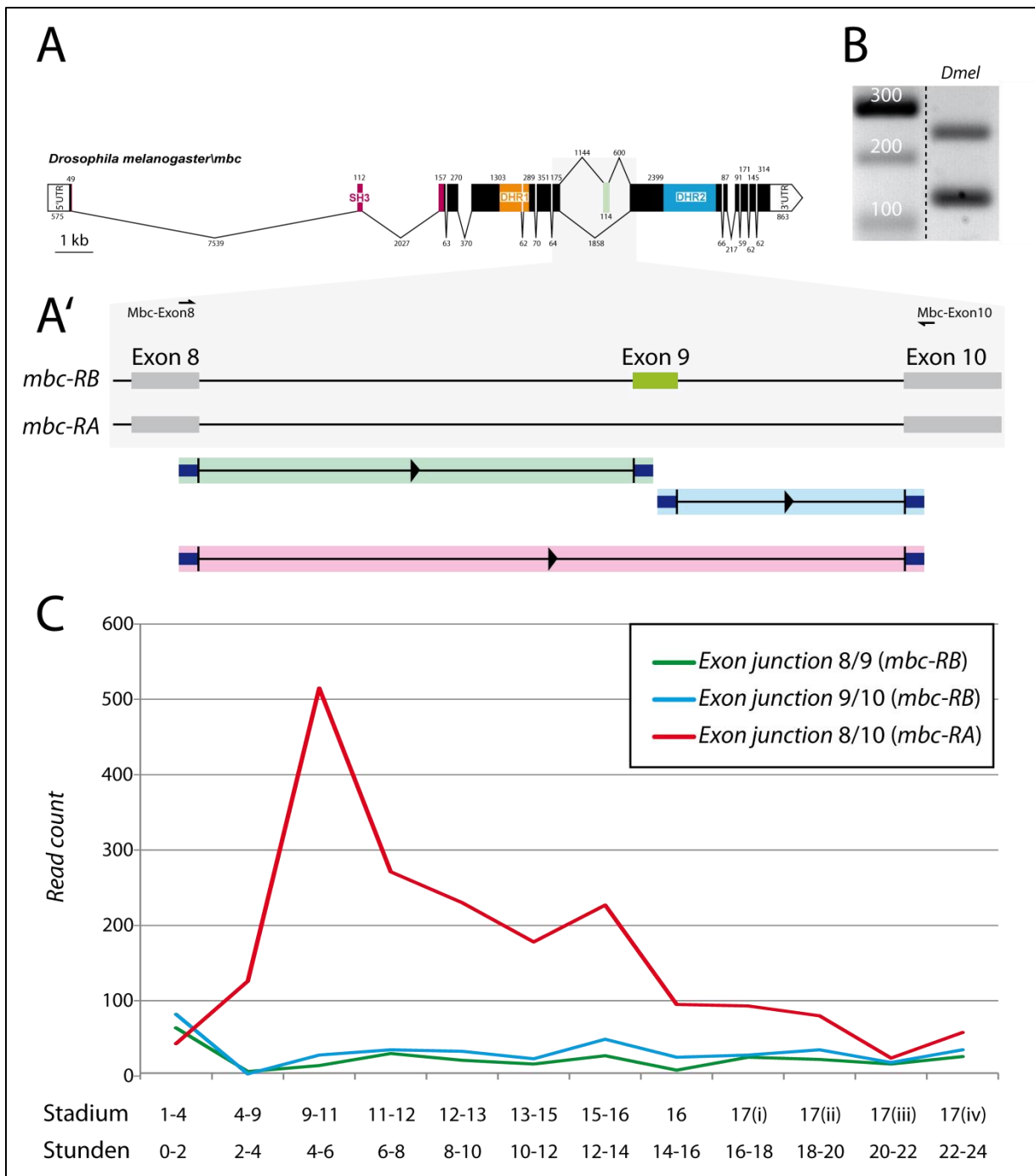
**Abb. 3.9: Rolle von Rac1, Egfr, Pvr und Crk bei der Migration der ePG**

(A) Um die Migration der ePG quantitativ zu analysieren, wurde der Abstand zwischen dem Zellkern von ePG9 und dem Ich gemessen. Die Messwerte für *gcm>nGFP* (Median = -8,68 μm), *gcm>nGFP, >Rac1.N17* (Median = -19,6 μm), *gcm>nGFP, >Egfr<sup>DN</sup>, >Pvr<sup>DN</sup>* (Median = -5,275 μm), WT (Median = -8,02 μm) und *Crk<sup>KG00336</sup>* (Median = -6,59 μm) sind als Boxplot dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit einem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test überprüft. \*\*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; n.s.: nicht signifikant. (B) Abgebildet ist ein abdominales Hemisegment (Filetpräparat) von einem *gcm>nGFP + Rac1.N17* Embryo im späten Stadium 16. Angefärbt sind die Zellkerne der ePG (gelb) und die peripheren Nerven (cyan). Markiert sind das Ich (gestrichelter Kreis), ePG4, ePG10, ePG12 und ePG9 (Pfeilspitze). Die ePG dorsal von ePG4 liegen sehr eng zusammen, dagegen ist die Migration von ePG10 und ePG12 nicht beeinträchtigt. Außerdem treten keine axonale Wegfindungsdefekte auf. Anterior ist oben und ventral links.



### 3.5. Im Embryo werden 2 verschiedene Isoformen von *mbc* exprimiert

In *D. melanogaster* sind zwei Isoformen für *mbc* annotiert. Zum einen *mbc-RA*, bestehend aus 14 Exons mit einer Länge von 7351 nt (RefSeq ID: NM\_057796), zum anderen *mbc-RB*. Diese Isoform enthält ein zusätzliches Exon (*mbc:9*, ab hier als Exon 9 bezeichnet) mit einer Länge von 114 nt und hat somit eine Gesamtlänge von 7465 nt (RefSeq: NM\_001260338) (Abb. 3.10A). Um zu überprüfen, ob beide Isoformen embryonal exprimiert werden, wurde eine PCR auf cDNA aus wildtypischen Embryonen durchgeführt. Die Primer wurden dabei flankierend zu Exon 9 in die beiden benachbarten Exons gelegt (Abb. 3.10A'). Als Ergebnis treten zwei PCR-Produkte mit einer Größe von  $\approx 130$  bp und  $\approx 250$  bp auf (Abb. 3.10B). Die einzelnen Banden konnten durch Sequenzierung jeweils einer der beiden Isoformen zugeordnet werden (siehe Anhang 4). Um die Expression der beiden Isoformen während der Embryonalentwicklung näher zu analysieren, wurden Daten der *Library* modENCODE\_mRNA-Seq\_U\_junctions verwendet (Graveley et al., 2011). Diese Daten wurden durch Sequenzieren von cDNA erstellt. Es handelt sich dabei ausschließlich um kurze *Exon junction*-überspannende Sequenzen, die so den Isoformen eindeutig zugeordnet werden können. Angegeben ist die Anzahl der auftretenden Sequenzen an einer bestimmten *Exon junction* (*Read count*), zu einem bestimmten Zeitpunkt während der Embryonalentwicklung. Analysiert wurden hier die für Isoform *mbc-RA* spezifische *Exon junction* 8/10 (Abb. 3.10A', rot markiert), sowie die für Isoform *mbc-RB* spezifischen *Exon junctions* 8/9 und 9/10 (grün bzw. blau markiert). Anhand der Daten lässt sich die Expressionstärke der beiden Isoformen im Laufe der Embryogenese verfolgen. *mbc-RA* wird nach 4-6 Stunden (Stadium 9-11) sehr stark hochreguliert. Diese Expression geht vermutlich auf die Myoblasten zurück, die kurz danach in Stadium 12-13 zu Muskelzellen fusionieren. Danach flacht die Expression zum Ende der Embryogenese hin ab. *mbc-RB* wird dagegen eher konstant, allerdings im Vergleich zu *mbc-RA* sehr viel schwächer exprimiert (Abb. 3.10C, die Daten sind vollständig in Anhang 5 aufgelistet).



**Abb. 3.10: Alternatives Spleißen von *mbc* und Expression der beiden Isoformen im Embryo**

(A) Schematische Darstellung der Exon-Intron Struktur von *mbc*. Markiert sind Bereiche, die für Domänen kodieren (SH3 in magenta, DHR1 in orange und DHR2 in blau), das alternativ gespleißte Exon 9 ist grün markiert. Die Zahlen geben die Größe der einzelnen Exons und Introns an. (A') Vergrößerte Darstellung des Bereichs, in dem alternatives Spleißen auftritt. Angegeben ist die Lage der beiden Primer Mbc-Exon8 und Mbc-Exon10, sowie die für *mbc-RA* spezifische *Exon junction 8/10* (rot) und die beiden für *mbc-RB* spezifischen *Exon junction 8/9* (grün) und *Exon junction 9/10* (blau). (B) Mit Hilfe der beiden Primer Mbc-Exon8 und Mbc-Exon10 lassen sich aus embryonaler cDNA von *D. melanogaster* zwei PCR-Produkte amplifizieren mit einer Größe von  $\approx 130$  bp und  $\approx 250$  bp. (C) Expressionsprofil der beiden Isoformen während der Embryonalentwicklung. Dargestellt ist die Anzahl von kurzen *Exon junction* überspannenden Sequenzen (*Read count*) in embryonaler cDNA zu verschiedenen Zeitpunkten während der Embryonalentwicklung. Die Daten sind Teil der *Library modENCODE\_mRNA-Seq\_U\_junctions* (Graveley et al., 2011).

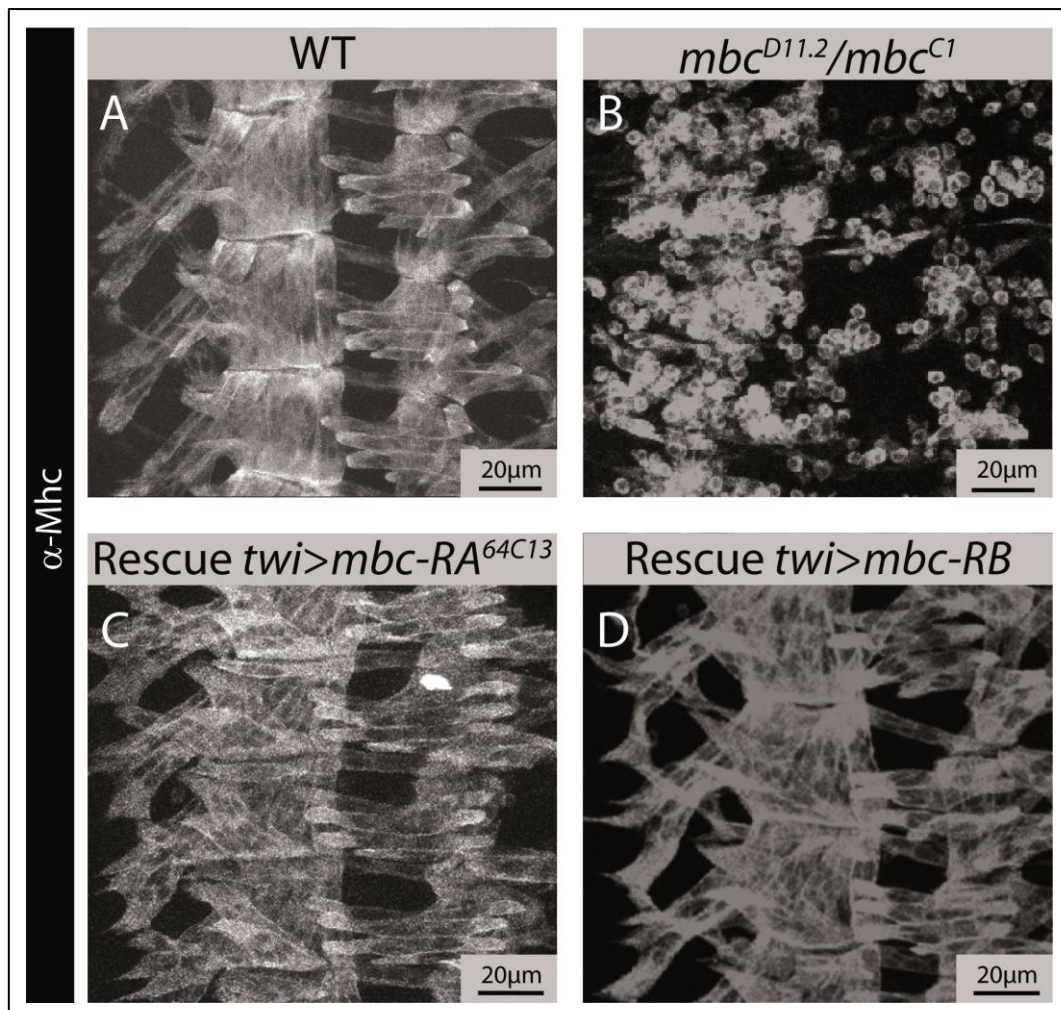
### 3.6. Die beiden Isoformen von Mbc zeigen funktionelle Unterschiede

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob funktionelle Unterschiede zwischen den beiden Isoformen bestehen. Dazu wurden Rettungsexperimente mit jeweils einer einzelnen Isoform durchgeführt. Bei dieser Art von Experiment wird ein bestimmtes Protein mit Hilfe des Gal4/UAS-Systems im mutanten Hintergrund exprimiert. Die Vorteile hierbei sind, dass zum einen durch die Wahl einer geeigneten Gal4-Treiberlinie die Expression auf eine gewünschte Zellpopulation beschränkt werden kann. Zum anderen wird jeweils nur eine einzelne Isoform exprimiert, da die Sequenz eines UAS-Konstrukts der mRNA entspricht. Somit sind keine Introns vorhanden und alternatives Spleißen kann nicht auftreten. Durch die „Rettung“ einzelner Phänotypen in bestimmten Zellpopulationen kann man so auf die Funktionen der einzelnen Isoformen rückschließen. Für die hier durchgeführten Experimente wurden zwei verschiedene UAS-Konstrukte verwendet, die jeweils die Expression einer einzelnen Isoform erlauben. Um Mbc-PA zu exprimieren wurde ein Fliegenstamm aus dem Labor von Susan Abmayr benutzt (UAS-*mbc-RA*) (Balagopalan et al., 2006). Da der Integrationsort des UAS-Konstrukts nicht bekannt war, wurde dieser, im Rahmen eines von mir betreuten F2-Praktikums, von Christina Heiser mit Hilfe einer *Splinkerette* PCR (Potter and Luo, 2010) identifiziert. Das Konstrukt konnte so auf dem dritten Chromosom unmittelbar vor dem Gen *Kinesin-like protein at 64D (Klp64D)*, in der zytologischen Bande 64C13 (Anhang 6) lokalisiert werden und wird daher ab hier als UAS-*mbc-RA*<sup>64C13</sup> bezeichnet. Das Konstrukt UAS-*mbc-RB* wurde im Rahmen dieser Arbeit kloniert und mit Hilfe der Integrase PhiC31 (Groth et al., 2004) gerichtet in attP2 auf dem 3. Chromosom integriert.

#### 3.6.1. Beide Isoformen können den Muskelphänotyp retten

Um den muskulären Phänotyp zu retten, wurde der Treiberstamm *twist (twi)*-Gal4 rekombiniert mit UAS-EGFP auf dem Balancerchromosom Cyo (ab hier *twi*-Gal4 genannt) genutzt. Im *mbc* mutantern Hintergrund ermöglicht dies in Kombination mit dem Konstrukt UAS-*mbc-RA*<sup>64C13</sup> bereits früh in der Entwicklung (Stadium 8) eine Expression von Mbc-PA im Mesoderm, aus dem sich die Muskeln entwickeln (Halfon et al., 2002). Wie bereits Studien aus dem Labor von Susan Abmayr zeigen, lässt sich so die wildtypische Muskelentwicklung vollständig retten und das typische Muster der somatischen Muskeln entsteht (Balagopalan et al., 2006) (Abb. 3.11C). Die Expression von Mbc-PB mit dem gleichen Gal4-Treiber im gleichen *mbc* mutantern Hintergrund resultiert ebenfalls in einer vollständigen Rettung der Muskeln (Abb. 3.11D). Somit lässt sich zum einen zeigen, dass von beiden UAS-Konstrukten ein funktionsfähiges Protein gebildet werden kann, zum anderen, dass beide Isoformen die gleiche Funktion bei der Fusion der Myoblasten übernehmen können. Wie bereits gezeigt, konnte bei dem Rettungsexperiment mit der mesodermalen Treiberlinie *twi*-Gal4 und UAS-*mbc-*

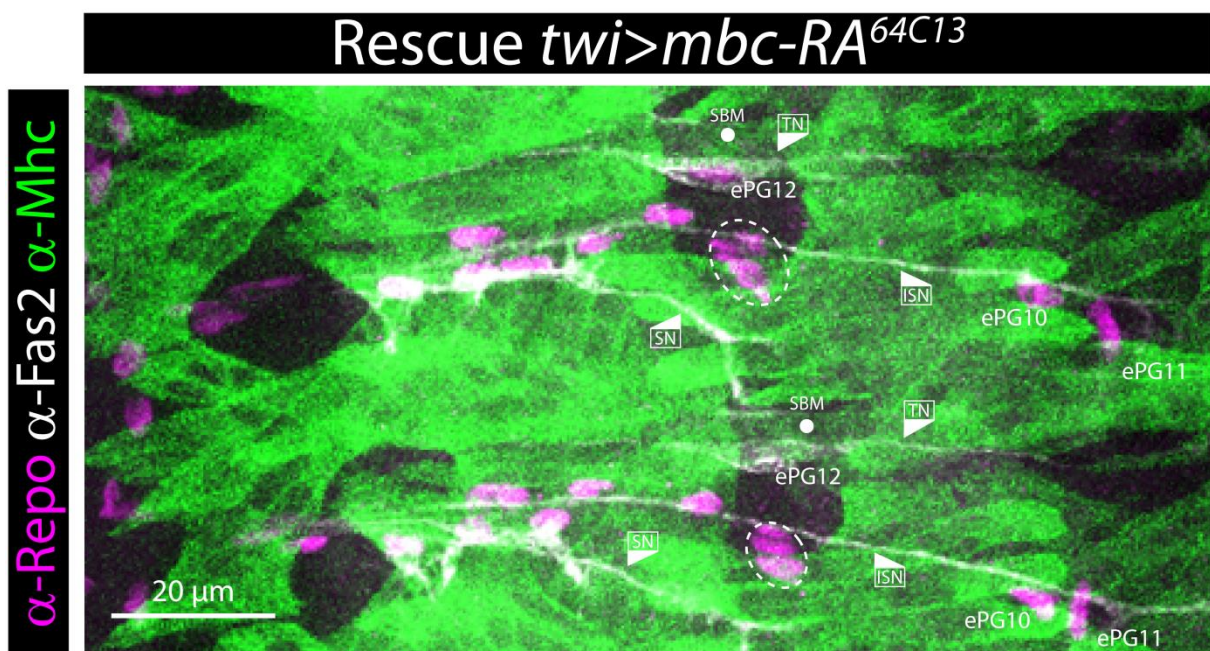
RA das wildtypische Muster der Muskeln gerettet werden, zudem treten jedoch die in der *mbc* Mutante beobachteten axonalen Phänotypen der Motorneurone (Abb. 3.1C) in diesen Embryonen nicht auf (Abb. 3.12). Das zeigt, dass es sich bei den axonalen Phänotypen um sekundäre Effekte handelt, die auf Grund der fehlentwickelten Muskeln auftreten, die im WT als finales Ziel der auswachsenden Motoraxone dienen.



**Abb. 3.11: Beide Isoformen von Mbc können den Muskelphänotyp retten**

Dargestellt sind die somatischen Muskeln von drei abdominalen Hemisegmenten, die mit Hilfe eines Antikörpers gegen Mhc angefärbt wurde. (A) Wildtypisches Muster der abdominalen Muskeln. (B) In transheterozygoten *mbc* Mutanten (*mbc*<sup>D11.2</sup>/*mbc*<sup>C1</sup>) findet man anstelle der Muskeln nicht fusionierte Myoblasten. (C-D) Durch Expression von *mbc-RA* bzw. *mbc-RB* unter der Kontrolle von *twi*-Gal4 kann der Muskelphänotyp gerettet werden (C) Genotyp: Cyo *twi*-Gal4, UAS-2xEGFP/+; *mbc*<sup>D11.2</sup>, UAS-*mbc-RA*<sup>64C13</sup>/*mbc*<sup>C1</sup> (D) Genotyp: Cyo *twi*-Gal4, UAS-2xEGFP/+; *mbc*<sup>D11.2</sup>, UAS-*mbc-RB*/*mbc*<sup>C1</sup>.

Überraschenderweise erscheinen auch die Migrationsdefekte der übrigen ePG wesentlich schwächer als in der *mbc* Mutante (vgl. Abb. 3.1C und Abb. 3.12). Um diesen Eindruck zu überprüfen, wurde der Abstand zwischen dem Ich und ePG9 bestimmt. Diese Messung zeigt eine deutliche Abschwächung der Migrationsdefekte im Rettungsexperiment (Median = -14,6  $\mu\text{m}$ , n = 28 Hs, Abb. 3.13A und B) im Vergleich zur *mbc* Mutante (Median = -27,1  $\mu\text{m}$ , n = 35 Hs, Abb. 3.13A). Allerdings besteht auch ein deutlicher Unterschied zu den im WT gemessenen Abständen (Median = -8,02  $\mu\text{m}$ , n = 101 Hs, Abb. 3.13A). Die glialen Migrationsdefekte können also deutlich reduziert aber nicht vollständig gerettet werden. Dieses Experiment zeigt sehr eindrucksvoll, wie eng die Entwicklung der drei verschiedenen Zellpopulationen miteinander verknüpft ist. Die aus dem ZNS auswachsenden Motoraxone brauchen die Muskeln als finales Ziel und die auswandernden Gliazellen brauchen wiederum die Axone als Substrat. So beeinflusst die Entwicklung der Muskeln indirekt die Migration der ePG.



**Abb. 3.12: Durch die Rettung der Muskeln werden auch axonale und gliale Phänotypen gerettet**

Abgebildet ist ein Ausschnitt (zwei Hemisegmente) eines präparierten Embryos im späten Stadium 16 mit dem Genotyp: *Cyo twi-Gal4, UAS-2xEGFP/+; mbc<sup>D11.2</sup>, UAS-mbc-RA<sup>64C13</sup>/mbc<sup>C1</sup>* (Rescue: *twi>mbc-RA*). Anfärbt sind die Zellkerne der ePG (magenta), die peripheren Nerven (weiß) und die somatischen Muskeln (grün). Markiert sind die peripheren Nerven SN, ISN und TN, die eindeutig identifizierbaren Gliazellen ePG10, ePG11 und ePG12, das Ich (gestrichelter Kreis), sowie der SBM. Die peripheren Nerven sowie die Anordnung der ePG erscheint wildtypisch, besonders der TN und die eng assoziierte ePG12 liegen an ihrer wildtypischen Position am SBM.

### 3.6.2. Die Migration der ePG kann nur von Mbc-PB gerettet werden

Wie bereits durch die *knock-down* Experimente gezeigt werden konnte, hat Mbc zusätzlich eine zellautonome Funktion bei der Migration der ePG. Um zu überprüfen, ob diese Funktion ebenfalls von beiden Isoformen übernommen werden kann, wurden auch hier Rettungsexperimente durchgeführt. Als gliaspezifische Treiberlinie wurde *gcm*-Gal4 rekombiniert mit UAS-nGFP (ab hier *gcm*>nGFP genannt) genutzt. Die gliale Expression von Mbc-PA in *mbc* mutantern Hintergrund hat keinen Effekt auf das Migrationsverhalten der ePG. Die ermittelten Abstände zwischen ePG9 und dem Ich (Median = -21,3  $\mu\text{m}$ , n = 95 Hs) zeigt keinen signifikanten Unterschied zur *mbc* Mutante (Abb. 3.13A und C). Im Gegensatz dazu führt die gliale Expression von Mbc-PB in *mbc* mutantern Hintergrund zu einer sehr deutlichen Veränderung im Migrationsverhalten der ePG. Bei diesem Rettungsexperiment nimmt ePG9 eine Position sehr nahe am Ich ein (Median = -3,4  $\mu\text{m}$ , n = 56 Hs) und wandert somit über die wildtypische Position hinaus (Abb. 3.13A und D). Diese Experimente zeigen somit klar einen funktionellen Unterschied zwischen den beiden Isoformen. Mbc-PA kann die Funktion von Mbc-PB während der Migration der ePG nicht übernehmen, wohingegen bei der Muskelentwicklung beide Isoformen funktional sind.

#### Abb. 3.13: Nur Mbc-PB kann die zellautonome Funktion während der Migration der ePG übernehmen (nächste Seite)

(A) Um die Migration der ePG quantitativ zu analysieren, wurde der Abstand zwischen dem Zellkern von ePG9 und dem Ich gemessen. Die Messwerte für WT (Median = -8,02  $\mu\text{m}$ ), transheterozygote *mbc* Mutanten (*mbc*<sup>D11.2</sup>/*mbc*<sup>C1</sup>) (Median = -27,1  $\mu\text{m}$ ), Rescue *twi*>*mbc*-RA<sup>64C13</sup> (Median = -14,6  $\mu\text{m}$ ), Rescue *gcm*>*mbc*-RA<sup>64C13</sup> (Median = -21,3  $\mu\text{m}$ ) und Rescue *gcm*>*mbc*-RB (Median = -3,4  $\mu\text{m}$ ) sind als Boxplot dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit einem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test überprüft. \*\*\*: p  $\leq$  0,001; n.s.: nicht signifikant. (B-D) Abgebildet ist jeweils ein abdominales Hemisegment (Filetpräparat) von Embryonen im späten Stadium 16. Angefärbt sind die Zellkerne der ePG (gelb) und die peripheren Nerven (cyan). Markiert sind das Ich (gestrichelter Kreis) und ePG9 (Pfeilspitze). Bei allen Bildern ist anterior oben und ventral links. (B) Rescue *twi*>*mbc*-RA<sup>64C13</sup>. Durch die Rettung des Muskelphänotyps wird auch der axonale und der gliale Phänotyp der *mbc* Mutante deutlich reduziert. (C) Rescue *gcm*>*mbc*-RA<sup>64C13</sup>. Die gliale Expression von *mbc*-RA in *mbc* mutantern Hintergrund hat keinen Einfluss auf die Migrationsdefekte der ePG, die hier wie in der Mutante als Cluster nahe am ZNS liegen. (D) Rescue *gcm*>*mbc*-RB. Im *mbc* mutantern Hintergrund kann durch die Expression von *mbc*-RB in allen Gliazellen der Migrationsphänotyp gerettet werden. Allerdings nehmen die meisten ePG nicht ihre wildtypische Position an den peripheren Nerven ein und axonale Wegfindungsdefekte treten auch weiterhin auf.

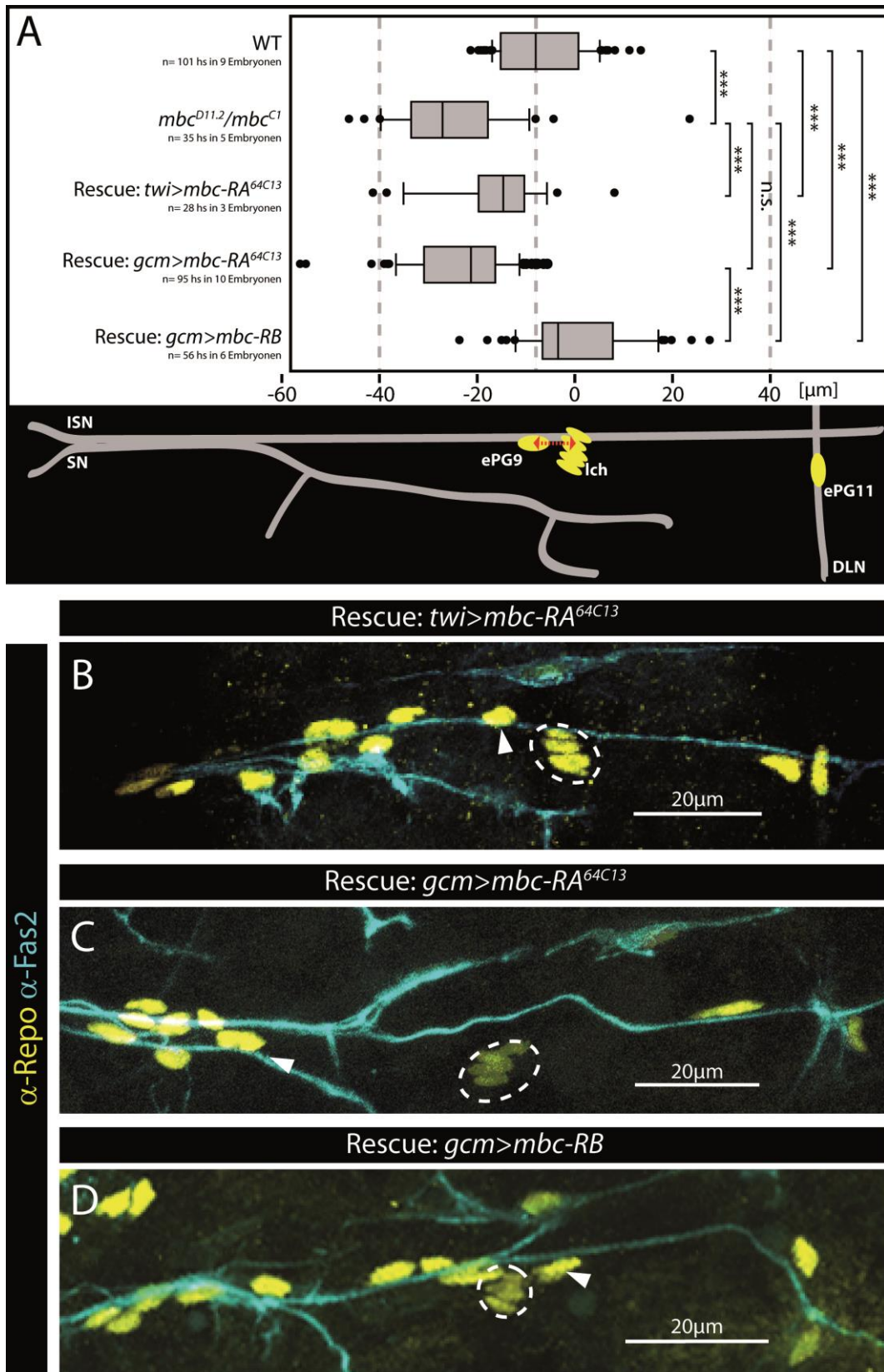


Abb. 3.13: Nur Mbc-PB kann die zellautonome Funktion während der Migration der ePG übernehmen (Legende siehe vorherige Seite)

Um die funktionellen Unterschiede der beiden Isoformen näher zu analysieren, wurden weitere Rettungsexperimente durchgeführt. Als zweite gliaspezifische Treiberlinie wurde *repo4.3-Gal4* verwendet, in diesem Fall mit *UAS-CD4::tdGFP* rekombiniert (ab hier als *repo4.3>CD4::tdGFP* bezeichnet). Dabei handelt es sich um eine membrangebundene Form von GFP, die es erlaubt die Morphologie der Zellen zu analysieren. Im wildtypischen Hintergrund bilden die ePG eine durchgehende Hülle um die peripheren Nerven (Abb. 3.14B). Problematisch ist, dass durch die Expression von *CD4::tdGFP* die Migration der ePG beeinflusst wird. Die Distanz zwischen ePG9 und dem Ich ist hier im Vergleich zum WT signifikant reduziert (Median = -1,94  $\mu\text{m}$ , n = 70 Hs, Abb. 3.14A). Derselbe Effekt tritt auch bei der Expression von *CD4::tdGFP* mit der Treiberlinie *Mz97-Gal4* auf und geht vermutlich auf eine, durch *CD4::tdGFP* hervorgerufene, veränderte Zusammensetzung der Membranproteine zurück. Eine vollständige Übersicht über alle verwendeten Gal4-Linien und den Einfluss der GFP Expression auf die Migration von ePG9 befindet sich im Anhang (Anhang 7). Genau wie bei den Rettungsexperimenten mit der Treiberlinie *gcm>nGFP*, zeigen sich auch in diesem Fall die funktionellen Unterschiede zwischen den beiden Isoformen. Die gliaspezifische Expression von *Mbc-PB* in *mbc* mutantern Hintergrund führt zu einer vollständigen Rettung des Migrationsphänotyps, die gemessenen Abstände zwischen Ich und ePG9 (Median = -3,85  $\mu\text{m}$ , n = 45 Hs) zeigen keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (*repo4.3>CD4::tdGFP*) (Abb. 3.14A). Im Rettungsexperiment, in dem *Mbc-PA* exprimiert wurde, ist der gemessene Abstand dagegen sehr viel größer (Median = -12,65  $\mu\text{m}$ , n = 118 Hs), zeigt allerdings auch einen signifikanten Unterschied zur *mbc* Mutante. Diese vermeintliche Rettung der Migrationsdefekte tritt vermutlich aufgrund der glialen Expression von *CD4::tdGFP* auf (Abb. 3.14A). Morphologisch unterscheiden sich die zentral generierten ePG im wildtypischen Hintergrund (Abb. 3.14B) extrem von denen im Rettungsexperiment mit *repo4.3>CD4::tdGFP* und *UAS-mbc-RA<sup>64C13</sup>*. Die Zellkörper der zentral generierten ePG bilden hier ein Cluster im ventralen Bereich des PNS, aus der nur einzelne Zellausläufer herausragen, die mit den Motoraxonen assoziiert sind (Abb. 3.14C, Pfeile). Oft ist zudem der Teil des Nerven zwischen ePG9 und ePG10 nicht von glialen Ausläufern umhüllt (Abb. 3.14C, Stern). Im Rettungsexperiment mit *Mbc-PB* dagegen verteilen sich die glialen Zellkörper, ähnlich wie im wildtypischen Hintergrund, entlang der peripheren Nerven (Abb. 3.14D). Außerdem sind die Axone der peripheren Nerven durchgehend umhüllt. Allerdings ist die Schicht aus Gliazellen im ventralen Bereich des PNS sehr viel dicker im Vergleich zum wildtypischen Hintergrund und die ePG nehmen teilweise nicht ihre charakteristischen Positionen entlang der peripheren Nerven ein (Abb. 3.14D). Beispielsweise liegt ePG4, erkennbar an ihrem nach posterior verlaufenden Zellausläufer, nah am ZNS und damit weiter ventral als im WT. Vermutlich geht diese falsche Positionierung der ePG auf den Einfluss der Motoraxone zurück, da der axonale Phänotyp in diesem Experiment nicht gerettet wurde.



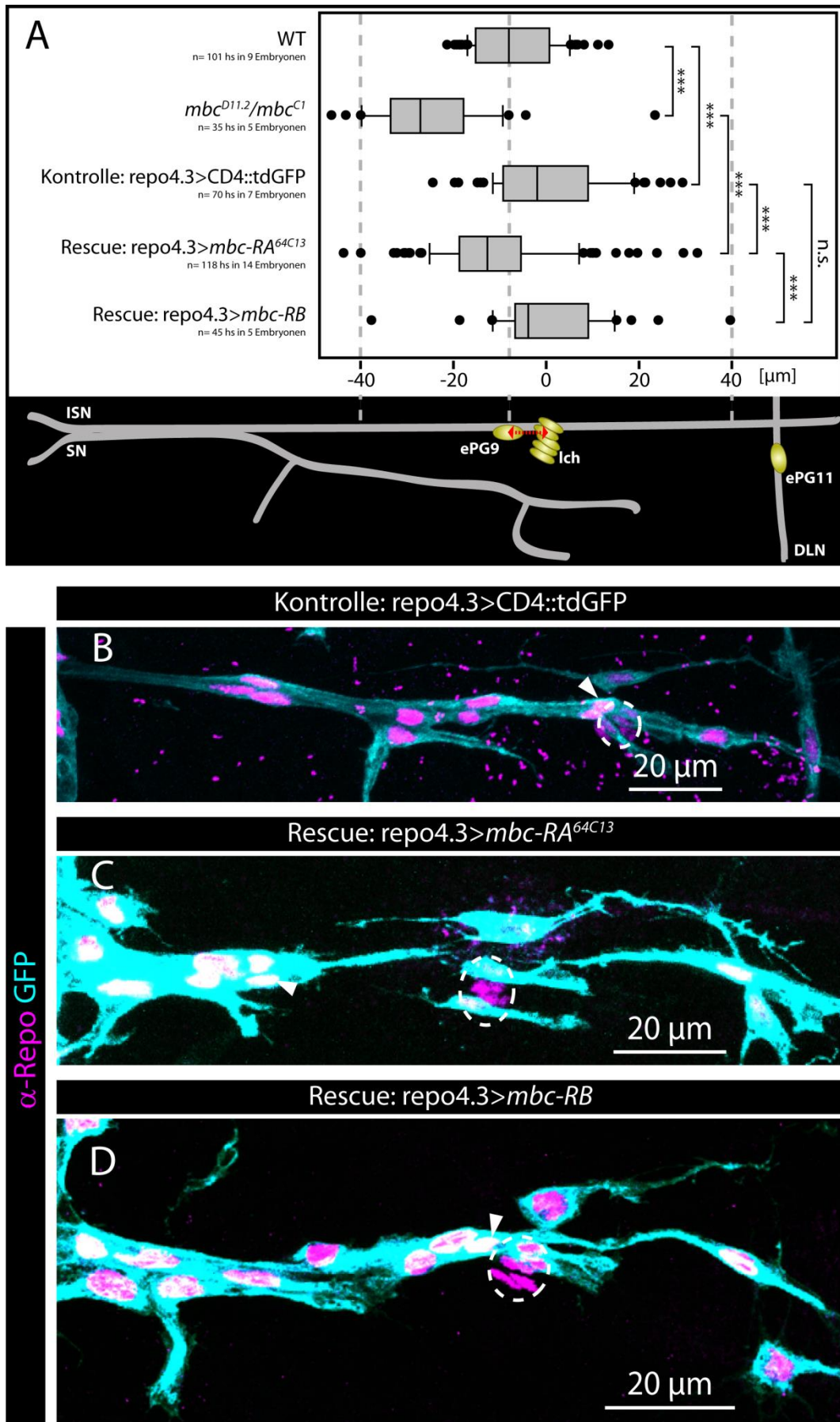


Abb. 3.14: Expression von Mbc-PB in den ePG rettet die glialen Migrationsdefekte (Legende siehe nächste Seite)

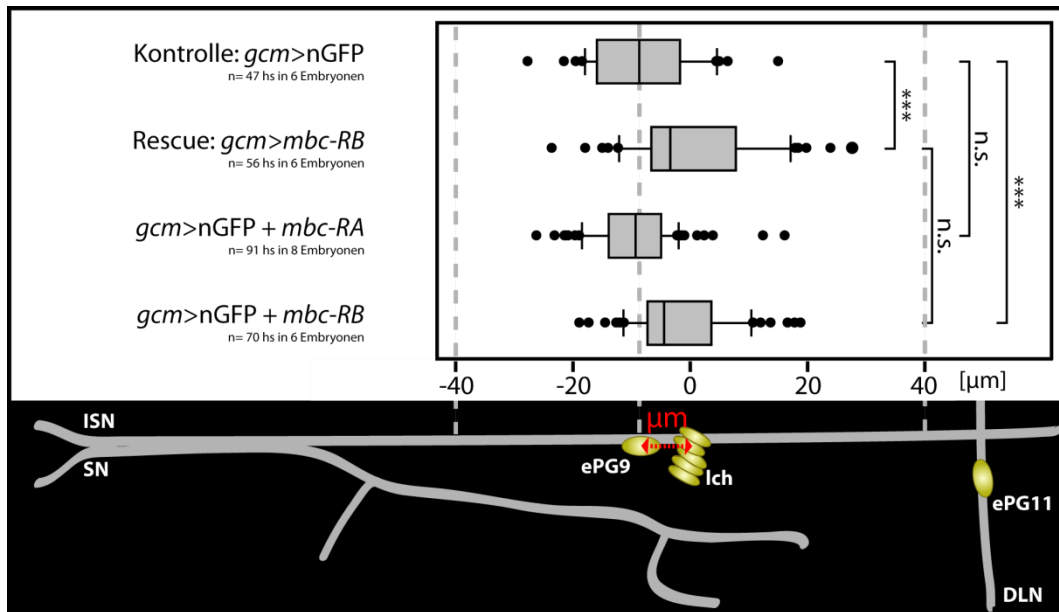
### Abb. 3.14: Expression von Mbc-PB in den ePG rettet die glialen Migrationsdefekte (vorherige Seite)

(A) Um die Migration der ePG quantitativ zu analysieren, wurde der Abstand zwischen dem Zellkern von ePG9 und dem Ich gemessen. Die Messwerte für WT (Median =  $-8,02 \mu\text{m}$ ), transheterozygote *mbc* Mutanten (*mbc<sup>D11.2</sup>/mbc<sup>C1</sup>*) (Median =  $-27,1 \mu\text{m}$ ), *repo4.3>CD4::tdGFP* (Median =  $-1,94 \mu\text{m}$ ), Rescue *repo4.3>mbc-RA<sup>64C13</sup>* (Median =  $-12,65 \mu\text{m}$ ) und Rescue *repo4.3>mbc-RB* (Median =  $-3,85 \mu\text{m}$ ) sind als Boxplot dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit einem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test überprüft. \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; n.s.: nicht signifikant. (B-D) Abgebildet ist jeweils ein abdominales Hemisegment (Filetpräparat) von Embryonen im späten Stadium 16. Angefärbt sind sowohl die Zellkerne (magenta) als auch die Membranen (cyan) der ePG. Markiert sind das Ich (gestrichelter Kreis), ePG4 und ePG9 (Pfeilspitze). Bei allen Bildern ist anterior oben und ventral links. (B) *repo4.3>CD4::tdGFP*. Die ePG nehmen ihre wildtypische Position entlang der peripheren Nerven ein und bilden eine durchgehende Hülle um die Axone. (C) Rescue *repo4.3>mbc-RA<sup>64C13</sup>*. Die zentral generierten ePG liegen als Cluster nahe am ZNS, lediglich einige Zellausläufer ragen aus dem Zellcluster heraus (Pfeile). Die ePG bilden keine durchgängige Hülle um die peripheren Nerven, auf Höhe des Ich besteht keine Verbindung zwischen dem Zellcluster und ePG10 (Stern). (D) Rescue *repo4.3>mbc-RB*: Die zentral generierten ePG liegen zwischen ZNS und Ich entlang der peripheren Nerven und bilden wieder eine durchgehende Hülle um die Axone. Die Morphologie weicht dennoch stark vom WT ab, die gliale Hülle ist z. B. im ventralen Bereich des PNS sehr viel dicker. Außerdem liegt ePG4 weiter ventral als in der Kontrolle.

### 3.6.3. Überexpression von Mbc-PB führt zu Übermigration von ePG9

Beim Rettungsexperiment mit *gcm>nGFP* und *UAS-mbc-RB* fällt auf, dass ePG9 näher am Ich liegt als im WT (Abb. 3.13A und D), also eine Übermigration auftritt. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt auf die erhöhte Konzentration von Mbc-PB in den ePG zurückzuführen ist, wurde Mbc-PB mit Hilfe der Treiberlinie *gcm>nGFP* im wildtypischen Hintergrund ektopisch exprimiert. In den analysierten Embryonen lässt sich ebenfalls eine Übermigration von ePG9 im Vergleich zur Kontrolle beobachten (Median =  $-4,445 \mu\text{m}$ ,  $n = 70$  Hs). Die ermittelten Werte für die Distanz zwischen ePG9 und dem Ich sind dabei nicht signifikant unterschiedlich zum Rettungsexperiment mit *gcm>nGFP* und *UAS-mbc-RB* (Abb. 3.15). Um auch hier die funktionellen Unterschiede zwischen den beiden Isoformen zu analysieren, wurde das Experiment ebenfalls mit Mbc-PA durchgeführt. Da bei Experimenten dieser Art die Stärke der ektopischen Expression von entscheidender Bedeutung ist und diese oft vom Integrationsort des UAS-Konstrukts abhängt, wurde hier nicht die Linie *UAS-mbc-RA<sup>64C13</sup>* verwendet. Stattdessen wurde das Konstrukt *UAS-mbc-RA* gerichtet in attP2 auf dem dritten Chromosom integriert, der gleiche Locus in den auch *UAS-mbc-RB* integriert wurde. Die Überexpression von Mbc-PA zeigt, im Gegensatz zu Mbc-PB, bei der Distanz zwischen ePG9 und dem Ich (Median =  $-9,3 \mu\text{m}$ ,  $n = 91$  Hs) keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (*gcm>nGFP*, Median =  $-8,7 \mu\text{m}$ ,  $n = 47$  Hs) und beeinflusst die Migration der ePG somit nicht.

Zusammengefasst zeigen die Rettungsexperimente sowie die Überexpression der einzelnen Isoformen, dass die Funktion von Mbc während der Migration der ePG ausschließlich von Isoform B übernommen werden kann. Es liegt also ein funktioneller Unterschied zwischen den beiden Isoformen vor.



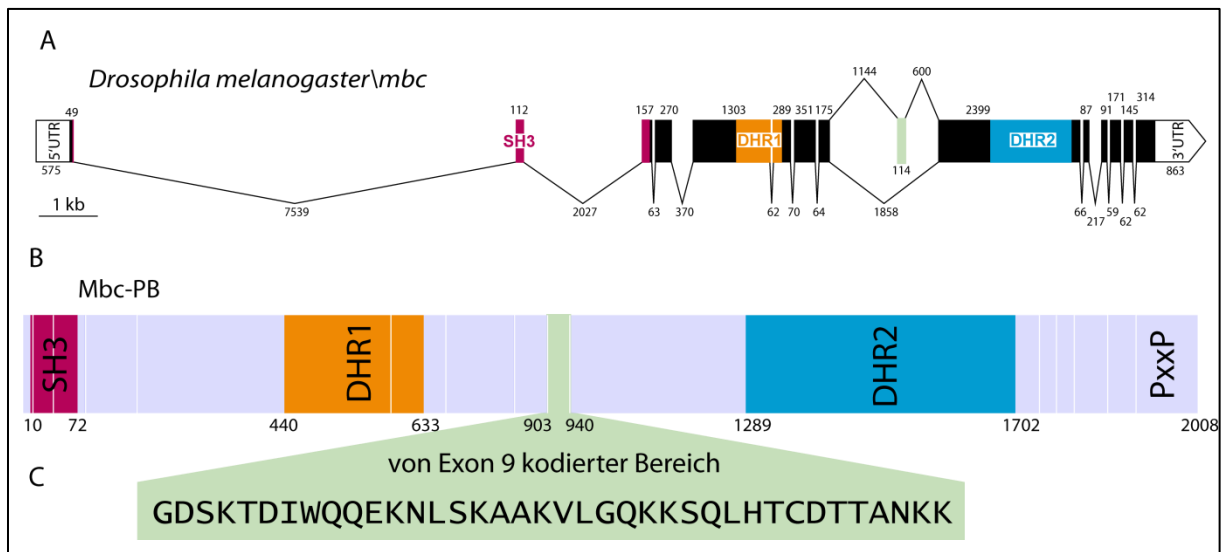
**Abb. 3.15: Gliale Überexpression von *mbc-RB* führt zur Übermigration von ePG9**

Um die Migration der ePG quantitativ zu analysieren, wurde der Abstand zwischen dem Zellkern von ePG9 und dem Ich gemessen. Die Messwerte für *gcm>nGFP* (Median =  $-8,68 \mu\text{m}$ ), Rescue *gcm>mbc-RB* (Median =  $-3,4 \mu\text{m}$ ), *gcm>nGFP, >mbc-RA* (Median =  $-9,33 \mu\text{m}$ ) und *gcm>nGFP, >mbc-RB* (Median =  $-4,445 \mu\text{m}$ ), sind als Boxplot dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit einem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test überprüft. \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; n.s.: nicht signifikant.

### 3.7. Exon 9 ist der einzige Unterschied zwischen den beiden Isoformen von *mbc*

Wie anhand der Rettungsexperimente gezeigt werden konnte, besteht ein funktioneller Unterschied zwischen den beiden Isoformen von Mbc, wobei Mbc-PB im Vergleich zu Mbc-PA zusätzliche Funktionen übernehmen kann. Der strukturelle Unterschied zwischen den beiden Isoformen besteht lediglich in einem einzigen alternativ gespleißten Exon (Exon 9), das in *mbc-RB*, nicht aber in *mbc-RA* enthalten ist (Abb. 3.16A). Im Protein ist der von Exon 9 kodierte Bereich etwa in der Mitte (AS903-AS940), zwischen der DHR1- und der DHR2-Domäne (Abb. 3.16B) lokalisiert und besteht lediglich aus 38 Aminosäuren (Abb. 3.16C). Da der alternativ gespleißte Bereich außerhalb der bekannten Domänen liegt, ist es relativ unwahrscheinlich, dass die Funktionen der einzelnen Domänen durch die zusätzlichen Aminosäuren verändert werden. Dafür spricht auch, dass Mbc-PB die Funktion von Mbc-PA während der Muskelentwicklung übernehmen kann, wie es durch die Rettungsexperimente mit *twi-Gal4* gezeigt werden konnte. Vielmehr scheint der alternativ gespleißte Bereich eine neue und von den bisher beschriebenen Domänen unabhängige Funktion zu vermitteln. Diese Funktion scheint absolut notwendig für die Aufgabe zu sein, die Mbc-PB während der

Migration der eGP übernimmt. Der alternativ gespleißte Bereich könnte z. B. eine neue Bindestelle für weitere Proteininteraktionen sein.



**Abb. 3.16: Unterschied zwischen den beiden Isoformen von *mbc***

(A) Schematische Darstellung der Exon-Intron Struktur von *mbc*. Markiert sind Bereiche, die für bekannte Domänen kodieren (SH3 in magenta, DHR1 in orange und DHR2 in blau), das alternativ gespleißte Exon 9 ist grün markiert. Die Zahlen geben die Größe der einzelnen Exons und Introns an. (B) Schematische Darstellung von Mbc-PB. Zusätzlich zu den bekannten Domänen ist zum einen die prolinreiche Region am C-Terminus markiert, zum anderen der alternativ gespleißte Bereich (grün). Die Zahlen geben jeweils die Position der ersten und letzten Aminosäure einer Domäne bzw. des alternativ gespleißten Bereichs an. Insgesamt hat Mbc-PB eine Länge von 2008 Aminosäuren. (C) Aminosäuresequenz des von Exon 9 kodierten Bereichs.

### 3.8. Mbc-PB wird durch Phosphorylierung von Exon 9 reguliert

Wie gezeigt, führt die ektopische Expression von Mbc-PB in den ePG zur Übermigration von ePG9 (Abb. 3.15). Dieser Effekt beruht vermutlich auf der erhöhten Konzentration von Mbc-PB in den Gliazellen und wirft die Frage auf, wie die Aktivität von Mbc-PB während der Migration der ePG reguliert wird. Die wohl am weitesten verbreitete Möglichkeit die Aktivität eines Proteins zu regulieren besteht in der Phosphorylierung. Zudem enthält der alternativ gespleißte Bereich von Mbc-PB insgesamt sieben phosphorylierbare Aminosäuren. Aus diesen Gründen wurde näher untersucht, ob die Aktivität von Mbc-PB durch Phosphorylierung reguliert wird.

#### 3.8.1. *In silico* Analyse der phosphorylierbaren Aminosäuren im alternativ gespleißten Bereich von Mbc-PB

Die einfachste Art um zu untersuchen ob eine Aminosäure potenziell phosphoryliert wird, ist eine *in silico* Analyse. Da jede Kinase über eine Substratspezifität verfügt, ist es möglich an-

hand der Sequenz, die die phosphorylierbare Aminosäure umgibt, die Wahrscheinlichkeit für die Phosphorylierung an dieser Position zu errechnen. Insgesamt habe ich für die *in silico* Analyse vier verschiedene Programme genutzt: *NetPhos 2.0*, *NetPhosK 1.0*, *GPS* und *GPS 2.1.2*. Innerhalb des von Exon 9 kodierten Bereichs liegen insgesamt sieben phosphorylierbare Aminosäuren, 3 Serine und 4 Threonine (Abb. 3.17). Das Programm *NetPhos 2.0* gibt die Wahrscheinlichkeit einer Phosphorylierung von Serin 905 (S905) mit über 99 % an, die übrigen phosphorylierbaren Aminosäuren dagegen zeigen einen sehr niedrigen Wert. Die Software *NetPhosK 1.0* dagegen gibt mit einer Wahrscheinlichkeit von 86 % den höchsten Wert für Threonin 935 (T935) an und das Programm *GPS* errechnet sowohl für S905 als auch für Threonin 936 (T936) einen Wert von 11 als höchsten Wert innerhalb des analysierten Bereichs. Die Nachfolgeversion (*GPS 2.1.2*) errechnet den höchsten Wert von 8,7 für Serin 928 (S928) (zusammengefasst in Abb. 3.17). Da die Resultate der verschiedenen Programme so unterschiedlich sind, müssen hier weitere Experimente durchgeführt werden, um die Funktion einzelner Aminosäuren genauer zu untersuchen. Allerdings geben die hier aufgeführten Ergebnisse eine Idee, welche der phosphorylierbaren Aminosäuren eine Rolle bei der Regulation von Mbc-PB spielen könnten. Drei der verwendeten Programme geben zusätzlich zur Wahrscheinlichkeit, ob eine Aminosäure phosphoryliert wird, auch eine potenzielle Kinase an, die an dieser Stelle phosphorylieren könnte. Eine Liste dieser Kinasen ist mit den entsprechenden Werten im Anhang aufgeführt (Anhang 11).

von Exon 9 kodierter Bereich							
	905	907	917	928	932	935	936
	GDSKTDIWQQEKNL S KAAKVLGQKKS QLHTCDTTANKK						
	S905	T907	S917	S928	T932	T935	T936
NetPhos 2.0	0,993	0,006	0,092	0,053	0,021	0,284	0,043
NetPhosK 1.0	0,46	0,56	0,60	0,46	0,45	0,86	0,43
GPS	11	8	4,893	5,2	7	7	11
GPS 2.1.2	7,222	5,667	7,667	8,7	4,706	7	4

**Abb. 3.17: *in silico* Analyse der phosphorylierbaren Aminosäuren des von Exon 9 kodierten Bereichs**

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz des von Exon 9 kodierten Bereichs. Alle phosphorylierbaren Aminosäuren sind anhand ihrer Position im Protein nummeriert. Für die *in silico* Analyse wurden insgesamt vier unterschiedliche Programme verwendet (linke Spalte). Jeweils nur der höchste Wert jedes Programms für jede Aminosäure ist hier angegeben. Die jeweils höchsten Werte jedes Programms innerhalb des analysierten Bereichs sind grün markiert. Eine Übersicht über alle Werte befindet sich im Anhang (Anhang 11).

### 3.8.2. Verschiedene Kinasen beeinflussen die Migration der ePG

Wie die *in silico* Analyse zeigt, werden mit hoher Wahrscheinlichkeit Aminosäuren innerhalb des von Exon 9 kodierten Bereichs phosphoryliert. Im nächsten Schritt wurde deshalb näher untersucht, ob und in welchem Maß die Migration der ePG von Kinasen beeinflusst wird. Bei den analysierten Kandidaten handelt es sich zum einen um Wallenda (*Wnd*), eine *MAP kinase kinase* (*MAP3K*), die von der Software *GPS* für die Phosphorylierung von T936 und mit einem geringeren Wert für T935 vorgeschlagen wurde (siehe Anhang 11). Zum anderen wurden Kinasen gewählt, die durch *Microarrays* als gliale Gene identifiziert wurden (Altenhein et al., 2006). Hier wurden speziell Kandidaten gewählt, die im Embryonalstadium 13, also vor der Migration der ePG, exprimiert werden. Im einzelnen wurden Mutanten folgender Kandidaten untersucht: *SNF4/AMP-activated protein kinase  $\lambda$  subunit* (*SNF4 $\lambda$* ), *LK6*, *grapes* (*grp*), *Casein kinase I $\alpha$*  (*CkI $\alpha$* ), *Integrin linked kinase* (*Ilk*), *foraging* (*for*), *JIL-1*, *par-1* und *cAMP-dependent protein kinase 1* (*Pka-C1*). Um die Migration der ePG zu analysieren wurde der Abstand zwischen ePG9 und dem Ich am Ende der Embryogenese gemessen. Alle Untersuchungen wurden im Rahmen der von mir betreuten Bachelorarbeit von Teresa Christl und eines F2-Praktikums von Christina Heiser durchgeführt. Insgesamt konnte bei der gemessenen Distanz zwischen ePG9 und dem Ich bei sechs der untersuchten Kandidaten kein signifikanter Unterschied zum WT festgestellt werden (alle Daten sind in Abb. 3.18 zusammengefasst). Diese Kinasen scheinen also nicht in die Migration der ePG involviert zu sein. Dagegen konnten bei insgesamt fünf Kandidaten signifikante Unterschiede bei der Position von ePG9 beobachtet werden. Darunter drei Mutanten, bei denen ePG9 ventral der wildtypischen Position liegt. Im Einzelnen: *JIL-1*<sup>3</sup> (Median = -14,1  $\mu\text{m}$ , n = 101 Hs), *Pka-C1*<sup>H2</sup> (Median = -15,15  $\mu\text{m}$ , n = 24 Hs) und *par-1*<sup>k06323</sup> (Median = -10,7  $\mu\text{m}$ , n = 91 Hs). Diese Kinasen scheinen also einen positiven Einfluss auf die Migration zu haben. Im Gegensatz dazu wandert ePG9 in zwei Mutanten über die wildtypische Position hinaus. Dabei handelt es sich um *for*<sup>k04703</sup> (Median = -4,05  $\mu\text{m}$ , n = 46 Hs) und *wnd*<sup>M100494</sup> (Median = -0,745  $\mu\text{m}$ , n = 26 Hs). Diese Kinasen scheinen einen hemmenden Einfluss auf die Migration der ePG zu haben. Die Software *NetPhosK 1.0* gibt als weiteren möglichen Kandidaten, für die Phosphorylierung von T935, Proteinkinase C (PKC) an (siehe Anhang 11). Bei *D. melanogaster* gibt es insgesamt drei für PKC kodierende Gene: *inactivation no afterpotential C* (*inaC*), *Protein C kinase 53E* (*Pkc53E*) und *Protein C kinase 98E* (*Pkc98E*). Die Aktivität von PKC wird durch eine 8 Aminosäuren lange autoinhibitorische Domäne am N-Terminus kontrolliert, die eine ähnliche Sequenz wie die Phosphorylierungsstelle der Zielproteine hat (Pseudosubstratdomäne). Um die Rolle von PKC bei der Migration der ePG zu analysieren, wurde die Pseudosubstratdomäne von *inaC* (UAS-PKCi) (Broughton et al., 1996) mit der Treiberlinie *repo4.3>CD4::tdGFP* ektopisch in allen Gliazellen exprimiert und auf diese Weise die Funktion von PKC inhibiert. Bei der Analyse der Distanz zwischen ePG9 und dem Ich konnte je-

doch kein Einfluss auf die Migration der ePG festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Im Weiteren wurde die Kinase Wnd näher untersucht, da in dieser Mutante der stärkste Effekte auf die Migration der ePG beobachtet wurde.

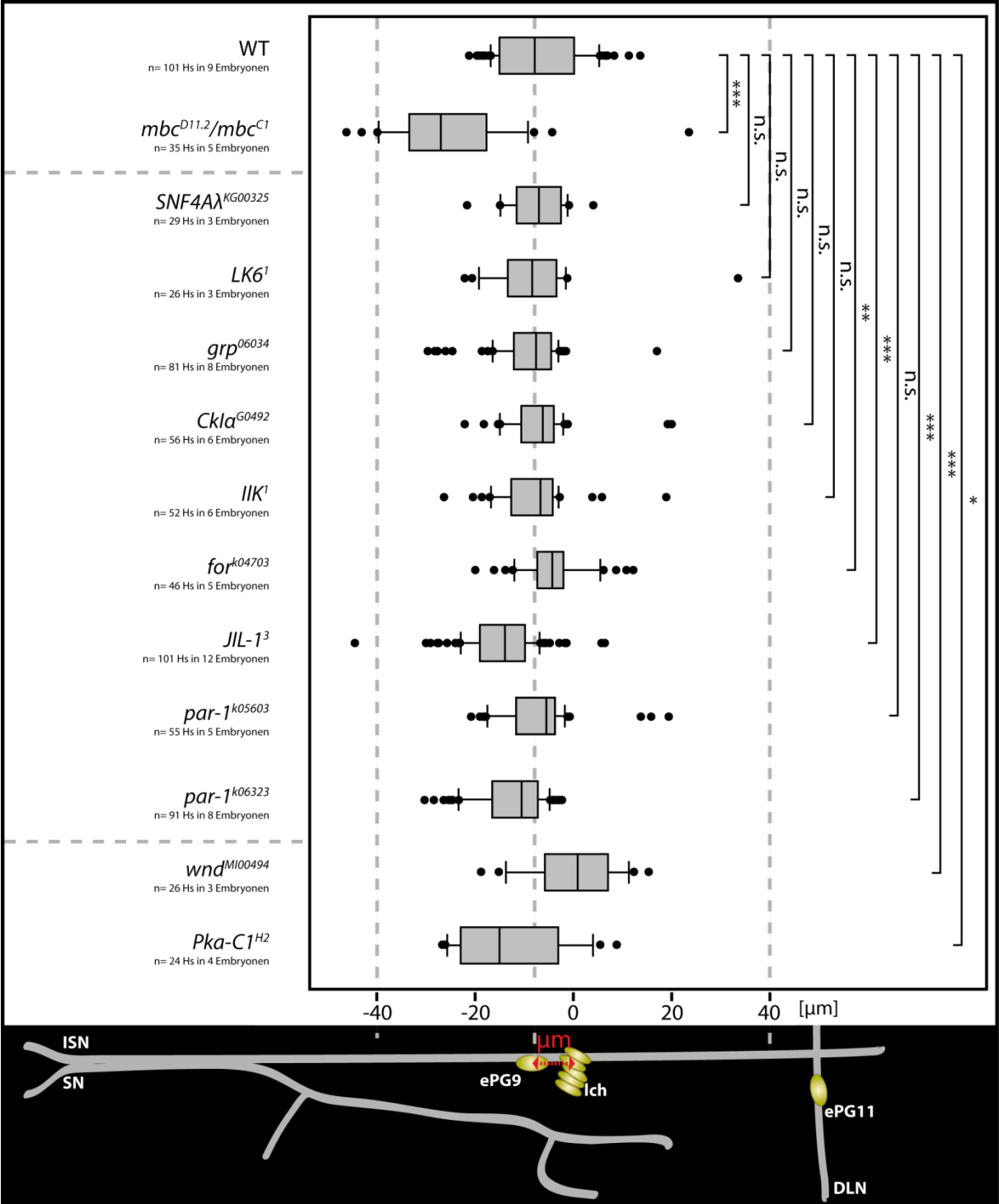


Abb. 3.18: Verschiedene Kinasen beeinflussen die Migration von ePG9 auf unterschiedliche Weise (Legende siehe nächste Seite)

**Abb. 3.18: Verschiedene Kinasen beeinflussen die Migration von ePG9 auf unterschiedliche Weise (vorherige Seite)**

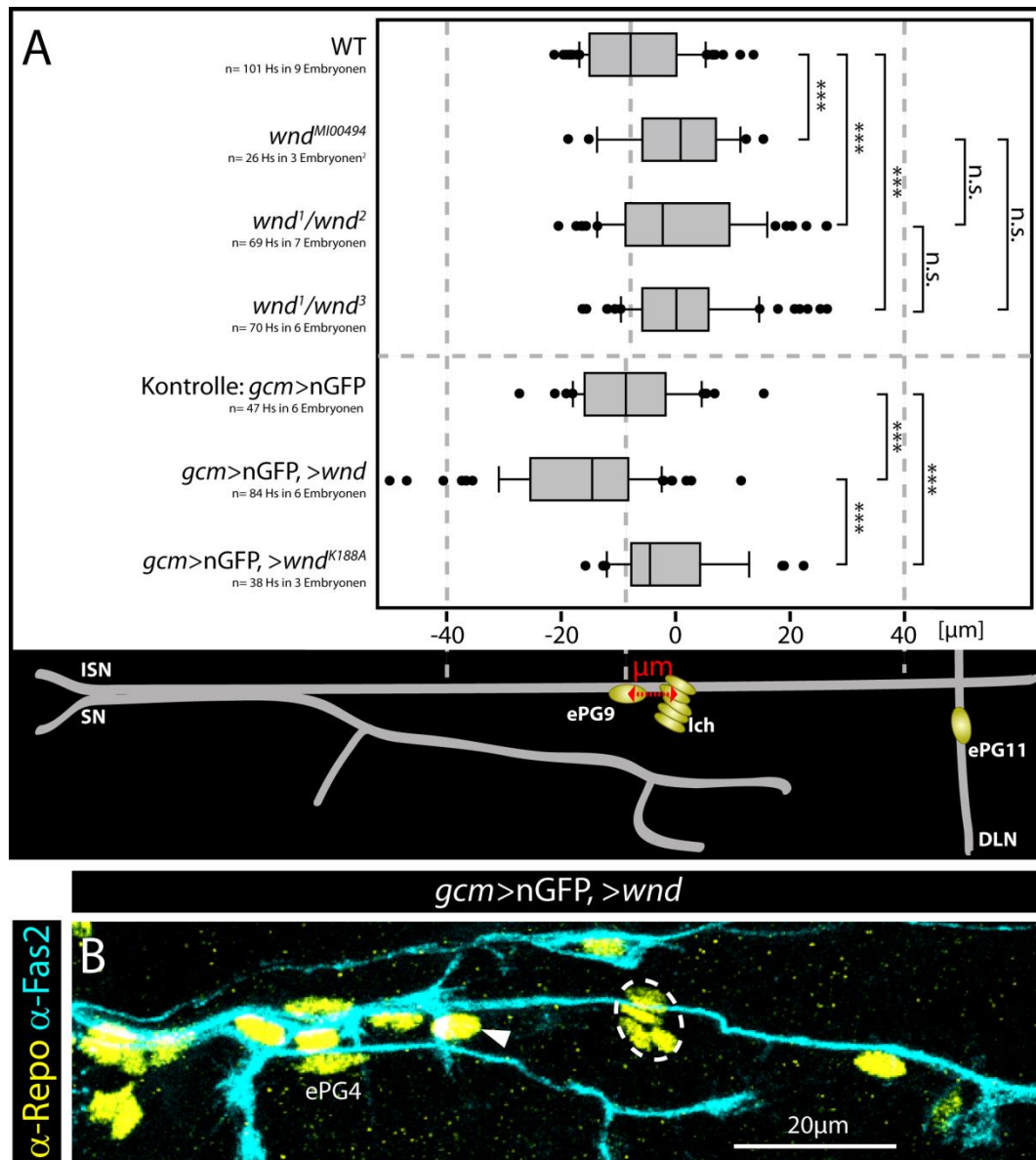
Um die Migration der ePG quantitativ zu analysieren, wurde der Abstand zwischen dem Zellkern von ePG9 und dem Ich gemessen. Die Messwerte für WT (Median = -8,02  $\mu\text{m}$ ), *mbc*<sup>D11.2/mbc</sup><sup>C1</sup> (Median = -27,1  $\mu\text{m}$ ), *SNF4/AMP-activated protein kinase gamma subunit (SNF4)*<sup>KG00325</sup> (Median = -7,17  $\mu\text{m}$ ), *LK6*<sup>1</sup> (Median = -8,54  $\mu\text{m}$ ), *grapes (grp)*<sup>06034</sup> (Median = -2,28  $\mu\text{m}$ ), *Casein kinase Ia (CkIa)*<sup>G0492</sup> (Median = -6,38  $\mu\text{m}$ ), *Integrin linked kinase (Ilk)*<sup>1</sup> (Median = -6,855  $\mu\text{m}$ ), *foraging (for)*<sup>K04703</sup> (Median = -4,05  $\mu\text{m}$ ), *JIL-1*<sup>3</sup> (Median = -14,1  $\mu\text{m}$ ), *par-1*<sup>K05603</sup> (Median = -5,66  $\mu\text{m}$ ), *par-1*<sup>K06323</sup> (Median = -10,7  $\mu\text{m}$ ), *wallenda (wnd)*<sup>M100494</sup> (Median = 0,745  $\mu\text{m}$ ) und *cAMP-dependent protein kinase 1 (Pka-C1)*<sup>H2</sup> (Median = -15,15  $\mu\text{m}$ ) sind als Boxplot dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit einem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test überprüft. \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*:  $p \leq 0,05$ ; n.s.: nicht signifikant. Die Daten im mittleren Teil der Abbildung wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Teresa Christl erhoben. Die Daten im unteren Teil der Abbildung wurden während eines F2-Praktikums von Christina Heiser erhoben.

### 3.8.3. Die Kinase *wnd* ist an der Regulation der glialen Migration beteiligt

Bei dem Allel *wnd*<sup>M100494</sup>, das für die Analyse der Kinasemutanten genutzt wurde, handelt es sich um die Insertion eines transgenen Transposons im zweiten Intron von *wnd* (Venken et al., 2011). Um zunächst zu überprüfen, ob der gefundene Migrationsphänotyp auf die Mutation im *wnd* Locus zurückgeht, wurden weitere *wnd* Allele getestet. Bei zwei der zusätzlich verwendeten Allele handelt es sich um EMS induzierte Mutationen, im Fall von *wnd*<sup>1</sup> kommt es zum Austausch einer konservierten Aminosäure in der Kinasedomäne (G173E), *wnd*<sup>2</sup> trägt eine Mutation im Stopcodon, was zu zusätzlichen 104 Aminosäuren am C-Terminus führt (Stop978N). Im dritten Allel *wnd*<sup>3</sup> ist ein Transposon spontan in den offenen Leserahmen inseriert, was zum Verlust der Funktion führt (Collins et al., 2006). Da Venken und Kollegen in ihrer Publikation bei allen drei Allelen auf letale sekundäre Mutationen hinweisen (Venken et al., 2011), wurden für die Analyse der Mutanten ausschließlich transheterozygote Embryonen benutzt. Insgesamt wurden die Allele in zwei verschiedenen Kombinationen analysiert. In beiden Fällen lässt sich ein signifikant kleinerer Abstand von ePG9 zum Ich als im WT beobachten (*wnd*<sup>1</sup>/*wnd*<sup>2</sup> Median = -2,25  $\mu\text{m}$ , n = 69 Hs; *wnd*<sup>1</sup>/*wnd*<sup>3</sup> Median = 0,1225  $\mu\text{m}$ , n = 70 Hs, Abb. 3.19). Im Vergleich untereinander und zu dem bereits getesteten Allel *wnd*<sup>M100494</sup>, ergibt sich jedoch kein signifikanter Unterschied. Somit konnte bestätigt werden, dass Wnd eine hemmende Wirkung auf die Migration der ePG hat. Um zu testen, ob Wnd zellautonom auf die Migration der ePG wirkt, wurden verschiedene UAS-Konstrukte mit der Treiberlinie *gcm*>nGFP ektopisch exprimiert. Auf der einen Seite die wildtypische Form von Wnd, was zu einer signifikanten Vergrößerung in der Distanz zwischen ePG9 und dem Ich (Median = -14,6  $\mu\text{m}$ , n = 84 Hs) im Vergleich zur Kontrolle (Median = -8,68  $\mu\text{m}$ , n = 47 Hs) führt. Im Gegensatz dazu führt die ektopische Expression einer mutierten Form von Wnd (UAS-*wnd*<sup>K188A</sup>), mit einer mutierten Kinasedomäne, zum genau gegenteiligen Effekt und ePG9 wandert wie bereits in den verschiedenen *wnd* Mutanten beobachtet näher an das Ich heran (Median = -4,48  $\mu\text{m}$ , n = 38 Hs, Abb. 3.19). Diese Ergebnisse zeigen sehr deutlich, dass



Wnd eine zellautonome Funktion während der Migration der ePG übernimmt. Eine mögliche Funktion von Wnd könnte also in der Phosphorylierung von Mbc-PB bestehen, was zur Deaktivierung führt und damit die Migration stoppt.



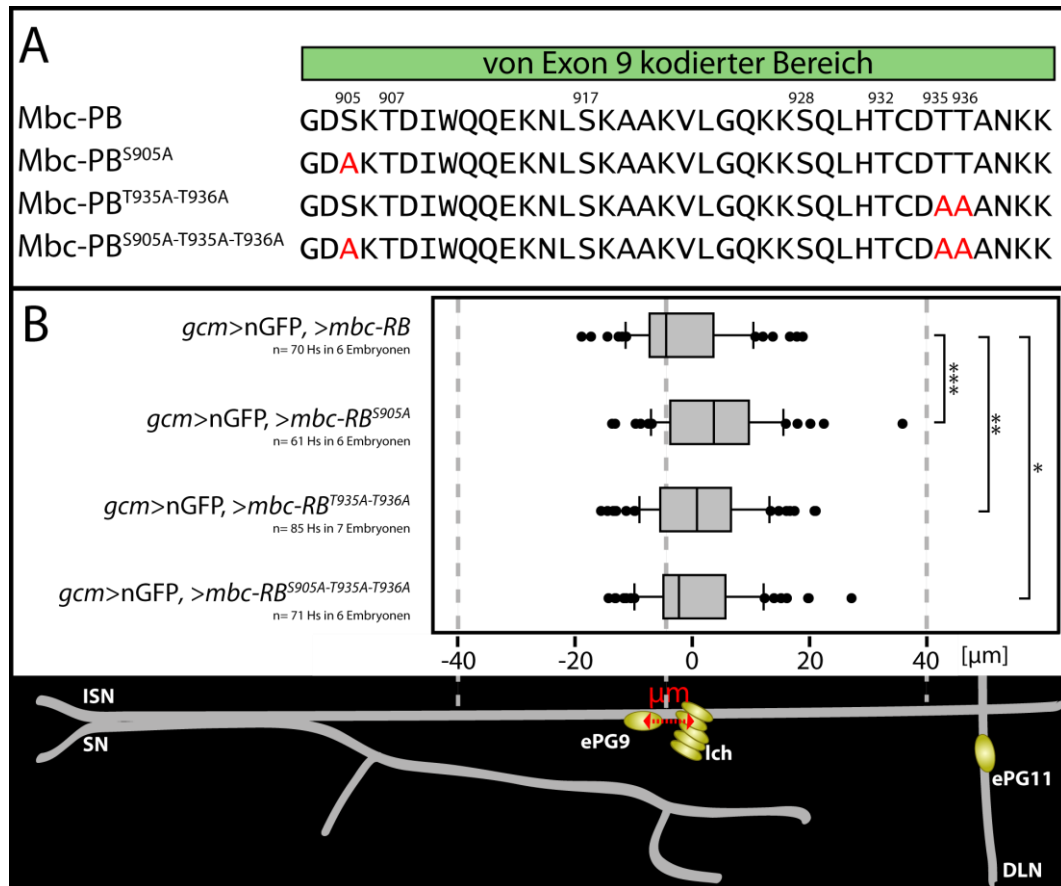
**Abb. 3.19 *wnd* ist zellautonom an der Migration der ePG beteiligt**

(A) Um die Migration der ePG quantitativ zu analysieren, wurde der Abstand zwischen dem Zellkern von ePG9 und dem lch gemessen. Die Messwerte für WT (Median = -8,02 μm), *wnd<sup>M100494</sup>* (Median = 0,745 μm), *wnd<sup>1</sup>/wnd<sup>2</sup>* (Median = -2,25 μm), *wnd<sup>1</sup>/wnd<sup>3</sup>* (Median = 0,1225 μm), *gcm>nGFP* (Median = -8,68 μm), *gcm>nGFP, >wnd* (Median = -14,6 μm) und *gcm>nGFP, >wnd<sup>K188A</sup>* (Median = -4,48 μm) sind als Boxplot dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit einem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test überprüft. \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; n.s.: nicht signifikant. (B) Abgebildet ist ein abdominales Hemisegment (Filetpräparat) eines Embryos im späten Stadium 16, der *wnd* ektopisch in Gliazellen exprimiert. Angefärbt sind die Zellkerne der ePG (gelb) und die peripheren Nerven (cyan). Markiert sind das lch (gestrichelter Kreis), ePG4 und ePG9 (Pfeilspitze). Die ePG dorsal von ePG4 liegen sehr eng zusammen, axonale Wegfindungsdefekte treten nicht auf. Anterior ist oben und ventral links.

### 3.8.4. Phosphorylierung ist für die Inaktivierung von Mbc-PB notwendig

Die potenzielle Phosphorylierung von Mbc-PB innerhalb des von Exon 9 kodierten Bereichs wurde bisher nur bioinformatisch untersucht. Daher hab ich verschiedene phosphomutante UAS-Konstrukte generiert, um die Auswirkungen der fehlenden Phosphorylierung auf die Migration der ePG experimentell zu analysieren. Die Konstrukte kodieren für Formen von Mbc-PB, bei denen einzelne phosphorylierbare Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht wurden. Die Auswahl der veränderten Aminosäuren orientierte sich dabei an den Ergebnissen der *in silico* Analyse. Der Fokus lag dabei zum einen auf den beiden benachbarten Aminosäuren T935 und T936, die von der Software *GPS* als Phosphorylierungsstelle von MAP3K (Wnd) angegeben wurden. Zum anderen wurde S905, das von zwei Programmen als wahrscheinlichste Phosphorylierungsstelle erkannt wurde, in die Analyse mit einbezogen. S928, das den höchsten Wert bei der Analyse mit dem Programm *GPS 2.1.2* erhielt, wurde nicht berücksichtigt, da das Programm zum Zeitpunkt der Projektplanung noch nicht zur Verfügung stand und keines der anderen Programme auf eine Phosphorylierung an dieser Aminosäure hindeutete. Insgesamt wurden drei verschiedene phosphomutante Konstrukte generiert (Abb. 3.20A). Zum einen UAS-*mbc-RB*<sup>S905A</sup>, mit einer Mutation die zum Austausch von S905 zu einem Alanin führt. Zum anderen UAS-*mbc-RB*<sup>T935A-T936A</sup>, mit Mutationen die zum Austausch beider Threonine durch Alanine führen. Das dritte Konstrukt UAS-*mbc-RB*<sup>S905A-T935A-T936A</sup> enthält alle drei Mutationen, was zum Austausch von allen drei phosphorylierbaren Aminosäuren gegen Alanine führt. Da in allen Fällen eine gleich starke Expression gewährleistet sein muss, wurden alle Konstrukte im gleichen Lokus (*attP2*) auf dem dritten Chromosom integriert. Um den Einfluss der Mutationen auf die Aktivität von Mbc-PB während der Migration der ePG zu analysieren, wurden die Konstrukte einzeln mit Hilfe der Treiberlinie *gcm>nGFP* in allen Gliazellen exprimiert. Zur Erinnerung, die Überexpression der wildtypischen Form von Mbc-PB führt zu einer Übermigration von ePG9 (Median = -4,445  $\mu\text{m}$ , n = 70 Hs) im Vergleich zum WT (Abb. 3.15). Durch die ektopische Expression von Mbc-PB<sup>S905A</sup>, mit einem Austausch von S905 zu Alanin, wird dieser Effekt signifikant verstärkt (Median = 3,67  $\mu\text{m}$ , n = 61 Hs). Eine ähnliche aber schwächere Reaktion zeigt ePG9 bei der ektopischen Expression von Mbc-PB<sup>T935A-T936A</sup> (Median = 0,795  $\mu\text{m}$ , n = 85 Hs) und eine schwächer aber dennoch signifikante Verstärkung der Übermigration lässt sich bei der Überexpression von Mbc-PB<sup>S905A-T935A-T936A</sup> beobachten (Median = -2,28  $\mu\text{m}$ , n = 71 Hs) (Abb. 3.20B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass alle analysierten Phosphorylierungsstellen eine Funktion bei der glialen Migration übernehmen. Die verstärkte Übermigration von ePG9 lässt vermuten, dass Mbc-PB durch die Modifikation der untersuchten Phosphorylierungsstellen inaktiviert wird. Da die Übermigration mit allen phosphomutanten Konstrukten verstärkt wird, scheint eine vollständige Phosphorylierung notwendig zu sein, um Mbc-PB zu inaktivieren. Allerdings zeichnet sich bei den einzelnen phosphomutanten Formen von Mbc-PB folgende

Tendenz ab, je mehr Aminosäuren ausgetauscht wurden, desto geringer ist die Verstärkung der Übermigration. Der Austausch der Aminosäuren scheint also die Funktion des von Exon 9 kodierten Bereichs zu stören, was vermutlich durch Veränderungen der dreidimensionalen Struktur hervorgerufen wird, was sich wiederum auf Interaktionen mit anderen Proteinen auswirken könnte.



**Abb. 3.20: Expression der phosphomutanten Konstrukte verstärkt die Übermigration von ePG9**

(A) Dargestellt ist die Aminosäuresequenz des von Exon 9 kodierten Bereichs. Alle phosphorylierbaren Aminosäuren sind anhand ihrer Position im Protein nummeriert. Die in den einzelnen UAS-Konstrukten mutierten Aminosäuren sind jeweils rot markiert. (B) Um die Migration der ePG quantitativ zu analysieren, wurde der Abstand zwischen dem Zellkern von ePG9 und dem Ich gemessen. Die Messwerte für *gcm>nGFP, >mbc-RB* (Median = -4,445 µm), *gcm>nGFP, >mbc-RB<sup>S905A</sup>* (Median = 3,67 µm), *gcm>nGFP, >mbc-RB<sup>T935A-T936A</sup>* (Median = 0,792 µm) und *gcm>nGFP, >mbc-RB<sup>S905A-T935A-T936A</sup>* (Median = -2,28 µm) sind als Boxplot dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit einem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test überprüft. \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*:  $p \leq 0,05$ .

### **3.9. Mbc-PB spielt eine Rolle bei der Migration von ePG7 und beeinflusst damit indirekt die Migration von ePG9**

Diese Arbeit beschäftigt sich bisher vor allem mit der molekularen Funktion von Mbc-PB während der Migration der ePG. Um Defekte bei der glialen Migration zu detektieren, wurde exemplarisch die Position von ePG9 ermittelt und statistisch ausgewertet (Abb. 3.3). ePG9 nimmt jedoch innerhalb der zentral generierten ePG eine besondere Rolle ein, da sie als Pionierglia die Migration der übrigen Zellen leitet. Das zeigen verschiedene Experimente, bei denen ePG9 mit Hilfe eines UV-Lasers ablatiert wurde. Zudem beeinflusst die Ablation der direkt nachfolgenden Zelle ePG7 die Migration von ePG9 (Altenhein et al., in Vorbereitung). Da in der *mbc* Mutante die Migration aller zentral generierter ePG beeinträchtigt ist (

Abb. 3.1C), stellt sich hier die Frage, ob Mbc-PB bei der Migration der gesamten Gruppe eine Rolle spielt oder lediglich bei ePG9 bzw. einer Untergruppe. Anhand der bisherigen Ergebnisse kann dazu keine Aussage getroffen werden, da für alle Experimente Gal4-Stämme benutzt wurden, die in allen ePG aktiv sind. Für die folgenden Experimente wurden deshalb verschiedene Treiberlinien genutzt, in denen jeweils nur Untergruppen der ePG Gal4 exprimieren. Mit deren Hilfe wurde zunächst sowohl die Morphologie von ePG9 und ePG7, als auch Interaktionen zwischen diesen beiden Zellen, im *mbc* mutanten Hintergrund analysiert. Durch andere Experimente wurde untersucht, welche der ePG sich bei der Migration gegenseitig beeinflussen und welche ePG Mbc-PB für die Migration benötigen.

#### **3.9.1. Die Morphologie von ePG7 und ePG9 ist in der *mbc* Mutante stark verändert**

In der *mbc* Mutante zeigen alle zentral generierten ePG Migrationsdefekte. Da ePG9 als Pionierglia die Migration der übrigen ePG leitet, besteht die Möglichkeit, dass Mbc-PB lediglich bei der Migration dieser einen Zelle benötigt wird und so indirekt die Migration der übrigen ePG beeinflusst. Um die Morphologie von ePG9 im *mbc* mutanten Hintergrund näher zu untersuchen, habe ich das Gal4/UAS-System benutzt, um membrangebundenes GFP oder RFP in dieser Zelle zu exprimieren. Da bisher kein Gal4-Stamm beschrieben wurde, in dem ePG9 exklusiv Gal4 positiv ist, wurde der Treiberstamm Mz97-Gal4 im homozygoten Zustand verwendet. Bei dieser Gal4-Linie exprimiert neben anderen ePG auch ePG9 und ePG7 Gal4. Die beiden Zellen sind einfach zu identifizieren, da ePG6 und ePG8, die zwischen ePG7 und ePG9 am ISN positioniert sind, kein Gal4 und damit kein GFP oder RFP exprimieren. Auf diese Weise können sowohl die Morphologie von ePG9, als auch Interaktionen zwischen ePG7 und ePG9 analysiert werden. Im wildtypischen Hintergrund haben ePG7 und ePG9 eine längliche spindelförmige Morphologie mit langen Zellausläufern, über die sie im

direkten Kontakt zueinander stehen (Abb. 3.21A). Im *mbc* mutanten Hintergrund dagegen ist die Morphologie der beiden Zellen sehr variabel. Teilweise ist die Verbindung zwischen ePG7 und ePG9 komplett getrennt (Abb. 3.21B). ePG9 liegt dann sehr weit dorsal und isoliert von den übrigen zentral generierten ePG. Die beiden Zellen sind in diesem Hemisegment außerdem sehr klein und bilden keine Zellausläufer. In anderen Hemisegmenten sind die beiden Zellen nur noch über sehr dünne zytoplasmatische Ausläufer miteinander verbunden (Abb. 3.21C), der Zellkontakt ist hier stark reduziert. Die Morphologie der Pionierglia weicht teilweise auch stark von der wildtypischen spindelförmigen Gestalt ab und bildet Ausläufer in anteriore und posteriore Richtung (Abb. 3.21D, Pfeilspitzen). Außerdem findet man Hemisegmente, in denen ePG7 und ePG9 über mehrere Zellausläufer miteinander Kontakt aufnehmen (Abb. 3.21E, Sterne) oder die Zellkörper sehr eng zusammen liegen (Abb. 3.21F). Zellausläufer sind in diesem Fall bei beiden Zellen nicht vorhanden. Da es sich bei der Migration der ePG um einen sehr dynamischen Prozess handelt, kann anhand der hier gezeigten Präparate, die jeweils nur einen bestimmten Zeitpunkt während der Entwicklung zeigen, nicht eindeutig bestimmt werden, wie die unterschiedlichen Phänotypen zusammenhängen. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass lediglich ePG7 Mbc-PB für die Migration benötigt und deshalb in *mbc* Mutanten Migrationsdefekte zeigt und sehr weit ventral positioniert ist. ePG9 migriert dagegen unabhängig von Mbc-PB, weshalb der Kontakt zwischen den beiden Zellen abreißt bzw. stark reduziert wird. Nach dem Verlust des Zellkontakts, scheint ePG9 ihre Polarität zu verlieren, was sich durch die Ausbildung von Zellausläufern in anteriore und posteriore Richtung zeigt. Teilweise scheint ePG9 dann in ventrale Richtung zurückzuwandern und dort erneut Kontakt mit ePG7 aufzunehmen. Ein ähnliches Verhalten konnte bei ePG9 durch die Ablation von ePG7 induziert werden (Altenhein et al., in Vorbereitung).

**Abb. 3.24: Die Morphologie von ePG7 und ePG9 im WT und in *mbc* Mutanten (nächste Seite)**

(A-F) Abgebildet ist jeweils ein Ausschnitt aus dem PNS eines abdominalen Hemisegments (Filetpräparat) von Embryonen im späten Stadium 16. Jeder Ausschnitt zeigt die Morphologie von ePG7 und der Pionierglia ePG9, die durch Expression von membrangebundenem GFP bzw. RFP visualisiert wurden. (A) *Mz97>CD8::GFP* homozygot im wildtypischen Hintergrund. ePG7 und ePG9 stehen über Zellausläufer im direkten Kontakt miteinander. (B-F) *Mz97>CD8::RFP* homozygot bzw. *MZ97>CD4::tdGFP* homozygot im *mbc* mutanten Hintergrund. Die Morphologie der beiden Zellen ist sehr variabel. (B) ePG7 und ePG9 können ihren Zellkontakt komplett verlieren. (C) Teilweise sind sie auch nur über sehr dünne Zellausläufer miteinander verbunden. (D) ePG9 verliert teilweise ihre spindelförmige Morphologie und bildet Zellausläufer in anteriore und posteriore Richtung (Pfeilspitzen). (E) Die beiden Zellen können über mehrere Zellausläufer miteinander interagieren (Sterne). (F) In manchen Fällen sind die Zellkörper von ePG7 und ePG9 sehr eng nebeneinander positioniert und die Zellen sind sehr klein und abgerundet. Anterior ist oben und ventral ist links.

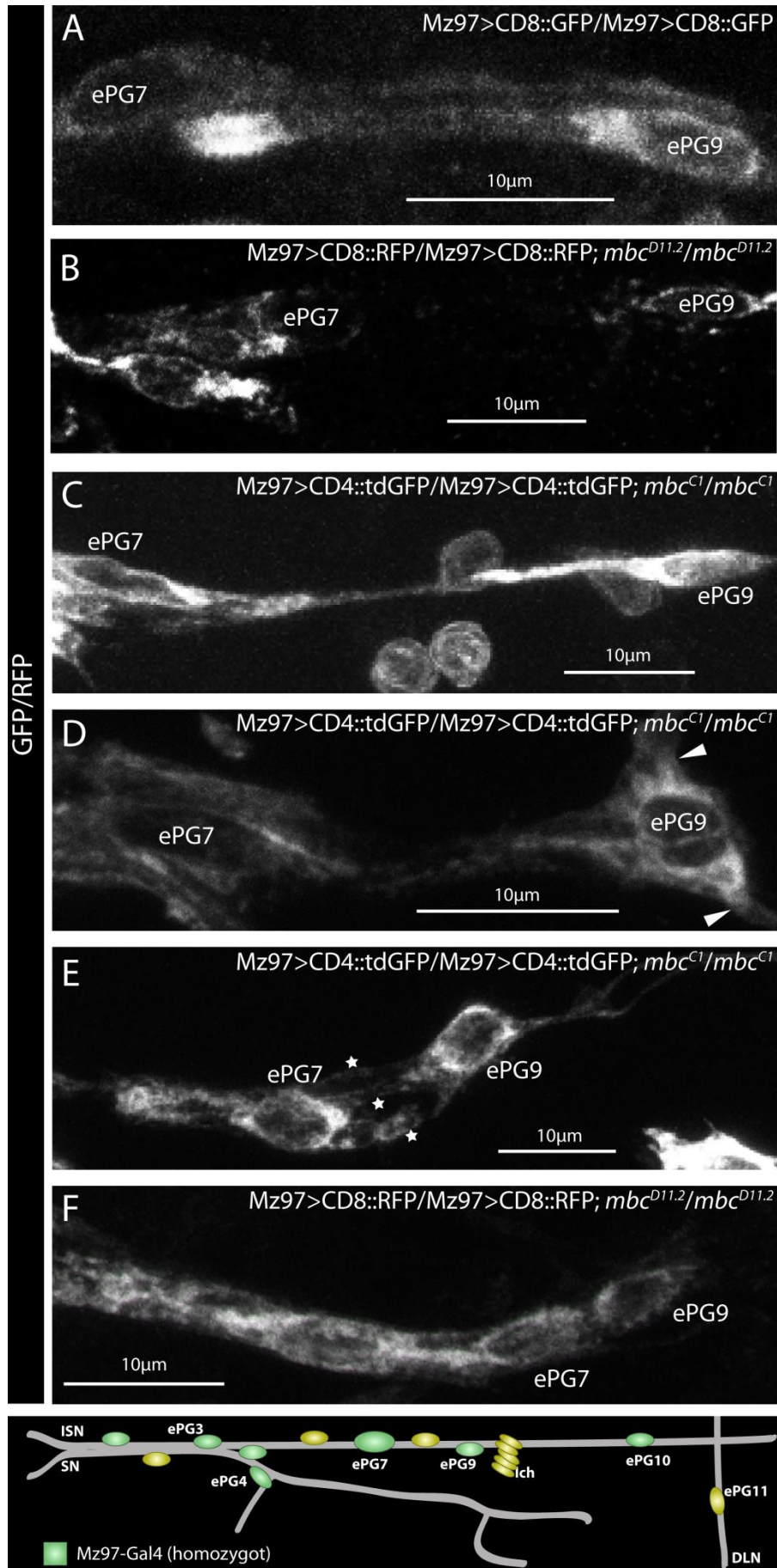
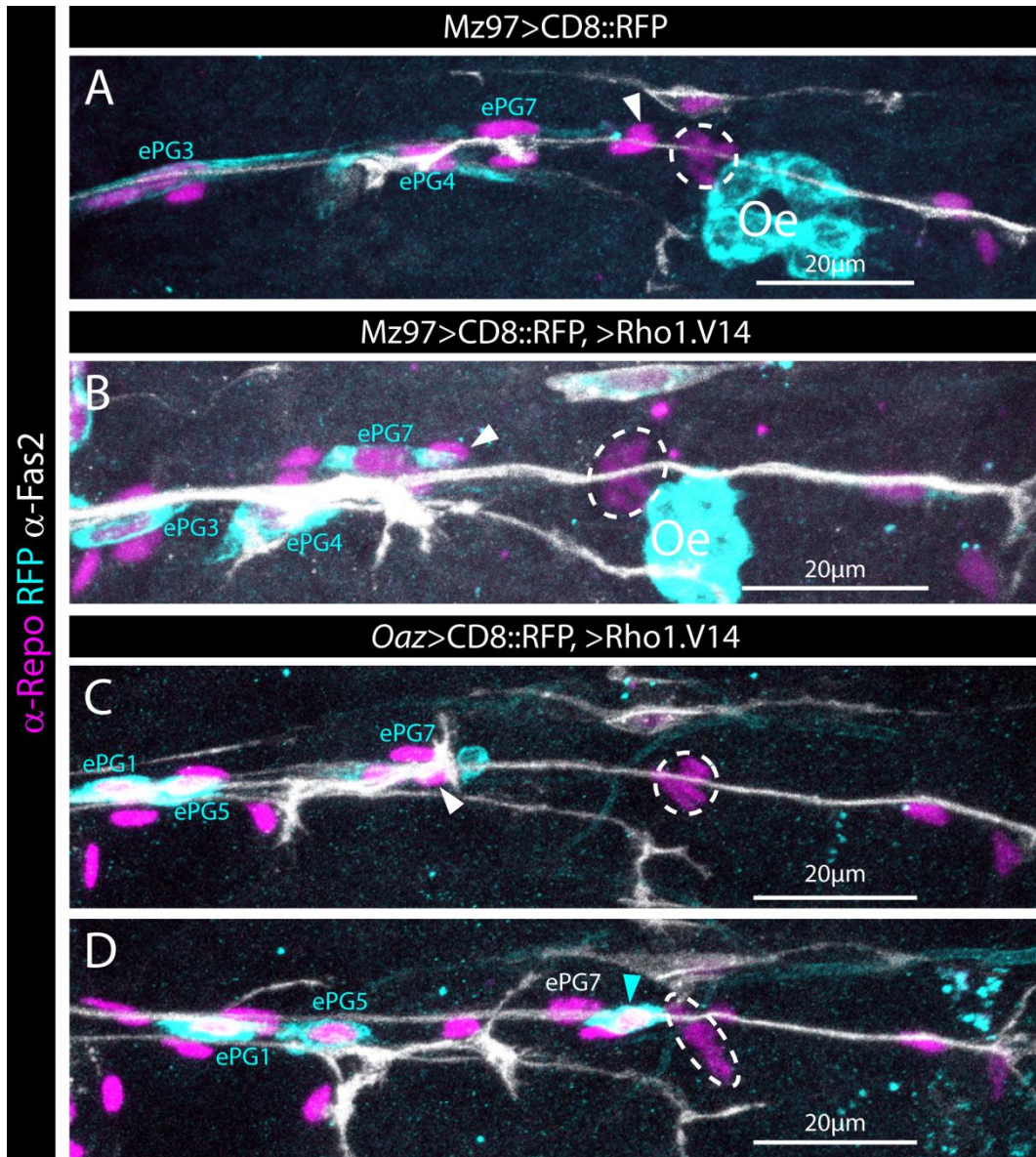


Abb. 3.21: Die Morphologie von ePG7 und ePG9 im WT und in *mbc* Mutanten (Legende siehe vorherige Seite)

### 3.9.2. ePG7 und ePG9 beeinflussen sich gegenseitig bei der Migration

Um näher zu untersuchen, ob neben der Ablation auch die fehlende Migration von ePG7 zu Migrationsdefekten von ePG9 führt, wurde gezielt die Migration dieser Zelle gehemmt. Dazu wurde mit Hilfe des Gal4/UAS-Systems eine konstitutiv aktive Form von Rho1 (UAS-Rho1.V14) exprimiert, was zur vermehrten Bildung von Aktinfilamentbündeln (*engl. stress fibers*) führt und damit die Migration von ePG7 stoppt. Zusätzlich wurde CD8::RFP exprimiert, um die Rho1.V14 positiven Zellen von den übrigen zu unterscheiden und morphologisch zu analysieren. Es wurden zwei unterschiedliche Treiberlinien verwendet: Mz97-Gal4 rekombiniert mit UAS-CD8::RFP und *O/E-associated zinc finger protein (Oaz)*-Gal4 rekombiniert mit UAS-CD8::RFP. Mz97-Gal4 wurde für diese Experimente im heterozygoten Zustand verwendet, d. h. die Zellen ePG3, ePG5, ePG7 und ePG10 sind positiv, jedoch nicht die Pionierglia ePG9 (Abb. 3.22A). Im wildtypischen Hintergrund bilden alle Zellen lange Zellausläufer und haben eine spindelförmige Morphologie. Durch die zusätzliche Expression von Rho1.V14 kommt es zu starken Veränderungen der Zellmorphologie (Abb. 3.22B). Die betroffenen ePG umhüllen nicht wie im WT die peripheren Nerven sondern liegen als sehr kurze und abgerundete Zellen zwischen den übrigen ePG. Zudem liegen alle betroffenen Zellen weiter ventral als in der Kontrolle. Zusätzlich zu den RFP positiven ePG ist die Position von ePG9 beeinträchtigt. Diese Zelle liegt sehr nah an ePG7 und nimmt im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls eine deutlich ventralere Position ein. Derselbe Effekt kann mit der zweiten Treiberlinie *Oaz*-Gal4 erzielt werden (Abb. 3.22C). Bei dieser Gal4-Linie sind ePG1 und ePG5 immer positiv und zusätzlich in einigen Hemisegmenten ePG7 und/oder ePG9. In den Hemisegmenten, in denen ePG9, aber nicht ePG7, RFP positiv ist, ergibt sich ein sehr ähnliches Bild (Abb. 3.22D). Beide Zellen sind sehr eng nebeneinander positioniert. Diese Ergebnisse bekräftigen, dass nicht nur ePG9 als Pionierglia die Migration von ePG7 steuert, sondern beide Zellen während der Migration reziprok miteinander interagieren.



**Abb. 3.22: Ektopische Expression von Rho1.V14 in ePG7 oder ePG9**

(A-F) Abgebildet ist jeweils ein abdominales Hemisegment (Filetpräparat) von Embryonen im späten Stadium 16. Anfärbt sind die Zellkerne der ePG (magenta), die peripheren Nerven (weiß), sowie die Membranen (cyan) einzelner ePG und der Oenozysten (Oe) in A und B. Markiert sind das Ich (gestrichelter Kreis), ePG9 (Pfeilspitze) und in A und B die Oe. RFP positive Zellen sind in cyan markiert. Zellen die keine RFP Expression zeigen in weiß. (A) *Mz97>CD8::RFP* (heterozygot) im wildtypischen Hintergrund. Die RFP positiven Zellen ePG3, ePG4 und ePG7 haben eine spindelförmige Morphologie und sind direkt mit den peripheren Nerven assoziiert. (B-D) Die Expression von *Rho1.V14* in einzelnen ePG verändert die Morphologie dieser Zellen. Sie sind kürzer und bilden keine Zellausläufer. (B-C) Die Expression von *Rho1.V14* in ePG7 beeinflusst indirekt auch die Migration von ePG9 (Pfeilspitze). Beide Zellen liegen viel näher zusammen als im wildtypischen Hintergrund. (D) Einen ähnlichen Effekt hat die Expression von *Rho1.V14* in ePG9 (Pfeilspitze). Auch in diesem Fall liegen ePG7 und ePG9 sehr eng zusammen.



### 3.9.3. ePG7 und ePG9 migrieren unabhängig von den übrigen ePG

Um zu untersuchen, ob außer ePG7 auch andere ePG Einfluss auf die Migration der Pionierglia ePG9 haben, wurden verschiedene Gal4-Linien in Kombination mit UAS-Rho1.V14 verwendet. Darunter erneut *Oaz>CD8::RFP*, allerdings in diesem Fall Hemisegmente, in denen lediglich ePG1 und ePG5 RFP und damit Rho1.V14 positiv sind (Abb. 3.23A). Auch hier zeigen die beiden Rho1.V14 exprimierenden Zellen die bereits bekannte morphologische Veränderung, allerdings scheint die Migration von ePG7 und ePG9 nicht beeinflusst zu werden. Beide Zellen liegen an ihrer wildtypischen Position. Das lässt vermuten, dass es während der glialen Migration zu keinen Interaktionen zwischen ePG5 und ePG9 bzw. ePG7 kommt. Als letzte Treiberlinie wurde *cas-Gal4* rekombiniert mit UAS-nGFP verwendet. Bei dieser Treiberlinie sind lediglich ePG6 und ePG8 Gal4 positiv. Wie erwartet zeigen die beiden Zellen, die durch Rho1.V14 hervorgerufenen Migrationsdefekte und liegen sehr weit ventral (Abb. 3.23B). Die Migration von ePG7 und ePG9 wird aber nicht beeinträchtigt. Insgesamt scheinen also ePG7 und ePG9 zusammen zu migrieren, wobei ePG9 als Pionierglia die Migration von ePG7 lenkt. Umgekehrt beeinflusst ePG7 aber auch die Migration von ePG9. Die übrigen ePG scheinen allerdings keinen Einfluss auf die Migration dieser beiden Zellen zu haben.

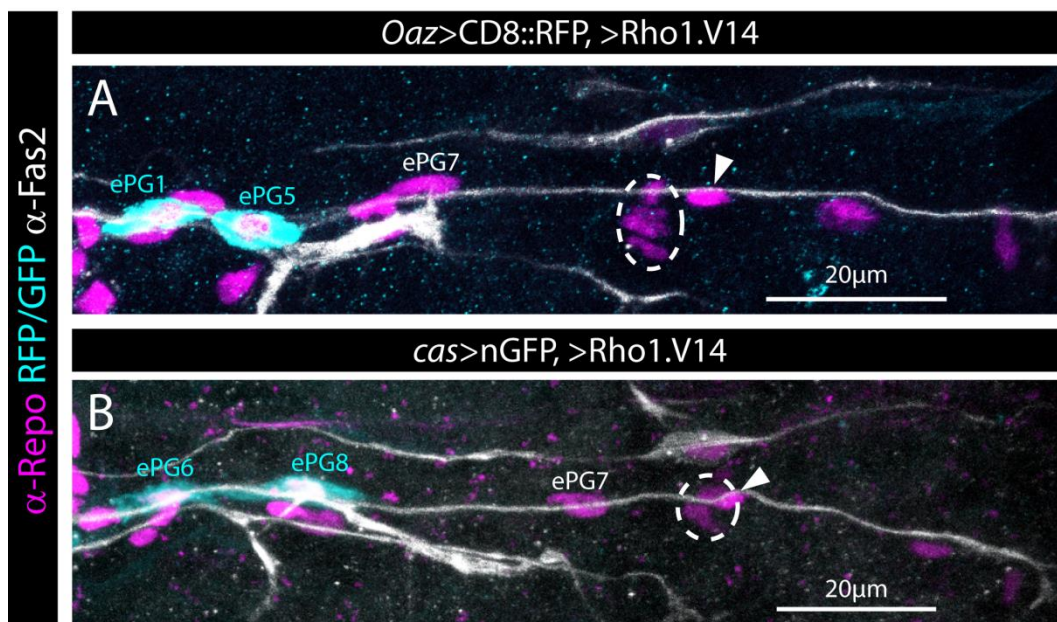


Abb. 3.23: Ektopische Expression von Rho1.V14 (Legende siehe nächste Seite)

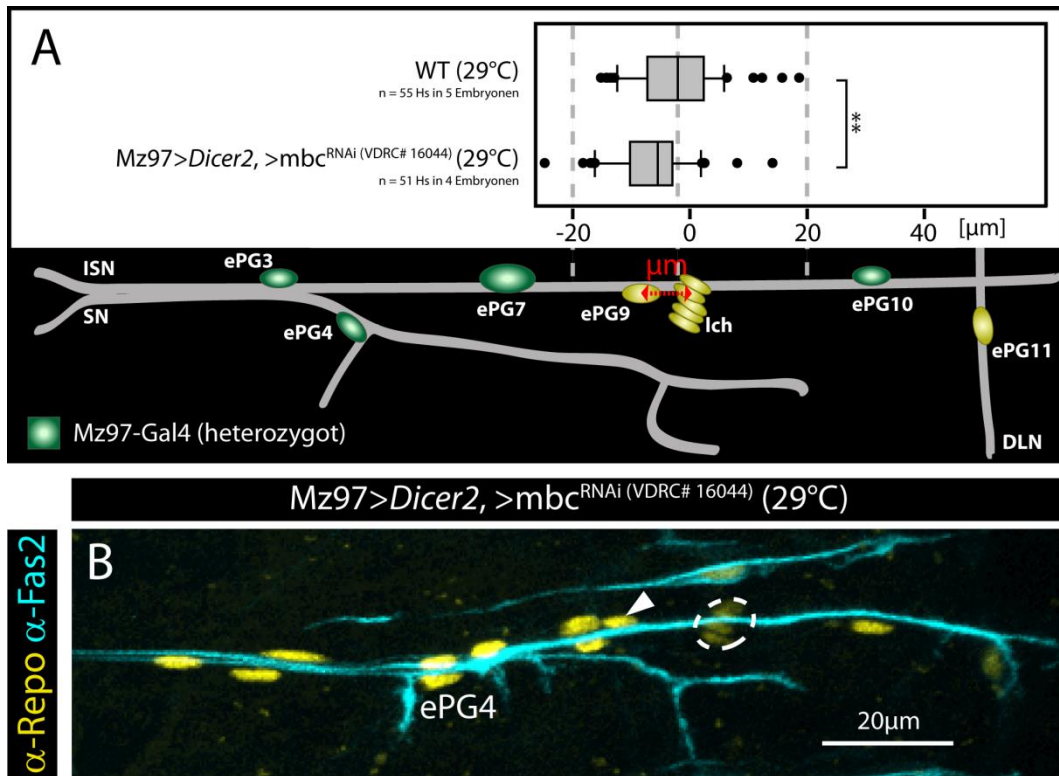
### Abb. 3.23: Ektopische Expression von Rho1.V14 (vorherige Seite)

(A-B) Abgebildet ist jeweils ein abdominales Hemisegment (Filetpräparat) von Embryonen im späten Stadium 16. Angefärbt sind die Zellkerne der ePG (magenta), die peripheren Nerven (weiß), sowie die Membranen (cyan) einzelner ePG. Markiert sind das Ich (gestrichelter Kreis) und ePG9 (Pfeilspitze). RFP bzw. GFP positive Zellen sind in cyan markiert. Zellen die keine RFP oder GFP Expression zeigen in weiß. (A) Die RFP positiven Zellen zeigen die typischen morphologischen Veränderungen, die durch die Expression von Rho1.V14 hervorgerufen werden. Die Migration von ePG7 und ePG9 wird davon nicht beeinträchtigt. Beide Zellen liegen an ihrer wildtypischen Position. (B) Durch die starke Expression von nGFP ist zusätzlich zum Zellkern das Zytoplasma von ePG6 und ePG8 angefärbt. Beide Zellen liegen deutlich weiter ventral als im WT. Die Migration von ePG7 und ePG9 ist auch hier nicht beeinträchtigt.

---

### 3.9.4. Der Verlust von Mbc in ePG7 beeinflusst die Migration von ePG9

Ob Mbc bei der Migration von ePG7 eine Rolle spielt und damit die Migration von ePG9 nur indirekt beeinflusst, wurde durch ein *knock-down* Experiment mit Mz97-Gal4 näher untersucht. Wie bereits erwähnt, exprimieren bei dieser Treiberlinie unterschiedlich viele ePG Gal4, je nachdem ob Mz97-Gal4 hetero- oder homozygot vorliegt (von Hilchen et al., 2008). Für das *knock down* Experiment wurde Mz97-Gal4 heterozygot in Kombination mit einem *mbc*-spezifisches RNAi-Konstrukt verwendet, d. h. in ePG3, ePG4, ePG7 und ePG10 wird *mbc* herunter reguliert, jedoch nicht in der Pionierglia ePG9 (Abb. 3.24A). Auch diese Experimente wurden, wie die übrigen *knock down* Experimente, zur Verstärkung des Gal4/UAS-Systems bei 29 °C durchgeführt. In den analysierten Hemisegmenten liegt die Pionierglia ePG9 im Vergleich zum WT bei 29 °C (Median = -2,19 µm, n = 55 Hs) signifikant weiter vom Ich entfernt (Median = -5,345 µm, n = 28 Hs) (Abb. 3.24A). Das bedeutet, der Verlust von Mbc in ePG7 beeinflusst indirekt die Migration der Pionierglia ePG9. Genau wie bei den übrigen *knock-down* Experimenten, mit den in allen ePG aktiven Gal4-Treibern, liegen in diesem Fall die ePG dorsal von ePG4 enger zusammen (vgl. Abb. 3.24B und Abb. 3.6B). Dieses Experiment zeigt somit eindeutig, das Mbc die Migration von ePG9 indirekt über ePG7 beeinflusst.



**Abb. 3.24: Der Verlust von *mbc* in ePG7 beeinflusst die Migration von ePG9**

(A) Um die Migration der ePG quantitativ zu analysieren, wurde der Abstand zwischen dem Zellkern von ePG9 und dem Ich gemessen. Die Messwerte für WT (29 °C) (Median = -2,19 μm) und *Mz97>Dicer2, >mbc<sup>RNAi</sup> (VDR# 16044)* (29 °C) (Median = -5,49 μm), sind als Boxplot dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit einem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test überprüft. \*\*:  $p \leq 0,01$ . (B) Abgebildet ist ein abdominales Hemisegment (Filetpräparat) von einem Embryo mit dem Genotyp *Mz97>Dicer2, >mbc<sup>RNAi</sup> (VDR# 16044)* (29 °C) im späten Stadium 16. Anfärbt sind die Zellkerne der ePG (gelb) und die peripheren Nerven (cyan). Markiert sind ePG4, das Ich (gestrichelter Kreis) und ePG9 (Pfeilspitze). ePG4 nimmt ihre charakteristische Position am SN ein. Die ePG dorsal von ePG4 liegen sehr eng zusammen. Anterior ist oben und ventral links.

### 3.9.5. Die Expression von *Mbc*-PB in ePG7 rettet die Migration von ePG9 in *mbc* mutantern Hintergrund

Um zu untersuchen, ob die Expression von *Mbc* in ePG7 tatsächlich ausreichend für die vollständige Migration von ePG9 ist oder die Migration beider Zellen von *Mbc* abhängig ist, wurden Rettungsexperimente mit der Treiberlinie *Mz97-Gal4* durchgeführt. Da diese Experimente, wie alle Rettungsexperimente im transheterozygoten *mbc* mutanten Hintergrund (*mbc<sup>D11.2</sup>/mbc<sup>C1</sup>*) durchgeführt wurden, verfügen in den analysierten Hemisegmenten lediglich ePG3, ePG4, ePG7 und ePG10 über eine einzelne Isoform von *Mbc*. Um die Morphologie von ePG7 analysieren zu können, wurde zusätzlich *UAS-CD4::tdGFP* exprimiert. Ähnlich wie bei *repo4.3>CD4::tdGFP*, führt auch die Expression von *UAS-CD4::tdGFP* mit *Mz97-Gal4* zu einer signifikanten Übermigration von ePG9 (Median = -3,32 μm,  $n = 38$  Hs, Abb. 3.25B) im Vergleich zum WT (Median = -8,02 μm,  $n = 101$  Hs) (Abb. 3.25A). Beim Ret-

tungsexperiment mit Mbc-PA liegt ePG9 zwar signifikant näher am Ich (Median = -15,95  $\mu\text{m}$ , n = 94 Hs) als in der *mbc* Mutante (Median = -27.1  $\mu\text{m}$ , n = 35 Hs), zeigt allerdings auch einen signifikanten Unterschied zu Mz97>CD4::tdGFP. Diese vermeintliche Rettung des Migrationsdefekts geht vermutlich auf die Expression von CD4::tdGFP zurück. Ein ähnlicher Effekt trat auch beim Rettungsexperiment mit repo4.3>CD4::tdGFP und UAS-*mbc-RA* auf (Abb. 3.14). Ein Vergleich der Rettungsexperimente mit UAS-*mbc-RA* und UAS-*mbc-RB* untereinander zeigt, dass die Expression von Mbc-PB die Distanz zwischen ePG9 und dem Ich viel stärker reduziert (Median = -6,36  $\mu\text{m}$ , n = 64 Hs) (Abb. 3.25A). Allerdings kommt es auch bei diesem Experiment zu keiner vollständigen Rettung des Migrationsphänotyps bzw. zu keiner Übermigration von ePG9, wie bei dem Rettungsexperiment mit *gcm*>nGFP und UAS-*mbc-RB*. Vermutlich lassen sich diese Unterschiede auf die unterschiedlich starke Gal4 Expression der beiden Treiberlinien und damit verbunden die unterschiedlich starke Konzentration von Mbc-PB in den ePG zurückführen. Dafür spricht auch, dass die ektopische Expression von Mbc-PB mit Mz97-Gal4 im wildtypischen Hintergrund zu keiner Übermigration von ePG9 führt (Anhang 12).

Bei den Rettungsexperimenten konnte durch die Expression von CD4::tdGFP zusätzlich die Morphologie von ePG7 analysiert werden. Im wildtypischen Hintergrund erstrecken sich die zytoplasmatischen Ausläufer dieser Zelle in beide Richtungen entlang des ISN (Abb. 3.25B). Beim Rettungsexperiment mit Mbc-PA dagegen streckt ePG7 lediglich dünne Zellausläufer in dorsale Richtung (Abb. 3.25C). Zudem ist die Zelle kürzer als im wildtypischen Hintergrund. Durch die Expression von Mbc-PB werden zum einen wieder zytoplasmatische Ausläufer in beide Richtungen gebildet, zum anderen ist die Länge von ePG7 mit dem wildtypischen Hintergrund vergleichbar (Abb. 3.25D). Diese Experimente bestätigen somit die Ergebnisse des *knock-down* Experiments, das mit der Treiberlinie Mz97-Gal4 durchgeführt wurde. Mbc-PB spielt eine zentrale Rolle bei der Migration von ePG7, die Wanderung von ePG9 wird dagegen indirekt von ePG7 beeinflusst. Wie bereits bei den Rettungsexperimenten mit *gcm*>nGFP und repo4.3>CD4::tdGFP gezeigt, kann die Funktion von Mbc nur durch Isoform B übernommen werden.

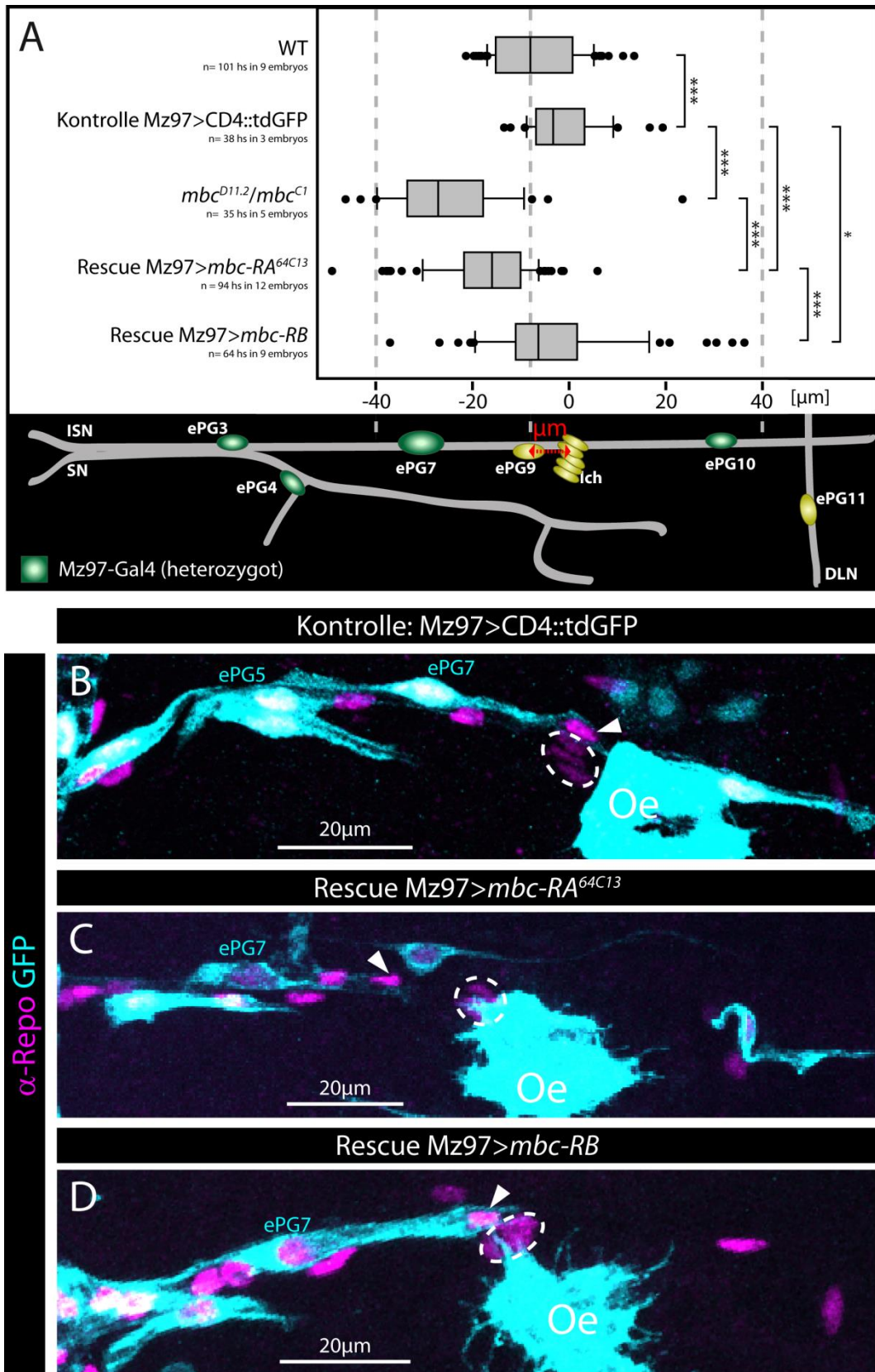


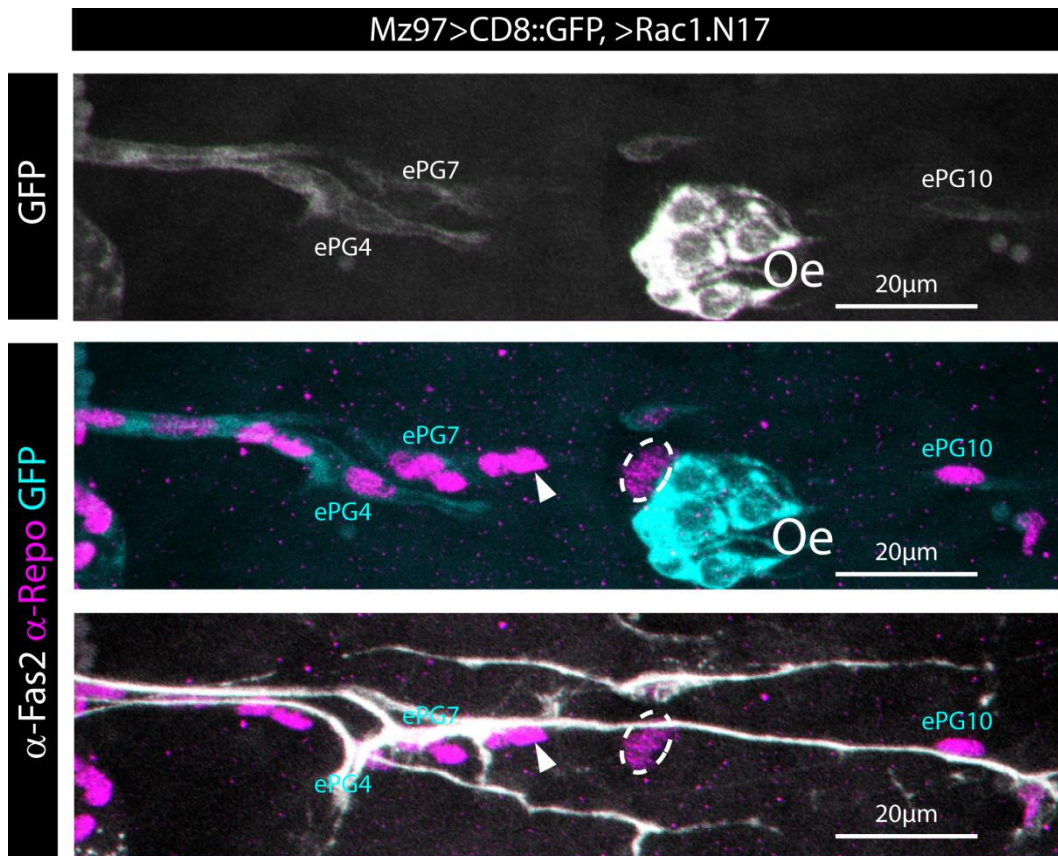
Abb. 3.25: Expression von Mbc-PB in ePG7 im *mbc* Mutanten Hintergrund rettet die Migration von ePG9 (Legende siehe nächste Seite)

**Abb. 3.26: Expression von Mbc-PB in ePG7 im *mbc* Mutanten Hintergrund rettet die Migration von ePG9 (vorherige Seite)**

(A) Um die Migration der ePG quantitativ zu analysieren, wurde der Abstand zwischen dem Zellkern von ePG9 und dem Ich gemessen. Die Messwerte für WT (Median = -8,02  $\mu\text{m}$ ), Kontrolle Mz97 (hetero)>CD4::tdGFP (Median = -3,32  $\mu\text{m}$ ), *mbc*<sup>D11.2</sup>/*mbc*<sup>C1</sup> (Median = -27,1  $\mu\text{m}$ ), Rescue Mz97>*mbcRA*<sup>64C13</sup> (Median = -15,95  $\mu\text{m}$ ) und Rescue Mz97> *mbcRB* (Median = -6,36  $\mu\text{m}$ ) sind als Boxplot dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit einem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test überprüft. \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ . (B-D) Abgebildet ist jeweils ein abdominales Hemisegment (Filetpräparat) von Embryonen im späten Stadium 16. Angefärbt sind die Zellkerne (magenta) aller, sowie die Membranen (cyan) der Mz97 positiven ePG. Markiert sind das Ich (gestrichelter Kreis), ePG9 (Pfeilspitze) und die Oenozyten (Oe). Bei allen Bildern ist anterior oben und ventral links. (B) Mz97>CD4::tdGFP. Die ePG nehmen ihre wildtypische Position entlang der peripheren Nerven ein. Zellausläufer von ePG7 erstrecken sich von ePG5 bis ePG9. (C) Rescue Mz97>*mbcRA*<sup>64C13</sup>. ePG9 liegt in einer weiter ventralen Position, ePG7 bildet dünne Zellausläufer in dorsale Richtung bis zum Zellkörper von ePG9. (D) Rescue Mz97>*mbcRB*. ePG9 ist etwa auf Höhe des Ich positioniert. ePG7 bildet verstärkt Zellausläufer in dorsale Richtung bis zum Zellkörper von ePG9.

### **3.9.6. Unterbrechung des Mbc-PB Signalwegs beeinflusst die Migration von ePG7 und ePG9**

Wie bisher gezeigt werden konnte, übernimmt Mbc-PB bei der Migration von ePG7 eine zell-autonome Funktion und beeinflusst indirekt auch die Migration von ePG9. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass durch die ektopische Expression einer dominant negativen Form von Rac1 (Rac1.N17) in allen Gliazellen die Migration von ePG9 gestört wird. Um herauszufinden, ob dieser Effekt, ähnlich wie bei den glialen *knock-down* Experimenten auf die Interaktion zwischen ePG7 und ePG9 zurückzuführen ist, wurde Rac1.N17 mit Hilfe von Mz97-Gal4 exprimiert. Zusätzlich exprimiertes zytoplasmatisches GFP machte es zudem möglich die Morphologie von ePG7 zu analysieren. Für dieses Experiment wurde die Treiberlinie Mz97-Gal4 im heterozygoten Zustand verwendet, was bedeutet, ePG7 exprimiert Rac1.N17, ePG9 jedoch nicht. ePG7 kann anhand der GFP Expression identifiziert werden (Abb. 3.27). Die Zelle liegt weiter ventral als im WT (vgl. Abb. 3.2A), was auf eine zellautonome Funktion von Rac1 während der Migration hindeutet. Die ebenfalls GFP positive Zelle ePG4 liegt dagegen an ihrer wildtypischen Position, scheint also unabhängig von Rac1 zu migrieren. Zusätzlich zu ePG7 liegt auch ePG9 sehr weit ventral von Ich, was zeigt, dass Rac1 die Migration von ePG9 nur indirekt über ePG7 beeinflusst.



**Abb. 3.27: Ektopische Expression von Rac1.N17 in ePG7 beeinflusst die Migration von ePG9**

Abgebildet ist ein abdominales Hemisegment (Filetpräparat) aus einem Embryo im späten Stadium 16. Im oberen Bild ist lediglich die GFP Expression (weiß) der Mz97 positiven ePG und der Oenocyten (OE) gezeigt. Im mittleren Bild ist GFP in cyan gezeigt. Zusätzlich sind die Zellkerne der ePG dargestellt (magenta). Das untere Bild zeigt neben den Zellkernen der ePG, die peripheren Nerven (weiß). ePG9 (Pfeilspitze) liegt deutlich weiter vom Ich (gestrichelter Kreis) entfernt als im WT, ePG4 dagegen liegt an ihrer wildtypischen Position.

### 3.10. *In silico* Analyse verschiedener zu *mbc* orthologer Gene

Wie bisher gezeigt werden konnte bestehen zwischen den beiden Isoformen von Mbc funktionelle Unterschiede. Da die längere Isoform *mbc-RB* (RefSeq ID: NM\_001260338) erst im Januar 2013 annotiert und bislang kaum mit dieser Variante gearbeitet wurde, beschäftige ich mich im zweiten Teil meiner Arbeit mit zu *mbc* orthologen Genen. Dabei gehe ich der Frage nach, ob die für *D. melanogaster* beschriebenen Isoformen auch in anderen Spezies auftreten. Da mittlerweile die genomischen Sequenzen vieler verschiedener Spezies entschlüsselt wurden und viele dieser Daten frei zugänglich sind, wurde der Großteil dieser Untersuchungen *in silico*, also bioinformatisch, durchgeführt. Eine komplette Liste mit allen verwendeten Sequenzen, sowie deren Quellen befindet sich im Anhang (Anhang 9). Mit Hilfe dieser Ergebnisse konnte anschließend in dem Bereich von Mbc, in dem sich die beiden Isoformen unterscheiden, evolutionär konservierte Aminosäuren identifiziert werden die vermutlich entscheidend für die funktionellen Unterschiede sind.

#### 3.10.1. Alternatives Spleißen von *mbc* orthologen Genen in Drosophiliden

Innerhalb der Drosophiliden wurde bisher lediglich für *mbc* in *D. melanogaster* und das orthologe Gen *GA10288* in *Drosophila pseudoobscura* verschiedene Isoformen annotiert. Beide Arten gehören zur Subgattung *Sophophora* (Abb. 3.28A). Die beiden Gene zeigen zum einen eine sehr ähnliche Exon-Intron Struktur und zum anderen liegen die alternativ gespleißten Exons an derselben Position innerhalb der Gene (Abb. 3.28C und E). In den übrigen sequenzierten *Drosophila* Spezies wurden bis jetzt nur die kürzeren Isoformen beschrieben. Um zu untersuchen, ob es auch hier zu alternativem Spleißen kommt, wurden die orthologen Gene unterschiedlicher Vertreter dieser Gruppe untersucht (Abb. 3.28A, grau unterlegt). Zunächst lässt sich bei allen Arten eine fast identische Exon-Intron Struktur beobachten, wobei die Größe der Introns und die Anzahl der Exons im 3' Bereich leicht variieren. Mit Hilfe der Software *InterProScan 4* konnten außerdem anhand der kodierten Proteinsequenzen in allen analysierten Genen die für Mbc annotierten Domänen identifiziert werden (Abb. 3.28B-G). Die Region, in der bei *mbc* das alternative Spleißen auftritt (Intron 8 von *mbc-RA*, in Abb. 3.28B gelb hinterlegt), zeigt innerhalb der untersuchten Arten der Melanogaster Gruppe eine hohe Konservierung im Vergleich zu *D. melanogaster* (94,35 % in *D. sechellia*\GM26532 (Abb. 3.28B) und 89,81 % in *D. erecta*\GG11230 (Abb. 3.28D)). Außerhalb dieser Gruppe ist diese Region wesentlich schwächer konserviert (41,22 % in *D. pseudoobscura*\GA10288 (Abb. 3.28E), 48,26 % in *D. virilis*\GJ22588 (Abb. 3.28F) und 41,69 % in *D. grimshawi*\GH23629 (Abb. 3.28G)). Ein Vergleich dieser Region zwischen *mbc* und den orthologen Genen der anderen Arten zeigt mehrere hoch konservierte Bereiche (Abb. 3.29A). Das alternativ gespleißte Exon von *mbc* (Exon 9) liegt genau innerhalb eines dieser Bereiche (Abb.



3.29A, grün hinterlegt). Ein Alignment zeigt, dass die Nukleotidsequenzen der orthologen Gene in diesem Bereich zu 85,96 % identisch sind (Abb. 3.29B), was auf eine konservierte Funktion hindeutet. Ein Vergleich der kodierten Aminosäuren zeigt zudem, dass die meisten Unterschiede in der Nukleotidsequenz nicht zu einem Aminosäureaustausch führen würden (Abb. 3.29B). Diese Daten legen nahe, dass alternatives Spleißen wie es bereits für *mbc* in *D. melanogaster* und *GA10288* in *D. pseudoobscura* beschrieben wurde auch in den übrigen untersuchten *Drosophila* Spezies auftritt. Um diese Vermutung experimentell zu stützen, wurde eine PCR mit embryonaler cDNA von *D. virilis* durchgeführt. Diese Art gehört anders als *D. melanogaster* und *D. pseudoobscura* zur Subgattung *Drosophila* und ist damit evolutiv relativ weit von diesen beiden Arten entfernt. Bei diesem Experiment wurde die Region von *GJ22588*, in der das alternative Spleißen potenziell auftritt, mit Hilfe eines flankierenden Primerpaars amplifiziert. Als Ergebnis dieses Experiments traten, ähnlich wie bei *mbc*, zwei PCR-Produkte mit einer Größe von  $\approx 130$  bp und  $\approx 250$  bp auf (Abb. 3.28H). Durch Sequenzierung konnte das kleinere Fragment der bereits annotierten Isoform *GJ22588-RA* zugeordnet werden. Die Sequenz des größeren Fragments enthält zusätzlich 114 bp zwischen Exon 8 und Exon 10, die sich eindeutig dem hoch konservierten Bereich in der alternativ gespleißten Region zuordnen lassen (siehe Anhang 4). Dieses Ergebnis untermauert die Vermutung, dass das für *mbc* beschriebene alternative Spleißen in allen Drosophiliden auftritt. Die übrigen konservierten Bereiche von Intron 8 könnten an der Regulation des alternativen Spleißens beteiligt sein, z. B. als Bindestellen für Spleißfaktoren.

**Abb. 3.28: *mbc* orthologe Gene in Drosophiliden (nächste Seite)**

(A) Stammbaum aller sequenzierten Spezies der Schwestergruppen *Drosophila* und *Sophophora*, alle näher untersuchten Spezies sind grau unterlegt (Quelle: flybase.org, verändert). (B-G) Exon-Intron Struktur von zu *mbc* orthologen Genen in verschiedenen Drosophiliden. Die Region in der alternatives Spleißen auftritt (Intron 8) ist in allen Fällen gelb hervorgehoben. Die Zahlen geben an, zu wieviel Prozent die Sequenzen im gelb markierten Bereich identisch sind. Das alternativ gespleißte Exon ist grün markiert. Außerdem sind Bereiche, die für Domänen kodieren (SH3 in magenta, DHR1 in orange und DHR2 in blau) markiert. Isoformen die bisher nicht experimentell nachgewiesen werden konnten sind mit dem Zusatz „potenziell“ beschriftet. (B) *Drosophila sechellia*\GM26532. (C) *Drosophila melanogaster*\mbc. (D) *Drosophila erecta*\GG11230. (E) *Drosophila pseudoobscura*\GA10288. (F) *Drosophila virilis*\GJ22588. (G) *Drosophila grimshawi*\GH23629. (H) Sowohl bei *D. melanogaster*\mbc als auch bei *D. virilis*\GJ22588 lassen sich mit Hilfe von Primern, die die alternativ gespleißte Region flankieren, aus embryonaler cDNA zwei PCR-Produkte mit einer Größe von  $\approx 130$  bp und  $\approx 250$  bp amplifizieren.

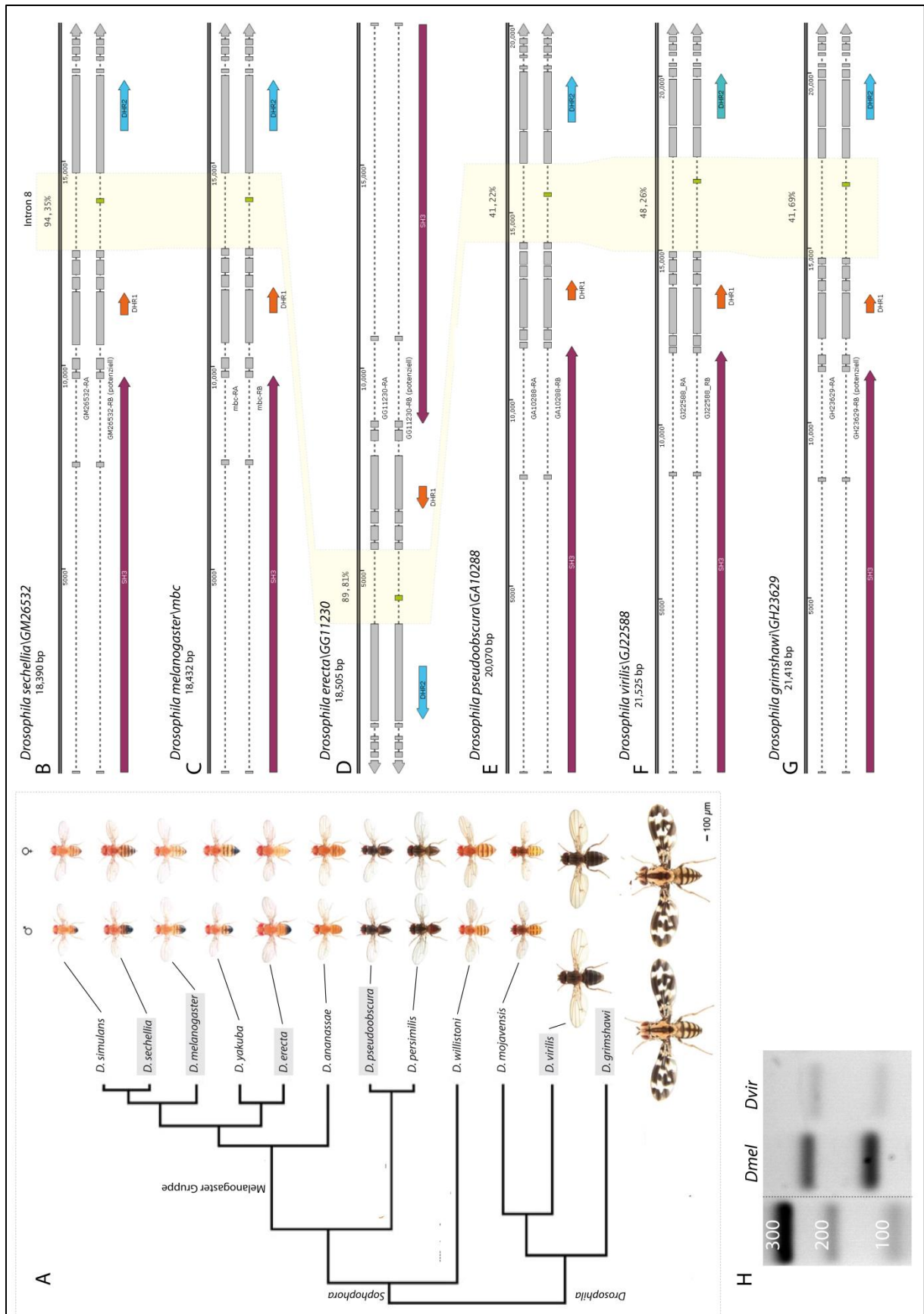
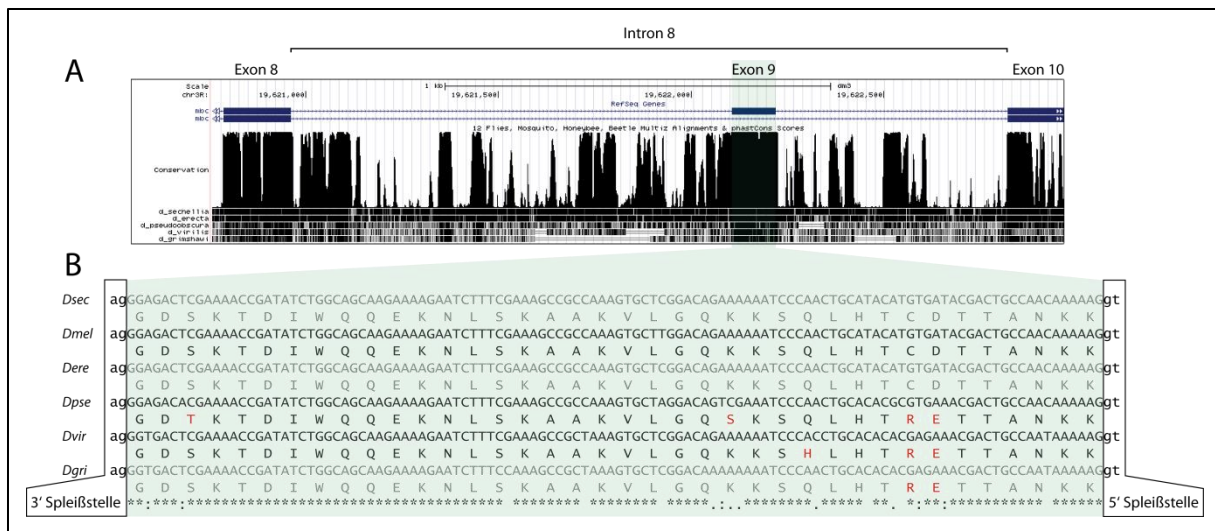


Abb. 3.28: *mbc* orthologe Gene in Drosophiliden (Legende siehe vorherige Seite)



**Abb. 3.29: Konservierte Bereiche in *mbc-RA/Intron 8***

(A) Dargestellt ist *mbc-RA/Intron 8* und die beiden angrenzenden Exons. In schwarz sind Bereiche dargestellt, die in *D. sechellia*, *D. erecta*, *D. pseudoobscura*, *D. virilis* und *D. grimshawi* konserviert sind (Quelle: The UCSC Genome Browser). Insgesamt gibt es innerhalb von *mbc-RA/Intron 8* mehrere konservierte Bereiche, einer davon umfasst *mbc-RB/Exon 9* (grün hinterlegt). (B) Alignment des konservierten Bereichs aus allen analysierten Drosophiliden. *mbc-RB/Exon 9* ist in den anderen Spezies inklusive der 3' und 5' Spleißstelle fast vollständig konserviert. Zusätzlich zur Nukleotidsequenz ist die kodierte Aminosäuresequenz angegeben. Aminosäureaustausche im Vergleich zu *Dmel* sind rot markiert. Graue Sequenzen wurden bisher nicht als Teil eines Transkripts beschrieben.

### 3.10.2. Alternatives Spleißen von *mbc* orthologen Genen in Dipteren

Um zu überprüfen ob alternatives Spleißen von *mbc* Orthologen auch in anderen Dipteren auftritt, wurden zunächst verschiedene Vertreter dieser Gruppe untersucht. Bei einer der untersuchten Arten handelt es sich um *Prodiamesa olivacea*, eine zu den *Chironomiden* (Zuckmücken) gehörende Art. Die hier verwendeten Daten wurden von Sarah Brunck im Rahmen ihrer Promotion am Institut für Molekulargenetik (Johannes Gutenberg-Universität Mainz) erhoben. Die Analyse des larvalen Transkriptoms zeigt, dass auch bei dieser Art zwei verschiedene Isoformen vom *mbc* orthologen Gen *mbc-like* exprimiert werden. Die Exon-Intron Struktur der beiden Gene ist relativ ähnlich, allerdings liegt der alternativ gespleißte Bereich in *P. olivacea* in *mbc-like-RA/Intron 7* (Abb. 3.30A und B). Das alternativ gespleißte Exon (*mbc-like-RB/Exon 8*) hat die gleiche Länge wie *mbc-RB/Exon 9* (114 nt) und nimmt im Transkript die gleiche Position zwischen den Bereichen, die für die DHR1- und die DHR2-Domäne kodieren, ein. Die Sequenzen der beiden alternativ gespleißten Exons sind zu 64,91 % identisch und von den 38 kodierten Aminosäuren stimmen 25 mit Mbc-PB überein (Abb. 3.30C).

Außerdem wurde das zu *mbc* orthologe Gen *AGAP004320* aus der Malaria mücke *Anopheles gambiae* bioinformatisch analysiert. Sequenzvergleiche zeigen, dass die für *AGAP004320*

annotierte Isoform *mbc-RA* entspricht, d. h. keine mit *mbc-RB/Exon 9* vergleichbare Sequenz enthält. Um herauszufinden, ob auch bei dieser Spezies zwei Isoformen gebildet werden können, sollte zunächst die Region, in der das alternative Spleißen potenziell auftritt, eingegrenzt werden. Da die Exon-Intron Struktur von *AGAP004320* keine erkennbaren Gemeinsamkeiten zu *mbc* zeigt (Abb. 3.30D), wurden zunächst anhand der kodierten Aminosäuresequenz die drei für Mbc annotierten Domänen identifiziert. In *mbc* liegt die Region in der alternatives Spleißen auftritt zwischen den Bereichen, die für die DHR1- und die DHR2 Domäne kodieren (Abb. 3.30A), daher wurde bei *AGAP004320* ebenfalls in diesem Bereich nach einer zu *mbc-RB/Exon 9* homologen Sequenz gesucht. Das einzige Intron in dieser Region, das groß genug ist, um das zusätzliche Exon zu enthalten, ist Intron 3. Innerhalb von Intron 3 konnte durch Sequenzvergleiche mit *mbc-RB/Exon 9* ein potenzielles Exon mit der gleichen Länge (114 nt) gefunden werden (Abb. 3.30E). Die Sequenzen sind zu 69,3 % identisch und die kodierte Aminosäuresequenz zeigt große Übereinstimmung mit Mbc-PB (Abb. 3.30I).

Zusätzlich wurde das Gen *CPIJ002759* aus *Culex quinquefasciatus*, einer weiteren Stechmücke, bioinformatisch untersucht. Bei der Analyse fiel zunächst auf, dass im annotierten Transkript kein Bereich enthalten ist, der für eine SH3-Domäne kodiert (Abb. 3.30F). Durch Sequenzvergleiche mit dem orthologen Gen *AGAP004320* aus *Anopheles gambiae* wurde im 5' Bereich des annotierten Startcodons ein offener Leserahmen gefunden, der für eine SH3-Domäne kodiert. Bei der Annotation von *CPIJ002759* wurde also vermutlich ein internes ATG als Startcodon verwendet, was zu einer Verkürzung des Transkripts führt (die Sequenz der SH3-Domäne ist in Anhang 13 gezeigt). Sequenzvergleiche zeigen, dass die annotierte Isoform von *CPIJ002759* eher *mbc-RB* ähnelt, d. h. eine mit *mbc-RB/Exon 9* vergleichbare Sequenz enthält. Bei dieser Sequenz handelt es sich um *CPIJ002759-RA/Exon 5* (Abb. 3.30F). Ein Vergleich der Aminosäuresequenz die von den benachbarten Exons kodiert wird (Exon 8 und Exon 10 bei Mbc bzw. Exon 4 und Exon 7 bei *CPIJ002759*) zeigt, dass die kodierten Aminosäuren der beiden Exons an homologen Stellen innerhalb des Proteins liegen (Abb. 3.30G). Allerdings muss in einem Transkript immer *CPIJ002759-RA/Exon 5* zusammen mit *CPIJ002759-RA/Exon 6* vorkommen, da es sonst zu einer Leserasterverschiebung kommt. Die annotierte Isoform verfügt in diesem Bereich somit über 17 zusätzliche Aminosäuren im Vergleich zu Mbc-PB. Vergleicht man die Nukleotidsequenz von *mbc-RB/Exon 9* mit *CPIJ002759-RA/Exon 5* fällt auf, dass die ersten 114 nt zum Teil übereinstimmen (Sequenzidentität: 67,54 %). Auf Ebene der kodierten Aminosäuren wird die Ähnlichkeit in diesem Bereich noch deutlicher (Abb. 3.30H). Da die an *mbc-RB/Exon 9* angrenzende 5' Spleißstelle auch in *CPIJ002759-RA/Exon 5* vorhanden ist (Abb. 3.30H), ist es durchaus möglich, dass es auch bei *CPIJ002759* eine *mbc-RB* entsprechende Isoform gebildet werden kann. Potenziell könnte auch eine *mbc-RA* entsprechende Isoform exprimiert werden, indem

Exon 5 und Exon 6 komplett aus dem Transkript heraus gespleißt werden. Im Gegensatz dazu ist die an *CPIJ002759/Exon 5* angrenzende 5' Spleißstelle weder bei *mbc* (Abb. 3.30G), noch bei einer der übrigen analysierten Spezies vorhanden. Ob es sich bei der annotierte Isoform um eine nicht sehr weit verbreitete Isoform handelt (z. B. spezifisch für die Gattung *Culex*), oder in diesem Fall ein Fehler bei der Annotation aufgetreten ist, muss in weiteren Studien untersucht werden.

**Abb. 3.30: *mbc* orthologe Gene in Dipteren (nächste Seite)**

(A, B, D und F) Exon-Intron Struktur von *mbc* und orthologen Genen aus verschiedenen Dipteren. Der Bereich, in dem alternatives Spleißen auftritt ist in allen Fällen gelb hervorgehoben. Das alternativ gespleißte Exon ist grün markiert. Außerdem sind Bereiche, die für Domänen kodieren markiert (SH3 in magenta, DHR1 in orange und DHR2 in blau). Isoformen die bisher nicht experimentell nachgewiesen wurden sind mit dem Zusatz „potenziell“ beschriftet. (A) *D. melanogaster\mbc*. (B) *Prodiamesa olivacea\mbc-like*. (D) *Anopheles gambiae\AGAP004320*. (F) *Culex quinquefasciatus\CPIJ002759*. (C und E) Sequenzvergleich zwischen dem alternativ gespleißten Bereich von *mbc* und den orthologen Genen von *P. olivacea* bzw. *A. gambiae*. Zusätzlich zur Sequenz der alternativ gespleißten Exons sind die Spleißstellen und die kodierte Aminosäuresequenzen angegeben. Die Zahlen geben an, zu wieviel Prozent der angegebenen Nukleotidsequenzen identisch sind. (G) Vergleich der Aminosäuresequenzen von Mbc und CPIJ002759. Dargestellt ist der Bereich von Mbc, in dem sich die beiden Isoformen unterscheiden und der homologe Bereich von CPIJ002759. Während der Unterschied der beiden Isoformen bei Mbc 38 Aminosäuren (As) beträgt (kodierte von Exon 9), befinden sich bei CPIJ002759 an der entsprechenden Stelle 55 As die von zwei Exons (Exon 5 und Exon 6) kodiert werden. (H) Sequenzvergleich zwischen *mbc/Exon 9* und *CPIJ002759/Exon 5*. Innerhalb der ersten 114 Nukleotide zeigen die beiden Sequenzen eine große Homologie. Zudem ist die 5' Spleißstellen von *mbc/Exon 9* innerhalb von *CPIJ002759/Exon 5* enthalten (GT). Zusätzlich zur Nukleotidsequenz ist die kodierte Aminosäuresequenz angegeben. (I) Vergleich der Aminosäuresequenz zwischen dem alternativ gespleißten Bereichen von Mbc und den orthologen Proteinen der übrigen Dipteren. Für die gesamte Abbildung gilt: in Sequenzen der orthologen Proteine sind Aminosäuren, die nicht mit der Aminosäuresequenz des alternativ gespleißten Bereichs von Mbc übereinstimmen rot markiert. Sequenzen, die bisher nicht als Teil eines Transkripts oder Proteins beschrieben wurden sind dagegen grau gefärbt.

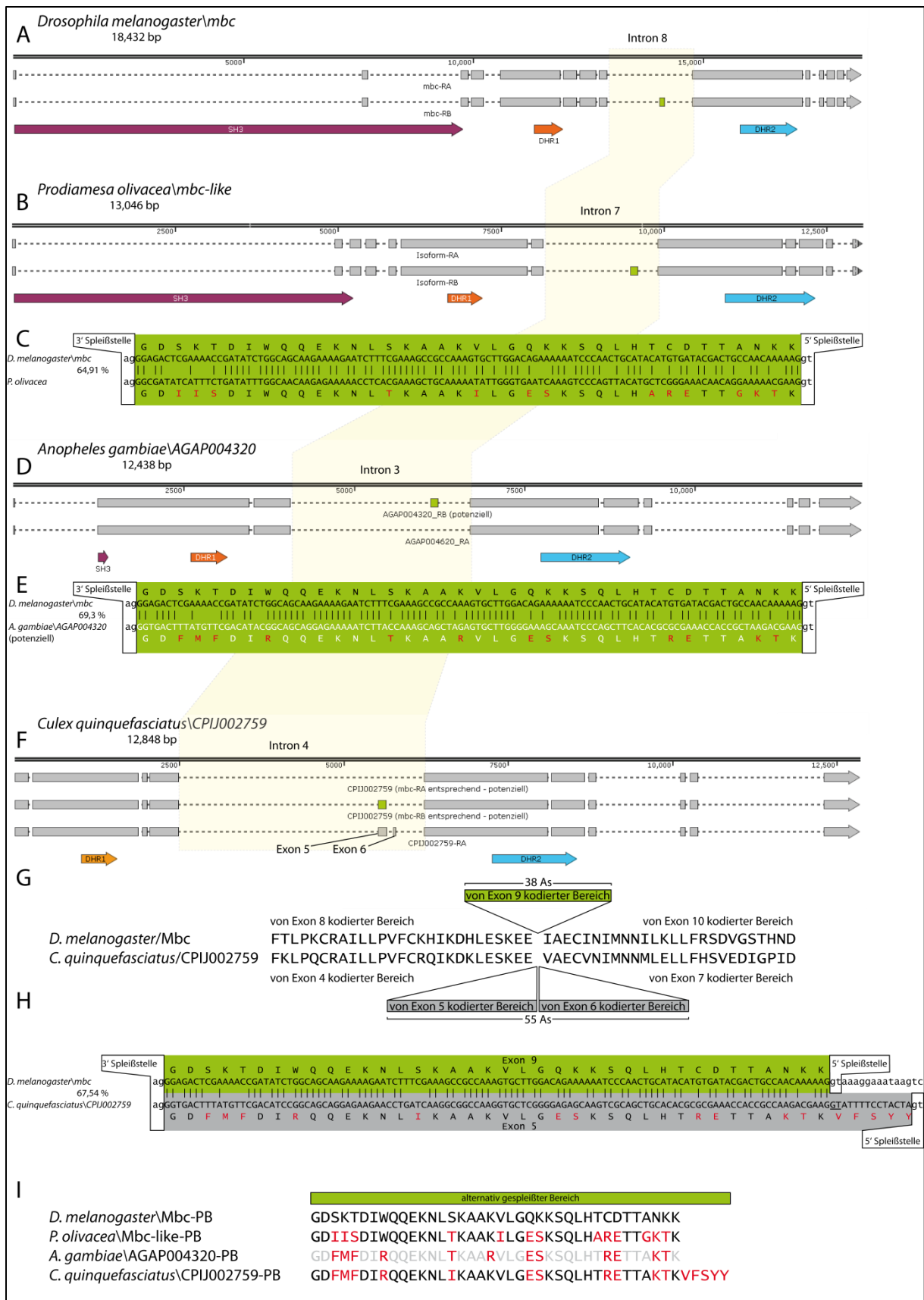


Abb. 3.30: *mbc* orthologe Gene in Dipteren (Legende siehe vorherige Seite)

### 3.10.3. Die für *mbc* annotierten Isoformen sind Arthropoden spezifisch

Um herauszufinden, ob die in Dipteren auftretenden Spleißvarianten von *mbc* generell im gesamten Tierreich zu finden sind, wurden zunächst die orthologen Gene in weiteren Insekten analysiert. Da die hier verwendeten Arten evolutionär schon sehr weit von *D. melanogaster* entfernt sind, kann man in diesen Fällen die DNA-Sequenzen der Exons nicht direkt vergleichen. Aus diesem Grund wurden die kodierten Aminosäuresequenzen für Vergleiche mit Mbc benutzt (Abb. 3.31A).

Zum einen wurde das Gen *TC12454* des rotbraunen Reismehlkäfers (*Tribolium castaneum*) untersucht. Bei dieser Art wurden bisher vier unterschiedliche Isoformen annotiert, die sich untereinander höchstens in zwei Exons unterscheiden (Abb. 3.31B). Bei zwei der Isoformen (*TC12454-RA* und *TC12454-RB*), liegt das alternativ gespleißte Exon (*TC12454-RB/Exon 10*) zwischen den Bereichen, die für die DHR1- und die DHR2-Domäne kodieren. Ein Vergleich zwischen der kodierten Aminosäuresequenz *mbc-RB/Exon 9* und *TC12454-RB/Exon 10* zeigt einige konservierte Aminosäuren (Abb. 3.31H). Den beiden übrigen Isoformen (*TC12454-RC* und *TC12454-RD*) fehlt *TC12454-RB/Exon 10*. Die alternativ gespleißten Exons liegen bei diesen Isoformen hinter dem Bereich, der für die DHR2-Domäne kodiert. Alternatives Spleißen in diesem Bereich ist bisher in keiner anderen der analysierten Spezies beschrieben worden.

Für das Gen *LOC100168224* aus der Erbsenlaus (*Acyrtosiphon pisum*) sind ebenfalls drei Isoformen beschrieben, die sich alle im 3' Bereich unterscheiden (Abb. 3.31C). Zusätzlich enthält *LOC100168224-RB* im zentralen Bereich des Transkripts ein alternativ gespleißtes Exon (*LOC100168224-RB/Exon 17*). Die von diesem Exon kodierte Aminosäuresequenz zeigt wiederum Homologien zum alternativ gespleißten Bereich von Mbc (Abb. 3.31H).

Des Weiteren wurde das Gen *PHUM252200* der Menschenlaus (*Pediculus humanus*) bioinformatisch analysiert, für das bisher nur die Isoform *PHUM252200-RA* beschrieben wurde (Abb. 3.31D). Die Analyse der kodierten Aminosäuresequenz zeigt, dass die annotierte Isoform Mbc-PA entspricht (siehe Anhang 10). Innerhalb von *PHUM252200-RA/Intron 14* konnte ein potenzielles alternatives Exon identifiziert werden, dessen kodierte Aminosäuresequenz Homologien zu dem von *mbc-RB/Exon 9* kodierten Bereich zeigt (Abb. 3.31E).

Außerhalb der Klasse der Insekten wurde der Gemeine Wasserfloh (*Daphnia pulex*) analysiert. Diese Spezies gehört zu den Crustaceen und ist damit evolutionär sehr weit von *D. melanogaster* entfernt. Beide Arten gehören aber zum Stamm der Gliederfüßer (*Arthropoda*). Für das zu *mbc* orthologe Gen *ARP2\_G366* von *D. pulex* wurde bis jetzt lediglich eine Isoform annotiert (Abb. 3.31F). Durch die Analyse der kodierten Aminosäuresequenz kann

diese Isoform *mbc-RB* zugeordnet werden (siehe Anhang 10) und wird deshalb im Folgenden als *ARP2\_G366-RB* bezeichnet. Vergleicht man die kodierten Aminosäuresequenzen der beiden orthologen Gene zeigt sich, dass der von *mbc-RB/Exon 9* kodierte Bereich homolog zum kodierten Bereich von *ARP2\_G366-RB/Exon 6* ist (Abb. 3.31H). Da Daphnien als Lebendfutter in der Aquaristik genutzt werden, sind diese Tier sehr einfach über den Fachhandel zu beziehen. Allerdings ist meistens nicht bekannt um welche Spezies es sich dabei handelt. Dennoch wurden Tiere dieser Gattung genutzt, um experimentell zu untersuchen, ob es zu alternativem Spleißen bei dem *mbc* orthologen Gen kommt. Dazu wurde die potenziell alternativ gespleißte Region mittels PCR aus Daphnien cDNA amplifiziert. Um die verwendeten Primer zu designen wurde die Sequenz von *ARP2\_G366-RB* aus *D. pulex* genutzt. Als Ergebnis traten zwei PCR-Produkte auf (Abb. 3.31G), deren Sequenzierung einige Unterschiede zu *ARP2\_G366-RB* ergaben (siehe Anhang 8). Daher handelt es sich bei den verwendeten Tieren vermutlich nicht um *D. pulex*. Dennoch ist die kodierte Aminosäuresequenz zwischen *ARP2\_G366-RB* und den Sequenzen der PCR-Produkte fast vollständig identisch, was dafür spricht, dass es sich bei den verwendeten Daphnien um eine nah verwandte Art von *D. pulex* handelt. Daher ist sehr wahrscheinlich, dass auch bei *D. pulex* zwei Isoformen gebildet werden.

**Abb. 3.31: *mbc* orthologe Gene in Arthropoden (nächste Seite)**

(A-D und F) Exon-Intron Struktur von *mbc* und orthologen Genen aus verschiedenen Arthropoden. Der Bereich, in dem alternatives Spleißen auftritt ist in allen Fällen gelb hervorgehoben. Das alternativ gespleißte Exon ist grün markiert. Außerdem sind Bereiche, die für Domänen kodieren markiert (SH3 in magenta, DHR1 in orange und DHR2 in blau). Isoformen die bisher nicht experimentell nachgewiesen wurden sind mit dem Zusatz „potenziell“ beschriftet. (A) *D. melanogaster\mbc*. (B) *Tribolium castaneum\TC12454*. (C) *Acyrtosiphon pisum\LOC100168224 dedicator of cytokinesis protein 1-like*. (D) *Pediculus humanus\PHUM252200*. (F) *Daphnia pulex\ARP2\_G366*. (E) Sequenzvergleich zwischen dem alternativ gespleißten Exon von *mbc* und dem homologen Bereich von *PHUM252200*. Zusätzlich zur Sequenz der potenziell alternativ gespleißten Exons sind die Spleißstellen und die kodierten Aminosäuresequenzen angegeben. Die beiden Nukleotidsequenzen sind zu 41,1 % identisch. (G) Mit Hilfe von Primern, die in Exon 5 und Exon 7 binden, lassen sich aus Daphnien cDNA zwei PCR-Produkte mit einer Größe von  $\approx 130$  bp und  $\approx 250$  bp amplifizieren. Durch Sequenzierung konnten die beiden Banden jeweils einer Isoform (mit und ohne Exon 6) zugeordnet werden, die kodierte Aminosäuresequenz der größeren Bande ist in H angegeben. (H) Vergleich der Aminosäuresequenz zwischen den alternativ gespleißten Bereichen von Mbc und den orthologen Proteinen der übrigen Arthropoden. Aminosäuren, die in allen untersuchten Spezies konserviert sind, sind grün markiert. Für die gesamte Abbildung gilt: in Sequenzen der orthologen Proteine sind Aminosäuren, die nicht mit der Aminosäuresequenz des alternativ gespleißten Bereichs von Mbc übereinstimmen rot markiert. Sequenzen, die bisher nicht als Teil eines Transkripts oder Proteins beschrieben wurden, sind dagegen grau gefärbt.



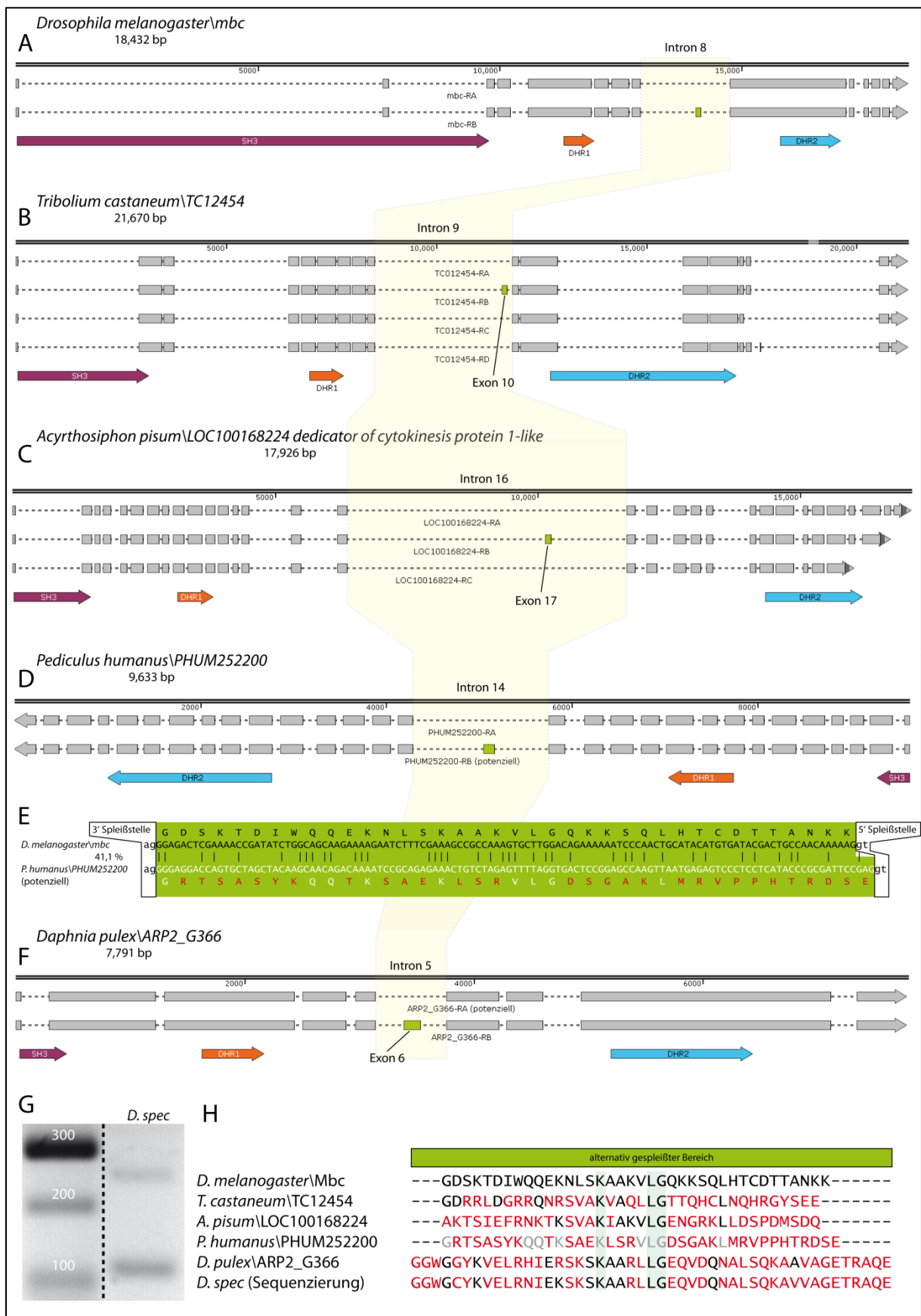


Abb. 3.31: *mbc* orthologe Gene in Arthropoden (Legende siehe vorherige Seite)

Des Weiteren wurde *mbc* orthologe Gene aus zwei Spezies untersucht, die nicht zu den Arthropoden gehören. Zum einen *ced-5* aus dem, zu den Nematoden gehörenden Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*. Zum anderen wurden die drei paraloge Gene *DOCK1*, *DOCK2* und *DOCK5* des Menschen (*Homo sapiens*) als Vertreter der Chordaten analysiert. Sowohl für *ced-5* als auch für *DOCK1* wurde bisher jeweils nur eine einzelne Isoform annotiert (Abb. 3.32B und C), die sich in beiden Fällen, anhand der kodierten Aminosäuresequenz, Mbc-PA zuordnen lässt (siehe Anhang 10). Bei *DOCK2* und *DOCK5* treten dagegen mehrere Isoformen auf. Zum einen kürzere Transkripte, deren kodierende Sequenzen nicht alle Domänen umfassen (Abb. 3.32D und E). Zum anderen bei *DOCK5* zwei Isoformen die sich lediglich im letzte Exon unterscheiden. Auch bei diesen beiden Genen konnten die Isoformen, die die kodierende Sequenz für alle drei Domänen enthalten, anhand der Aminosäuresequenzen, Mbc-PA zugeordnet werden (Anhang 10). Um zu untersuchen, ob bei diesen Genen eine *mbc-RB* entsprechende Isoform auftreten kann, sollte zunächst der Bereich, in dem das alternative Spleißen potenziell auftreten könnte eingegrenzt werden. Dazu wurden die Aminosäuresequenzen der Mbc-PA entsprechenden orthologen Proteine miteinander verglichen und speziell die Region analysiert in der sich beide Isoformen unterscheiden (Abb. 3.32F). Die Analyse zeigt, dass Aminosäuren speziell in dem von Exon 8 kodierten Bereich in allen untersuchten Spezies konserviert sind (Abb. 3.32F, grau hinterlegt). Ausgehend von diesen konservierten Aminosäuren lässt sich klar erkennen, dass die Grenze zwischen dem von Exon 8 und dem von Exon 10 kodierten Bereich, also genau die Stelle in der sich die beiden Isoformen unterscheiden, innerhalb der Arthropoden konserviert ist. Außerhalb dieser Gruppe wird diese Stelle jedoch bei allen analysierten Proteinen von einem durchgängigen Exon kodiert. Damit kann von den *mbc* orthologen Genen aus *C. elegans* und *H. sapiens* keine *mbc-RB* entsprechende Isoform gebildet werden.

**Abb. 3.31: *mbc* orthologe Gene in Nematoden und Vertebraten (nächste Seite)**

(A-E) Exon-Intron Struktur von *mbc* und orthologen Genen aus *Caenorhabditis elegans* und *Homo sapiens*. Das alternativ gespleißte Exon von *mbc* ist grün markiert. Außerdem sind Bereiche, die für Domänen kodieren markiert (SH3 in magenta, DHR1 in orange und DHR2 in blau). (A) *D. melanogaster\mbc*. (B) *C. elegans\ced-5*. (C) *H. sapiens\DOCK1*. (D) *H. sapiens\DOCK2*. (E) *H. sapiens\DOCK5*. (F) Im oberen Teil ist eine schematische Darstellung von Mbc-PA gezeigt. Zusätzlich zu den bekannten Domänen und der prolinreichen Region am C-Terminus sind die von Exon 8 (rot) und Exon 10 (cyan) kodierten Bereiche markiert. Die Zahlen geben jeweils die Position der ersten und letzten Aminosäure einer Domäne an. Insgesamt hat Mbc-PA eine Länge von 1970 Aminosäuren. Unter dem Schema ist ein Teil der Aminosäuresequenz gezeigt, die von Exon 8 (rot) und Exon 10 (cyan) kodiert wird (Aminosäure 868 bis 973). Der vom alternativ gespleißten Exon 9 kodierte Bereich (grün) liegt bei Mbc-PB zwischen diesen beiden Bereichen. Einzelne Aminosäuren der dargestellten Sequenz sind in anderen Spezies konserviert. Teilweise in allen Arten, die während dieser Arbeit analysiert wurden (dunkelgrau hinterlegt) oder nur innerhalb der Arthropoden (hellgrau hinterlegt). Anhand der konservierten Aminosäuren lässt sich erkennen, dass die Grenze zwischen dem von Exon 8 und dem von Exon 10 kodierten Bereichen bei allen Arthropoden vorhanden ist. In den orthologen Proteinen von *C. elegans* (*Nematoda*) und *H. sapiens* (*Chordata*) sind die Grenzen dagegen verschoben und damit die Bildung einer Mbc-PB entsprechenden Isoform nicht möglich.

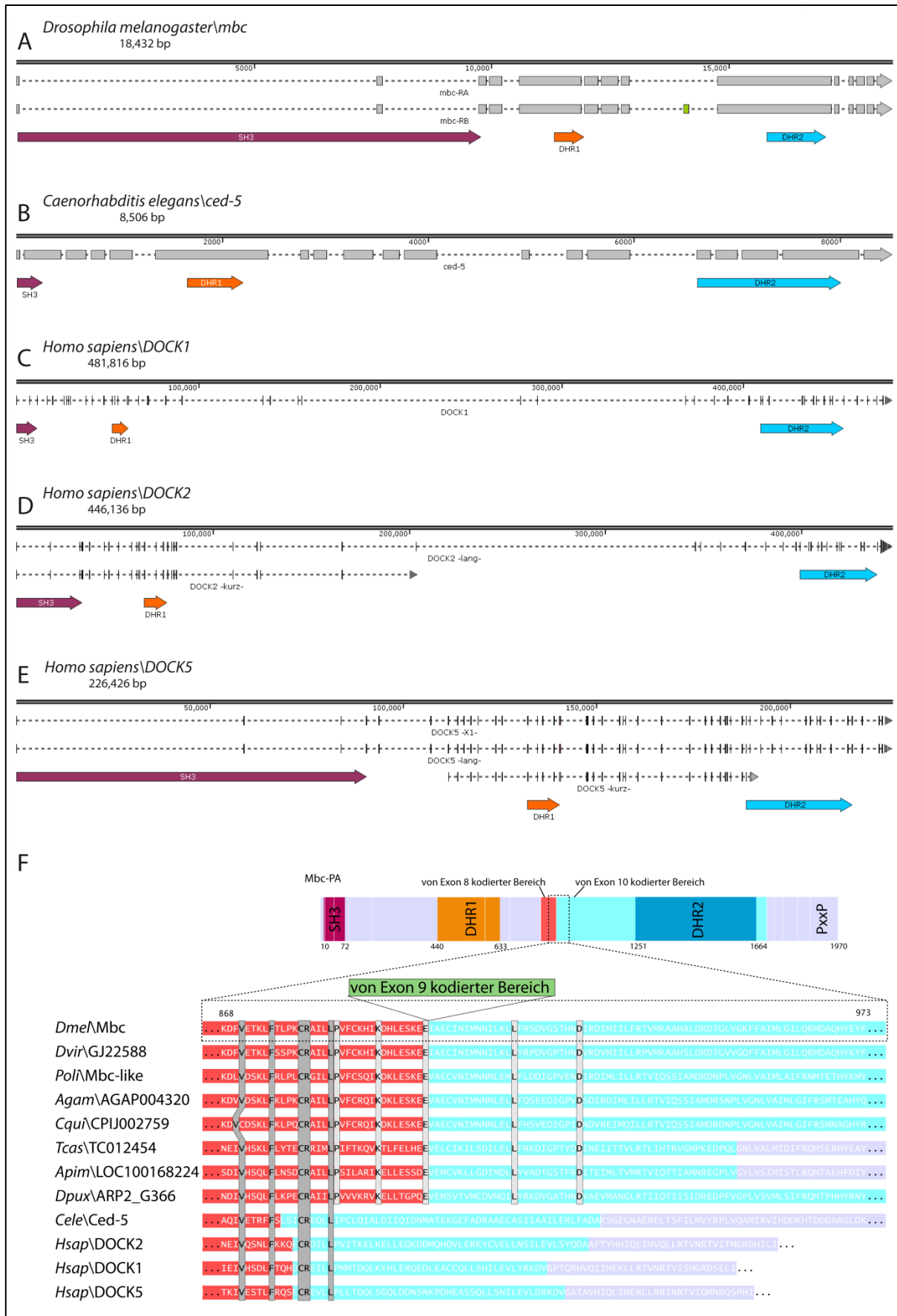


Abb. 3.32: *mbc* orthologe Gene in Nematoden und Vertebraten (Legende siehe vorherige Seite)

### 3.10.4. Die Bereiche, in denen sich die alternativen Isoformen unterscheiden sind innerhalb der Arthropoden nur schwach konserviert

Anhand der bioinformatischen Analyse der zu *mbc* orthologen Gene wird deutlich, dass das für *mbc* beschriebene alternative Spleißen vermutlich in allen Arthropoden auftritt. Da bei Mbc die funktionellen Unterschiede zwischen den beiden Isoformen auf dem von Exon 9 kodierten Bereich beruhen, müssten Aminosäuren, die für die Funktion von Mbc-PB wichtig sind in den homologen Bereichen der orthologen Proteine konserviert sein. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen, der von den alternativ gespleißten Exons kodierten Bereiche zeigt zunächst eine hohe Konservierung innerhalb der Drosophiliden (Abb. 3.33). Allerdings nimmt die Konservierung in evolutionär weiter entfernten Arten stark ab. Insgesamt sind die verschiedenen Sequenzen nur an drei Positionen in allen Spezies konserviert. Im Einzelnen handelt es sich dabei um ein Lysin (K), ein Leucin (L) und ein Glycin (G) (Abb. 3.33). Außerdem fällt auf, dass um das in allen Spezies konservierte Lysin in fast allen Spezies im gleichen Abstand zwei weitere positiv geladene Aminosäuren liegen (K oder R (Arginin), in Abb. 3.33 mit + markiert). In diesem Bereich befinden sich also sehr nah beieinander drei positiv geladene Aminosäuren, die über ionische Bindungen mit anderen Proteinen interagieren könnten.

		vom alternativ gespleißten Exon kodierter Bereich			
		+	+	+	
Drosophilidae	<i>D. melanogaster</i> \Mbc	---	GDSKTDIWQQEKNLSKAAKVLGQKKS	QLHTCDTTANKK	----
	<i>D. pseudoobscura</i> \GA10288	---	GD <b>T</b> KTDIWQQEKNLSKAAKVLGQ <b>S</b> KS	QLHT <b>R</b> ETTANKK	----
	<i>D. virilis</i> \GJ22588	---	GDSKTDIWQQEKNLSKAAKVLGQKKS	<b>H</b> LHT <b>R</b> ETTANKK	----
	<i>D. grimshawi</i> \GH23629	---	GDSKTDIWQQEKNLSKAAKVLGQKKS	QLHT <b>R</b> ETTANKK	----
Diptera	<i>P. olivacea</i> \Mbc-like	---	GD <b>I</b> I <b>S</b> DIWQQEKNL <b>T</b> KA <b>A</b> K <b>I</b> L <b>G</b> ESK	SQLH <b>A</b> R <b>E</b> TT <b>G</b> K <b>T</b> K	----
	<i>A. gambiae</i> \AGAP004320	---	GD <b>F</b> M <b>F</b> D <b>I</b> R <b>Q</b> QEK <b>N</b> L <b>T</b> KA <b>A</b> R <b>V</b> L <b>G</b> ESK	SQLH <b>T</b> R <b>E</b> TT <b>A</b> K <b>T</b> K	----
	<i>C. quinquefasciatus</i> \CPIJ002759	---	GD <b>F</b> M <b>F</b> D <b>I</b> R <b>Q</b> QEK <b>N</b> L <b>I</b> KA <b>A</b> K <b>V</b> L <b>G</b> ESK	SQLH <b>T</b> R <b>E</b> TT <b>A</b> K <b>T</b> K	----
Insecta	<i>T. castaneum</i> \TC12454	---	GD <b>R</b> R <b>L</b> D <b>G</b> R <b>R</b> Q <b>N</b> R <b>S</b> V <b>A</b> K <b>V</b> A <b>Q</b> L <b>L</b> G <b>T</b> T <b>Q</b> H <b>C</b> L <b>N</b> Q <b>H</b> R <b>G</b> Y <b>S</b> E <b>E</b>	----	
	<i>A. pisum</i> \LOC100168224	---	<b>A</b> K <b>T</b> <b>S</b> <b>I</b> <b>E</b> <b>F</b> R <b>N</b> K <b>T</b> <b>K</b> <b>S</b> V <b>A</b> K <b>I</b> A <b>K</b> V <b>L</b> G <b>E</b> N <b>G</b> R <b>K</b> L <b>L</b> D <b>S</b> P <b>D</b> M <b>S</b> D <b>Q</b>	----	
	<i>P. humanus</i> \PHUM252200	---	<b>G</b> R <b>T</b> <b>S</b> <b>A</b> S <b>Y</b> K <b>Q</b> Q <b>T</b> <b>K</b> <b>S</b> A <b>E</b> K <b>L</b> S <b>R</b> V <b>L</b> G <b>D</b> S <b>G</b> A <b>K</b> L <b>M</b> R <b>V</b> P <b>P</b> H <b>T</b> R <b>D</b> S <b>E</b>	----	
Arthropoda	<i>D. pulex</i> \ARP2_G366		<b>G</b> G <b>W</b> <b>G</b> G <b>Y</b> K <b>V</b> E <b>L</b> R <b>H</b> I <b>E</b> R <b>S</b> K <b>S</b> K <b>A</b> A <b>R</b> L <b>L</b> G <b>E</b> Q <b>V</b> D <b>Q</b> N <b>A</b> L <b>S</b> Q <b>K</b> A <b>A</b> V <b>A</b> G <b>E</b> T <b>R</b> A <b>Q</b> E		

**Abb. 3.33: Drei Aminosäuren des von Mbc-PB/Exon 9 kodierten Bereichs sind in allen Arthropoden konserviert**

Dargestellt ist ein Alignment aus der Aminosäuresequenz des von Mbc-PB/Exon 9 kodierten Bereichs und den homologen Bereichen aus allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Arthropoden. Die Spezies sind nach ihren Verwandtschaftsverhältnissen gruppiert (*Drosophilidae* → *Diptera* → *Insecta* → *Arthropoda*). In Sequenzen der orthologen Proteine sind Aminosäuren, die nicht mit der Aminosäuresequenz des alternativ gespleißten Bereichs von Mbc übereinstimmen rot markiert. Sequenzen, die bisher nicht als Teil eines Transkripts oder Proteins beschrieben wurden, sind grau gefärbt. Insgesamt sind nur 3 Aminosäuren in allen Spezies konserviert. Zudem treten im zentralen Teil des Alignments in fast allen Spezies 3 positiv geladene Aminosäuren (+) auf.

Wie zudem experimentell gezeigt werden konnte, sind verschiedene Phosphorylierungsstellen (S905, T935 und T936) innerhalb des von Exon 9 kodierten Bereichs notwendig um Mbc-PB zu inaktivieren. Da diese Aminosäuren damit äußerst wichtig für die Regulation von Mbc-PB sind wurde im Weiteren untersucht, inwieweit sie in den homologen Bereichen der orthologen Proteine konserviert vorliegen. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen des analysierten Bereichs zeigt, dass alle Phosphorylierungsstellen innerhalb der Drosophiliden konserviert sind (Abb. 3.34). Bei Dipteren, die nicht zu den Drosophiliden gehören, sind dagegen nur drei der Phosphorylierungsstellen in allen untersuchten Spezies konserviert, darunter T935 und T936, die wie bereits gezeigt bei der Inaktivierung von Mbc-PB eine Rolle spielen. S905 ist dagegen in keiner der analysierten Spezies konserviert (Abb. 3.34). *T. castaneum* besitzt lediglich vier phosphorylierbare Aminosäuren innerhalb des gesamten analysierten Bereichs, die nicht an den Phosphorylierungsstellen von Mbc-PB liegen. Bei *A. pisum* und *P. humanus* befindet sich ein Threonin an der dritten Position des analysierten Bereichs, also an der gleichen Position wie S905 in Mbc-PB. *D. pulex*, der einzige untersuchte Arthropode der nicht zu den Insekten gehört, besitzt lediglich vier phosphorylierbare Aminosäuren, von denen keine an homologen Positionen zu Mbc-PB liegen. Insgesamt lässt sich keine Phosphorylierungsstelle finden, die in allen untersuchten Spezies konserviert ist. Allerdings befinden sich in einigen der analysierten Spezies eine phosphorylierbare Aminosäure am N-Terminus des analysierten Bereichs (an der Position von S905), sowie mindestens eine Phosphorylierungsstelle am C-Terminus (an der Position von T935 und T936).

		vom alternativ gespleißten Exon kodierter Bereich																																															
		905	907	917	928	932	935	936																																									
Drosophilidae	<i>D. melanogaster</i> \Mbc	---	GD	SK	TDI	WQQ	EK	NL	SK	AAK	VL	GQ	KK	S	QL	H	T	CD	TT	AN	KK	---																											
	<i>D. pseudoobscura</i> \GA10288	---	GD	TK	TDI	WQQ	EK	NL	SK	AAK	VL	GQ	SK	S	QL	H	T	RE	TT	AN	KK	---																											
	<i>D. virilis</i> \GJ22588	---	GD	SK	TDI	WQQ	EK	NL	SK	AAK	VL	GQ	KK	S	HL	H	T	RE	TT	AN	KK	---																											
	<i>D. grimshawi</i> \GH23629	---	GD	SK	TDI	WQQ	EK	NL	SK	AAK	VL	GQ	KK	S	QL	H	T	RE	TT	AN	KK	---																											
Diptera	<i>P. olivacea</i> \Mbc-like	---	GD	II	SDI	WQQ	EK	NL	T	KA	AK	IL	GE	SK	S	QL	H	ARE	TT	G	TK	---																											
	<i>A. gambiae</i> \AGAP004320	---	GDF	MF	DIR	Q	EK	NL	T	KA	AR	VL	GE	SK	S	QL	H	T	RE	TT	A	TK	---																										
	<i>C. quinquefasciatus</i> \CPIJ002759	---	GDF	MF	DIR	Q	EK	NL	I	KA	AK	VL	GE	SK	S	QL	H	T	RE	TT	A	TK	---																										
Insecta	<i>T. castaneum</i> \TC12454	---	GDR	RLD	GRR	Q	NR	S	VAK	V	A	QL	L	GT	Q	H	CL	N	Q	H	R	G	Y	S	E	E	---																						
	<i>A. pisum</i> \LOC100168224	---	AK	T	S	I	E	FR	N	K	T	K	S	V	A	K	I	A	K	V	L	G	E	N	R	K	L	L	D	S	P	D	M	S	D	Q	---												
	<i>P. humanus</i> \PHUM252200	---	GRT	S	A	S	Y	K	Q	Q	T	K	S	A	E	K	L	S	R	V	L	G	D	S	G	A	K	L	M	R	V	P	P	H	T	R	D	S	E	---									
Arthropoda	<i>D. pulex</i> \ARP2_G366	---	GG	W	G	G	Y	K	V	E	L	R	H	I	E	R	S	K	S	K	A	A	R	L	L	G	E	Q	V	D	Q	N	A	L	S	Q	K	A	A	V	A	G	E	T	R	A	Q	E	---

**Abb. 3.34: Phosphorylierungsstellen innerhalb der von alternativ gespleißten Exons kodierten Bereiche**

Dargestellt ist ein Alignment aus der Aminosäuresequenz des von Mbc-PB/Exon 9 kodierten Bereichs und den homologen Bereichen aus allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Arthropoden. Die Spezies sind nach ihren Verwandtschaftsverhältnissen gruppiert (*Drosophilidae* → *Diptera* → *Insecta* → *Arthropoda*). Grau dargestellte Sequenzen können potenziell in einem Transkript vorkommen, allerdings wurde dies noch nicht experimentell bestätigt. Phosphorylierbare Aminosäuren sind in rot (Serin) und grün (Threonin) dargestellt. Die Zahlen über dem Alignment geben die Position der jeweiligen Aminosäure innerhalb von Mbc-PB an.

### 3.11. Die 3D-Struktur von Mbc

Die bioinformatische Untersuchung von Mbc-PB und den orthologen Proteinen ergab, dass innerhalb der von den alternativ gespleißten Exons kodierten Bereiche nur wenige Aminosäuren konserviert sind. Daher ergibt sich die Frage, ob die jeweiligen Bereiche eine ähnliche räumliche Struktur einnehmen und die konservierten Aminosäuren so vergleichbare Positionen innerhalb des gefalteten Proteins einnehmen.

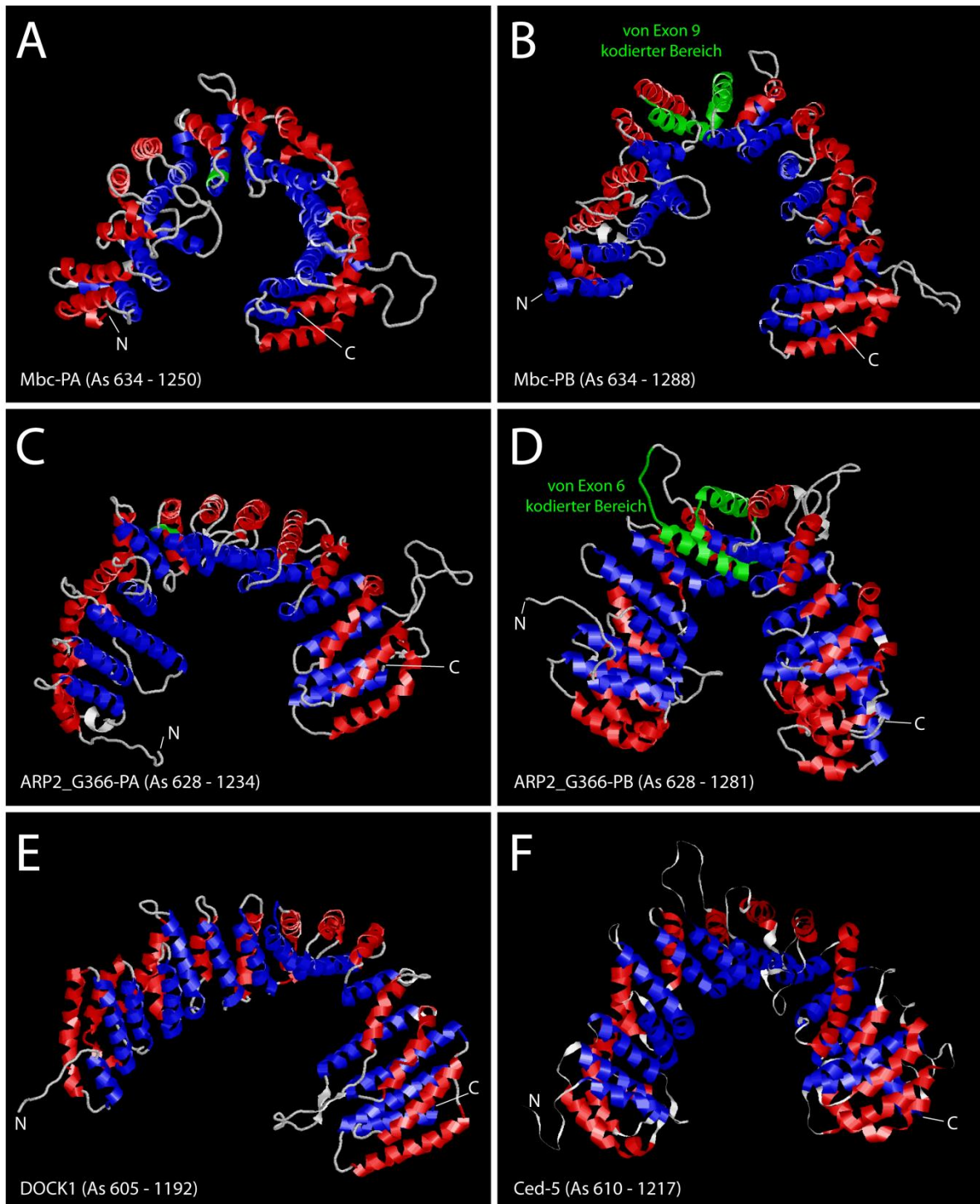
#### 3.11.1. Die zentrale Region von Mbc faltet sich zu HEAT-repeats

Mbc bzw. die orthologen Proteine sind sehr groß, besitzen mehrere Domänen und bisher liegt keine 3D-Struktur für das gesamte Molekül vor. Allerdings ist die dreidimensionale Struktur der einzelnen Domänen bekannt, z. B. für die DHR1-Domäne von DOCK1 (Premkumar et al., 2010) und die DHR2-Domäne von DOCK9, einem mit DOCK1 nah verwandten Protein (Yang et al., 2009). Über die räumliche Struktur außerhalb der einzelnen Domänen ist bisher jedoch wenig bekannt. Die Aminosäuresequenz der Region zwischen der DHR1- und der DHR2-Domäne zeigt allerdings Gemeinsamkeiten mit Armadillo/HEAT-repeats (Rossman et al., 2005). Bei *repeats* handelt es sich um Regionen, in denen sich das gleiche Sekundärstrukturelement mehrfach direkt hintereinander wiederholt. Durch die Aneinanderreihung mehrerer solcher Elemente entsteht eine übergeordnete Struktur. Ein Armadillo-repeat besteht aus insgesamt drei  $\alpha$ -Helices. Die erste und kürzeste Helix stellt den Kontakt zum vorherigen *repeat* bzw. zu benachbarten Bereichen her, die zweite und dritte Helix sind antiparallel angeordnet. Ein HEAT-repeat besteht dagegen aus nur zwei antiparallelen  $\alpha$ -Helices. Mehrere dieser *repeats* hintereinander bilden eine Superhelix (Groves and Barford, 1999, Andrade et al., 2001). Da sich die beiden Isoformen von Mbc bzw. den orthologen Proteinen aus Arthropoden in genau dieser Region unterscheiden, wurde deren 3D-Struktur näher untersucht. Für die Analyse wurde zunächst mit Hilfe des Programms *RaptorX structure prediction* (Kallberg et al., 2012) ein dreidimensionales Modell für Mbc-PA berechnet. Für die Strukturvorhersage wurde lediglich die Aminosäuresequenz zwischen der DHR1- und der DHR2-Domäne (Aminosäure (As) 634-1250) verwendet. Da sich Domänen unabhängig vom Rest des Proteins falten, sollten weder die DHR1- noch die DHR2-Domäne Einfluss auf die Faltung dieser Region haben. Das 3D-Modell der analysierten Region von Mbc-PA besteht aus 26  $\alpha$ -Helices, die antiparallel angeordnet sind. Insgesamt bilden die  $\alpha$ -Helices in zwei Schichten eine halbkreisförmige Struktur aus 13 HEAT-repeats (Abb. 3.35A, ein Heat-repeat wird von jeweils einer roten Helix und der folgenden blauen Helix gebildet). Um die Qualität dieses Modells besser beurteilen zu können, wurde die 3D-Struktur für die homologen Regionen von drei orthologen Proteinen berechnet. Dazu wurden Proteine gewählt, die evolutionär möglichst weit von Mbc entfernt sind. Im Einzelnen sind das

ARP2\_G366-PA (As 654-1307) aus *D. pulex*, DOCK1 (As 605-1192) aus *H. sapiens* und Ced-5 (As 610-1217) aus *C. elegans*. Auch für diese Berechnungen wurde lediglich die Aminosäuresequenz der Region zwischen der DHR1- und der DHR2-Domäne verwendet. In allen drei Fällen ergibt sich ein relativ ähnliches Bild im Vergleich zu Mbc-PA. Auch bei den drei orthologen Proteinen besteht die analysierte Region aus 13 HEAT-*repeats*, die insgesamt eine halbkreisförmige Struktur bilden (Abb. 3.35C, E und F). Dass die Strukturvorhersage, trotz der relativ geringen Sequenzidentität, sowie der unterschiedlichen Länge der analysierten Regionen (Tab. 3.1) für alle vier Proteine sehr ähnlich ausfällt, spricht für die Qualität der Berechnungen. Besonders interessant ist die Frage, inwieweit in Arthropoden die räumliche Struktur dieser Region von den zusätzlichen Aminosäuren, die von dem alternativ gespleißten Exons kodiert werden, beeinflusst wird. Die Strukturvorhersagen für die alternativen Isoformen von Mbc und ARP2\_G366 zeigen, dass die von den alternativ gespleißten Exons kodierten Aminosäuren in beiden Fällen genau zwei zusätzliche  $\alpha$ -Helices bilden (Abb. 3.35B und D, grüne Helices). In beiden Fällen bilden die beiden  $\alpha$ -Helices keinen eigenen HEAT-*repeat*, sondern sind Bestandteil von zwei benachbarten HEAT-*repeats*. Die analysierten Regionen bestehen nach wie vor größtenteils aus antiparallel angeordneten  $\alpha$ -Helices. Vor allem bei den beiden Isoformen von ARP2\_G366 (Abb. 3.35C und D) unterscheidet sich jedoch die gesamte räumliche Struktur stark voneinander. Ob der relativ kleine Bereich, in dem sich die beiden Isoformen voneinander unterscheiden, allerdings wirklich einen so großen Einfluss auf die 3D-Struktur der gesamten Region hat oder bloß die Berechnung der Modelle beeinflusst wird, ist unklar. Um den tatsächlichen Einfluss der zusätzlichen Aminosäuren auf die Faltung dieser Region zu ermitteln, müsste die 3D-Struktur dieser Region von beiden Isoformen experimentell bestimmt werden.

**Tab. 3.1: Vergleich der Region zwischen der DHR1- und der DHR2-Domäne von Mbc-PA und verschiedenen orthologen Proteinen**

	<b>Sequenzidentität zu Mbc-PA</b>	<b>As</b>	<b>HEAT-<i>repeats</i></b>
Mbc-PA (As 634-1250)	-	616	13
ARP2_G366-PA (As 628-1234)	43 %	606	13
DOCK1 (As 605-1192)	41 %	607	13
Ced-5 (As 610-1217)	24,8 %	587	13
Mbc-PB (As 634-1288)	-	644	14
ARP2_G366-PB (As 628-1281)	-	653	14



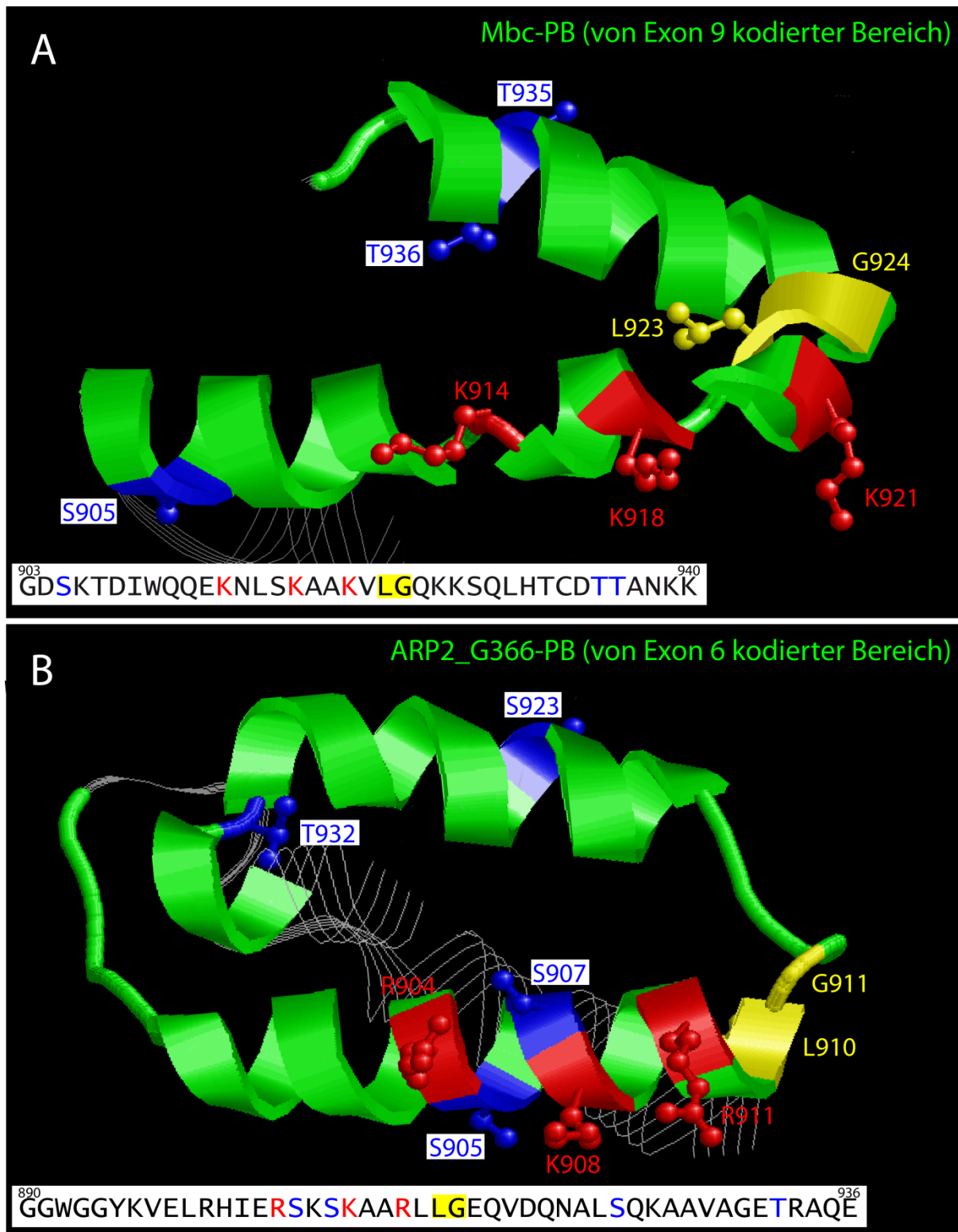
**Abb. 3.35: Strukturvorhersagen von Mbc und verschiedenen orthologen Proteinen**

(A-F) Dargestellt ist die mit Hilfe des Programms *RaptorX structure prediction* berechnete 3D-Struktur der Region zwischen der DHR1 und der DHR2-Domäne von Mbc und verschiedenen orthologen Proteinen. In Klammern ist jeweils der Abschnitt der Aminosäuresequenz angegeben, der für die Berechnung genutzt wurde. Die Aminosäuren bilden HEAT-*repeats* (bestehend aus jeweils einer roten und einer blauen  $\alpha$ -Helix), die sich zu einer halb-kreisförmigen Struktur zusammenlagern. (A, B, C und D) Die Bereiche, in denen sich die alternativen Isoformen von Mbc und ARP2\_G366 unterscheiden, sind in grün dargestellt.



### 3.11.2. Der von Exon 9 kodierte Bereich bildet zwei antiparallele $\alpha$ -Helices

Wie die Strukturvorhersagen von Mbc-PB und ARP2\_G366-PB zeigen, scheint sich in beiden Fällen der Bereich, der von den alternativ gespleißten Exons kodiert wird, zu zwei antiparallele  $\alpha$ -Helices zu falten. Diese bilden jeweils einen Teil von zwei benachbarten HEAT-*repeats*. Um zu untersuchen, ob innerhalb dieser Helices konservierte Aminosäuren an ähnlichen Positionen lokalisiert sind und damit die gleiche Funktion übernehmen könnten, wurde deren Position innerhalb der 3D-Struktur näher analysiert. Innerhalb des untersuchten Bereichs sind insgesamt lediglich drei Aminosäuren in allen untersuchten Arthropoden konserviert (Abb. 3.33), darunter ein Leucin und ein Glycin, die direkt nebeneinander liegen. Die Strukturvorhersagen zeigen, dass diese beiden Aminosäuren in beiden Fällen eine Position am Ende der ersten  $\alpha$ -Helix einnehmen (Abb. 3.36, gelb markiert) und damit am Ende des ersten HEAT-*repeats* liegen. Das Glycin scheint hier die Funktion eines Helixbrechers einzunehmen und damit zu gewährleisten, dass sich die beiden Helices antiparallel anordnen können. Bei der dritten konservierten Aminosäure handelt es sich um ein Lysin, in dessen Nachbarschaft, wie bereits beschrieben, zwei weitere positiv geladene Aminosäuren liegen (Abb. 3.33). In der 3D-Struktur sind die drei positiv geladenen Aminosäuren in beiden Fällen Teil der ersten  $\alpha$ -Helix und sind auf derselben Seite positioniert (Abb. 3.36, rot markiert). Somit kommt es zu einer Konzentration der positiven Ladung innerhalb des analysierten Bereichs. Außerdem wurden die Positionen der potenziellen Phosphorylierungsstellen innerhalb dieses Bereichs analysiert. Wie experimentell gezeigt wurde, sind S905, T935 und T936 (Abb. 3.36A, blau markiert) für die Inaktivierung von Mbc-PB verantwortlich. In der 3D-Struktur sind die Phosphorylierungsstellen am Anfang der ersten bzw. am Ende der zweiten  $\alpha$ -Helix lokalisiert. Bei ARP2\_G366-PB treten innerhalb des analysierten Bereichs lediglich vier phosphorylierbare Aminosäuren auf, davon liegen zwei (S905 und S907) im positiv geladenen Bereich der ersten Helix. Die beiden anderen (S923 und T932) dagegen innerhalb der zweiten Helix (Abb. 3.36B, blau markiert). T932 liegt am Ende der zweiten  $\alpha$ -Helix und nimmt somit eine ähnliche Position wie T935/T935 in Mbc-PB ein. Insgesamt bestehen zwischen den beiden analysierten Bereichen sowohl bei der dreidimensionalen Struktur als auch bei der Anordnung der konservierten Aminosäuren große Ähnlichkeiten. Daher ist zu vermuten, dass beide Bereiche die gleichen Funktionen übernehmen können.



**Abb. 3.36:** Berechnete 3D-Struktur des von den alternativ gespleißten Exons kodierten Bereichs von Mbc und ARP2\_G366

(A-B) Dargestellt ist die mit Hilfe des Programms *RaptorX structure prediction* berechnete 3D-Struktur sowie die Aminosäuresequenz des von den alternativ gespleißten Exons kodierten Bereichs von Mbc-PB und ARP2\_G366-PB. Die in allen Arthropoden konservierten Aminosäuren sind in gelb dargestellt und sind jeweils am Ende der ersten  $\alpha$ -Helix lokalisiert. Die drei positiv geladenen Aminosäuren, die ebenfalls in allen Arthropoden auftreten, sind rot gefärbt und alle auf einer Seite der ersten  $\alpha$ -Helix lokalisiert. In blau sind phosphorylierbare Aminosäuren dargestellt.

## **4. Diskussion**

### **4.1. Phänotypen der *mbc* Mutante**

In der *mbc* Mutante lassen sich am Ende der Embryonalentwicklung im Bereich des PNS und des Hautmuskelschlauchs in mindestens drei unterschiedlichen Zellpopulationen Phänotypen beobachten. Zum einen ist die Entwicklung der somatischen Muskeln betroffen, hier ist die Fusion der Myoblasten zu synzytialen Muskelzellen beeinträchtigt. Außerdem zeigen die Axone der Motorneurone, die im WT die Muskeln des Hautmuskelschlauchs innervieren, teilweise starke Wegfindungsdefekte. Als dritte Gruppe sind die Gliazellen des PNS betroffen, die im WT entlang der Motoraxone positioniert sind und diese mit ihren Zellkörpern umhüllen.

#### **4.1.1. Muskuläre und axonale Phänotypen**

Die Rolle von *Mbc* während der Muskelentwicklung ist seit der ersten Beschreibung des Muskelphänotyps (Rushton et al., 1995) detailliert untersucht worden und mittlerweile relativ gut verstanden. Da sich diese Arbeit primär mit der Migration der ePG beschäftigt, möchte ich an dieser Stelle nicht weiter darauf eingehen. Einen Überblick liefern die Artikel (Chen and Olson, 2004, 2005, Haralalka and Abmayr, 2010). Die axonalen Phänotypen der Motorneurone wurden dagegen bisher nicht beschrieben. Bei *mbc* mutanten Embryonen, bei denen die Muskelentwicklung durch Expression von *mbc-RA* im Mesoderm gerettet werden konnte (Rescue: *twi>mbc-RA*), treten interessanterweise keine axonalen Wegfindungsdefekte auf. Das deutet darauf hin, dass es sich hierbei um sekundäre Effekte handelt, die aufgrund der fehlentwickelten Muskeln entstehen. Da die Motorneurone für die Innervierung der Muskeln verantwortlich sind, stellen die Muskeln vermutlich das terminale Ziel für deren Axone da. In *mbc* Mutanten, in denen sich keine Muskeln entwickeln, muss es also fast zwangsläufig auch zu axonalen Wegfindungsdefekten kommen.

#### **4.1.2. Gliale Migrationsdefekte**

Zusätzlich zu den muskulären und axonalen Phänotypen treten in der *mbc* Mutante auch gliale Migrationsdefekte auf. Dabei sind alle zentral generierten ePG, die aus dem ZNS in dorsale Richtung wandern, betroffen. Wie sich zeigte, handelt es sich auch hier teilweise um sekundäre Effekte, die durch die fehlentwickelten Muskeln hervorgerufen werden, denn im Rettungsexperiment, bei dem der Muskelphänotyp gerettet werden konnte (Rescue: *twi>mbc-RA*), sind die glialen Migrationsdefekte deutlich reduziert, konnten jedoch nicht vollständig gerettet werden. *Mbc* hat aber außerdem einen direkten zellautonomen Einfluss bei

der Migration der ePG. Das konnte zum einen durch *knock-down* Experimenten, bei denen Mbc gezielt nur in Gliazellen herunter reguliert wurde, zum anderen bei Rettungsexperimenten, bei denen Mbc im mutantern Hintergrund gezielt nur in Gliazellen exprimiert wurde gezeigt werden. Der indirekte Einfluss auf die Migration der ePG geht vermutlich auf Interaktionen zwischen den Gliazellen und den peripheren Nerven zurück. Wie gezeigt werden konnte, dienen Fas2 positive Motoraxone, die Teil der peripheren Nerven sind, als Substrat für die auswandernden ePG (Sepp et al., 2000, 2001). Neuere Arbeiten zeigen zudem, dass von den Motorneuronen ein subzellulärer Fas2-Gradient entlang der Axone gebildet wird, der die Migration der ePG koordiniert. Demzufolge startet die Migration der zentral generierten ePG erst nachdem die Konzentration von Fas2 im ventralen Bereich der Axone herunter reguliert wird (Silies and Klämbt, 2010). Das Signal für den Abbau von Fas2 könnte über den Kontakt zwischen Muskeln und den Axonen der Motorneuronen vermittelt werden. In der *mbc* Mutante würde somit, aufgrund der fehlenden Muskeln, kein Fas2-Gradient aufgebaut werden, was zu den Migrationsdefekten der ePG führt.

Allerdings kann auch nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass die Muskeln selbst die Migration der ePG beeinflussen, z. B. durch die Produktion von sezernierten Liganden. Ein Beispiel dafür ist vermutlich ePG12, die einzige der ePG, die während der embryonalen Migrationsphase sowohl Migrationsrichtung als auch den Nerv bzw. das Substrat wechselt. ePG12 wird bereits im Bereich des PNS als Nachkomme eines *sensory organ precursors* (SOP) geboren und folgt während der Migration zunächst dem ISN in dorsale Richtung, wechselt aber an einem bestimmten Punkt die Migrationsrichtung nach anterior und nimmt letztendlich eine Position am TN ein (von Hilchen et al., 2008). Im WT ist klar zu erkennen, dass sowohl der TN als auch ePG12 sehr eng mit dem *segmental border muscle* (SBM) assoziiert sind. In der *mbc* Mutante dagegen ist zum einen die Morphologie des TN stark verändert, zum anderen bleibt ePG12 oft am ISN liegen. Durch die Rettung des Muskelphänotyps im Rettungsexperiment mit der mesodermalen Treiberlinie *twi*-Gal4 lässt sich dieser Phänotyp vollständig revidieren, was nahelegt, dass der SBM als finales Ziel und Wegweiser bei der Migration von ePG12 dient.

## 4.2. Funktionelle Unterschiede der beiden Isoformen

Durch die Rettungsexperimente konnte außerdem gezeigt werden, dass sich die beiden annotierten Isoformen von Mbc funktionell unterscheiden. Der strukturelle Unterschied zwischen den beiden Isoformen besteht nur in einem einzelnen Exon, das zudem nur für 38 Aminosäuren kodiert, d. h. im Vergleich zum gesamten Protein sehr klein ist. Daher ist es relativ überraschend, dass die Expression der kürzeren Isoform Mbc-PA in *mbc* mutantern Hintergrund überhaupt keinen Effekt auf die Migration von ePG9 hat, wohingegen die Ex-

pression der längeren Isoform Mbc-PB sogar zu einer Übermigration von ePG9 führt. Die Übermigration von ePG9 lässt sich ebenfalls durch die Expression von *mbc-RB* im wildtypischen Hintergrund induzieren und hängt vermutlich mit der im Vergleich zum WT erhöhten Konzentration von Mbc-PB zusammen. Durch die erhöhte Konzentration des Proteins könnte es z. B. zu einer verzögerten Inaktivierung von Mbc-PB durch Phosphorylierung innerhalb von Exon 9 (vgl. Kapitel 4.3.3) oder einer verzögerten Ubiquitinierung mit anschließendem proteasomalem Abbau kommen (vgl. Kapitel 4.3.4). Somit bleibt Mbc-PB länger aktiv und beeinflusst so die Migration der ePG.

Während bei der glialen Migration die Funktion von Mbc lediglich durch Isoform B übernommen werden kann, ist die Rettung der Muskeln im Rettungsexperiment durch beide Isoformen möglich. Allerdings scheint bei der Fusion der Myoblasten Mbc-PA die vorherrschende Form zu sein, zumindest ist die Expression von *mbc-RA* im embryonalen Stadium 11 maximal, kurz danach beginnen die Myoblasten zu fusionieren.

Interessant wäre es zu wissen, ob Mbc-PB grundsätzlich die Funktion von Mbc-PA übernehmen kann oder nur in bestimmten Fällen wie z. B. bei der Fusion der Myoblasten. Dazu müsste allerdings zunächst näher untersucht werden, ob *mbc-RB* ausschließlich in Gliazellen exprimiert wird oder auch in anderen Zellpopulationen und verbunden damit, ob die Migration anderer Zellpopulationen, wie z. B. der *border cells* auch von Mbc-PB abhängig ist. Dazu sollte das genaue Expressionsmuster der beiden Isoformen analysiert werden. Dieser Ansatz wurde von Christina Heiser, im Rahmen eines von mir betreuten F2-Praktikums, verfolgt. Dazu wurden *in-situ*-Hybridisierungen mit mehreren unterschiedlichen isoformspezifischen Sonden durchgeführt. Zum einen mit sehr kurzen RNA-Sonden, mit einer Länge von nur 30 nt, mit denen allerdings kein spezifisches Expressionsmuster detektiert werden konnte. Der zweite Ansatz wurde mit längeren Sonden durchgeführt, die sich allerdings nicht als isoformspezifisch erwiesen (Daten nicht gezeigt). Eine letzte Möglichkeit zumindest das Expressionsmuster von *mbc-RB* zu detektieren, wäre mit Hilfe einer Sonde, die über die gesamte Länge an das alternativ gespleißte Exon 9 bindet. Dieser Ansatz konnte jedoch aus Zeitgründen nicht weiter verfolgt werden. Eine Alternative dazu wäre ein Antikörper gegen ein Epitop innerhalb des von Exon 9 kodierten Bereichs, um das Protein Mbc-PB gezielt nachzuweisen.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob Mbc-PB bei der Migration weiterer Zellenpopulationen, z. B. der *border cells*, eine Rolle spielt. Bisher konnte sowohl in *mbc* Mutanten (Duchek et al., 2001) als auch bei *knock-down* Experimente, bei denen die Transkripte beider Isoformen ausgeschaltet wurden (Geisbrecht et al., 2008), eine unvollständige Migration dieser Zellgruppe beobachtet werden. Um zu überprüfen, ob Mbc-PB bei der Migration der *border cells* eine ähnlich zentrale Rolle wie bei der Migration der ePG spielt, könnte z. B.

eine RNAi-Linie, die speziell gegen die Sequenz von Exon 9 gerichtet ist, benutzt werden, um nur *mbc-RB* mRNA zu eliminieren oder Rettungsexperimente mit Mbc-PB durchgeführt werden.

### 4.3. Regulation von Mbc

Prinzipiell ist die Regulation von Mbc bzw. dem orthologen DOCK1 aus Vertebraten über drei verschiedene Mechanismen möglich. Zunächst ist die Rekrutierung an die Plasmamembran bzw. die subzelluläre Lokalisierung, z. B. am Leitsaum, erforderlich. Im nächsten Schritt wird die katalytische Aktivität von Mbc reguliert. Dies geschieht vermutlich über die intramolekulare Bindung zwischen der SH3 und der DHR2-Domäne (Autoinhibition). Um die Bindung aufzuheben, spielt die Phosphorylierung an bestimmten Aminosäuren eine Rolle. Die dritte Möglichkeit der Regulation besteht in der gezielten Ubiquitinierung des Proteins und anschließendem Abbau durch das Proteasom.

#### 4.3.1. Rekrutierung an die Plasmamembran

Die Rekrutierung von Mbc/DOCK1 kann prinzipiell durch drei verschiedene Mechanismen erfolgen, wobei jeweils ein anderer Teil des Proteins involviert ist. Der prolinreiche C-Terminus kann an eine SH3-Domäne binden und wird so z. B. über das Adapterprotein Crk an die Membran rekrutiert (Hasegawa et al., 1996, Matsuda et al., 1996). Diese Interaktion spielt z. B. bei der Migration der *border cells* eine Rolle (Geisbrecht et al., 2008), während der Myoblastenfusion kann Mbc dagegen unabhängig von Crk rekrutiert werden, obwohl beide Proteine in diesen Zellen exprimiert werden (Balagopalan et al., 2006). In die Migration der ePG scheint Crk ebenfalls nicht involviert zu sein, zumindest treten in der Crk Mutante keine Migrationsdefekte auf.

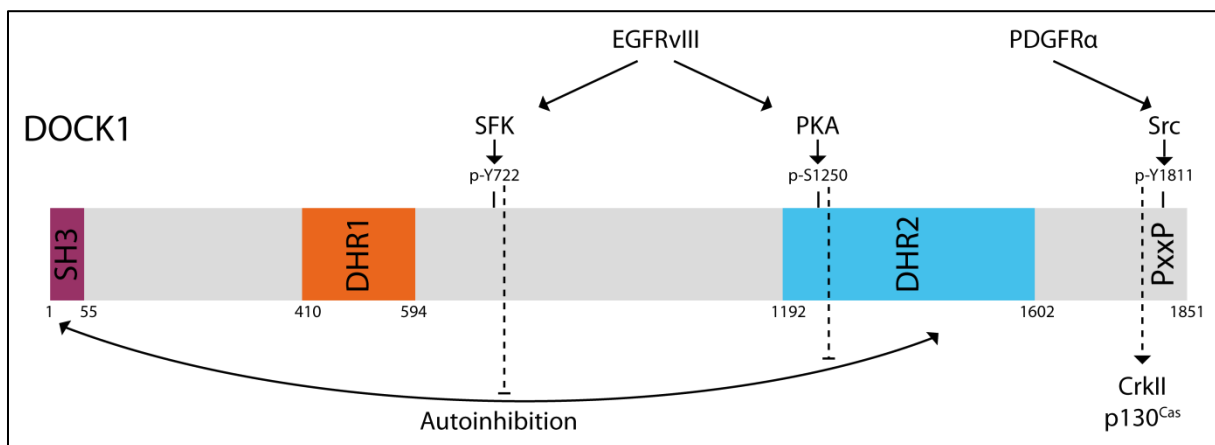
Mbc/DOCK1 kann außerdem über seine DHR1-Domäne direkt an das Phospholipid PIP<sub>3</sub>, ein Bestandteil der Plasmamembran, binden. Diese Interaktion ist essenziell für die Myoblastenfusion, obwohl Mbc auch unabhängig von PIP<sub>3</sub> an die Membran rekrutiert werden kann (Balagopalan et al., 2006). Ob PIP<sub>3</sub> bei der Migration der ePG eine Rolle spielt, ist unklar. Bei vielen migrierenden Zellen ist es für die Polarität der Zellen verantwortlich und bildet einen Gradienten, mit der stärksten Konzentration am Leitsaum, was die Migrationsrichtung vorgibt. Um den intrazellulären Gradienten aufrecht zu erhalten, wird am Leitsaum permanent PIP<sub>3</sub> durch Phosphorylierung von PIP<sub>2</sub> gebildet. Dieser Schritt wird durch Pi3K katalysiert. Im Rest der Zelle wird dagegen PIP<sub>3</sub> von der Phosphatase Pten wieder zu PIP<sub>2</sub> dephosphoryliert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Experimente durchgeführt, um die intrazelluläre Konzentration von PIP<sub>3</sub> zu beeinflussen. Zum einen wurde die konstitutiv aktive

Form von Pi3K92E, der katalytischen Untereinheit des Pi3K-Heterodimers, zum anderen Pten glial überexprimiert. In beiden Fällen wird die Migration von ePG9 nicht beeinflusst, was vermutlich damit zusammen hängt, dass beide Faktoren die Konzentration von PIP<sub>3</sub> bzw. PIP<sub>2</sub> in der gesamten Zelle verändern, der Gradient bleibt allerdings bestehen. Auf diese Weise wird also die Lokalisierung von Mbc durch die Bindung an PIP<sub>3</sub> am Leitsaum nicht beeinflusst. Die gliale Überexpression von Pi3K21B, der regulatorischen Untereinheit des Pi3K-Heterodimers, führt dagegen zur Übermigration von ePG9. Da Pi3K21B für die Lokalisierung der katalytischen Untereinheit verantwortlich ist, könnte die Überexpression zu einer verstärkten Rekrutierung von Pi3K92E zum Leitsaum und somit zu einer Erhöhung der PIP<sub>3</sub> Konzentration führen. Damit würde auch Mbc verstärkt an den Leitsaum rekrutiert werden, was letztlich zu einer Übermigration der Zellen führt. Ebenso führt die Überexpression von dominant negativer Pi3K92E zu einer Übermigration von ePG9. Diese Form trägt eine Mutation in der ATP-Bindestelle und ist damit enzymatisch inaktiv. Sie kann jedoch mit allen Interaktionspartnern von Pi3K92E interagieren und auf diese Weise die Produktion von PIP<sub>3</sub> stören. Warum diese Form von Pi3K92E zu einer Übermigration von ePG9 führt kann anhand dieser Daten nicht erklärt werden. Außerdem kann Mbc/DOCK1 mit seiner SH3-Domäne mit Ced-12/Elmo1 interagieren und auf diese Weise an die Plasmamembran rekrutiert werden. Dieser Mechanismus und die Rolle von Ced-12 bei der Migration der ePG wird in Kapitel: 4.5.2 eingehend diskutiert.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Rekrutierung von Mbc/DOCK1 bzw. die Lokalisation in einem bestimmten Bereich der Zelle, stark vom Zelltyp und damit von den interagierenden Faktoren abhängt. Teilweise scheinen mehrere Mechanismen parallel nebeneinander genutzt zu werden. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass eine mutante Form von Mbc, die weder mit PIP<sub>3</sub> noch mit Crk interagieren kann, trotzdem zur Membran rekrutiert werden kann (Balagopalan et al., 2006). Dass die Rekrutierung alleine für eine Aktivierung von Mbc/DOCK1 ausreichend ist, zeigen Experimente, die in Zellkultur durchgeführt wurden. Dabei wurde DOCK1 eine CAAX-Box angefügt, was zur posttranslationalen Prenylierung führt und zu einer stabilen Verankerung des Proteins in der Membran führt (Hasegawa et al., 1996). Diese Modifikation reicht aus, um die Morphologie der Zellen zu verändern, wohingegen wildtypisches DOCK1 keine morphologischen Veränderungen induzieren kann. Da die Überexpression von Mbc-PB in Gliazellen autonom und ohne die Coexpression eines weiteren Faktors zur Übermigration von ePG9 führt, scheint auch in diesem Fall das Protein zur Zellmembran rekrutiert bzw. am Leitsaum lokalisiert zu werden und somit aktiv zu sein. Die Überexpression von Mbc-PA beeinflusst die Migration der ePG dagegen nicht. Da der einzige Unterschied zwischen den beiden Isoformen in dem von Exon 9 kodierten Bereich besteht, ist zu vermuten, dass dieser Teil des Proteins in Gliazellen für die Rekrutierung von Mbc-PB zur Membran bzw. zum Leitsaum wichtig ist.

### 4.3.2. Phosphorylierung von Mbc/DOCK1

Mehrere Arbeiten zeigen, dass die Aktivität von DOCK1 in Gliomzelllinien über Phosphorylierung reguliert wird (zusammengefasst in Abb. 4.1). Beispielsweise scheint für die Aufhebung der Autoinhibition zwischen der SH3- und der DHR2-Domäne sowohl die Phosphorylierung an einem Tyrosin (Y722) als auch an einem Serin (S1250) notwendig zu sein. Die beiden Aminosäuren werden von unterschiedlichen Kinasen phosphoryliert. Y722 von *Src family kinases* (SFK) (Feng et al., 2012). S1250 dagegen von Proteinkinase A (PKA) (Feng et al., 2013). Beide Kinasen können wiederum von dem Transmembranrezeptor Egfr aktiviert werden, der in Gliomen oft in einer mutanten Form auftritt (EgfrvIII). Bei dieser Form fehlt ein Teil der Ligandenbindedomäne, was zu einem konstitutiv aktiven Signal des Rezeptors führt und zu einer erhöhten Migration der Glioblastomzellen. Ein weiteres Tyrosin am C-Terminus des Proteins (Y1811) kann von Src phosphoryliert werden, das wiederum vom Transmembranrezeptor PDGFR $\alpha$  aktiviert wird. Die Phosphorylierung am prolinreichen C-Terminus fördert die Bindung von DOCK1 an Crk und p130<sup>Cas</sup> (Feng et al., 2011).



**Abb. 4.1: Phosphorylierungsstellen von DOCK1**

Schematische Darstellung von DOCK1, markiert sind die einzelnen Domänen innerhalb des Proteins (SH3, DHR1, DHR2 und PxxP), drei bekannte Phosphorylierungsstellen (Y722, S1250 und Y1811), sowie die Signalwege, die zur Phosphorylierung an diesen Stellen führen.

In den zu DOCK1 orthologen Genen, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, ist lediglich die Phosphorylierungsstelle in der DHR2-Domäne konserviert (S1250 bei DOCK1), teilweise ist das Serin durch ein Threonin getauscht oder die Phosphorylierungsstelle ist um zwei Aminosäuren verschoben (die konservierten Aminosäuren sind in Anhang 10 in magenta markiert). Y722 und Y1811 (Anhang 10, rot bzw. blau markiert) sind dagegen lediglich in einzelnen Spezies konserviert. Passend zur Theorie, dass PKA durch die Phosphorylierung



von S1250 in DOCK1 (T1294 in Mbc-PA bzw. T1332 in Mbc-PB) die Autoinhibition zwischen SH3- und DHR1-Domäne teilweise aufhebt, zeigt die Analyse einer *Pka-C1* Mutante eine signifikante Vergrößerung der Distanz zwischen Ich und ePG9 im Vergleich zum WT, also möglicherweise eine Reduzierung der Aktivität von Mbc. Zudem ergab die *in silico* Analyse mit der Software *NetPhosK 1.0*, die anhand der Umgebungssequenz die Wahrscheinlichkeit für die Phosphorylierung von Aminosäuren bestimmt, das PKA eine mögliche Kinase ist, die T1294 phosphoryliert. Das bedeutet, auch bei der Migration der ePG könnte die Autoinhibition von Mbc-PB durch die Phosphorylierung von Threonin (T1332) durch Pka-C1 geschwächt bzw. teilweise aufgehoben werden. Innerhalb der DHR-2-Domäne von Mbc gibt es insgesamt vier weitere Threonine und drei weitere Serine, die in allen oder fast allen untersuchten Spezies konserviert sind (Anhang 10, grau markiert). Theoretisch könnte die Phosphorylierung an einer oder mehreren dieser Aminosäuren ebenfalls an der Aufhebung der Autoinhibition beteiligt sein.

#### **4.3.3. Phosphorylierung innerhalb von Exon 9**

Im Gegensatz zu den Phosphorylierungsstellen, die bisher für DOCK1 beschrieben wurden, und deren Phosphorylierung positiv auf die Aktivität von Mbc/DOCK1 wirkt, scheint die Phosphorylierung innerhalb des von Exon 9 kodierten Bereichs Mbc-PB zu inaktivieren. Zumindest deuten Experimente darauf hin, bei denen phosphomutante Formen von Mbc-PB in allen Gliazellen überexprimiert wurden. Insgesamt wurden drei verschiedene phosphomutante Konstrukte getestet, wobei ein einzelnes Serin, zwei benachbarte Threonine oder alle drei Aminosäuren zu Alaninen mutiert wurden. Interessanterweise macht es keinen Unterschied, welche phosphomutante Form für die Überexpression benutzt wird. In allen Fällen wird die Übermigration von ePG9 verstärkt. D. h. das Fehlen einer einzigen Phosphorylierungsstelle führt zu einer Art konstitutiv aktiver Form von Mbc-PB. Da die beiden benachbarten Threonine nicht einzeln analysiert wurden, ist unklar ob für die Inaktivierung von Mbc-PB beide Aminosäuren phosphoryliert werden müssen oder nur eine als Phosphorylierungsstelle dient. Um das herauszufinden, müssten weitere phosphomutante Konstrukte getestet werden, bei denen jeweils nur eine der beiden Aminosäuren mutiert ist. Um zu überprüfen, ob Mbc-PB tatsächlich durch Phosphorylierung an den drei untersuchten Aminosäuren inaktiviert wird, könnte zudem ein pseudophosphomutantes Konstrukt hilfreich sein. Dabei werden die phosphorylierbaren Aminosäuren, S905, T935 und T936, durch jeweils eine Glutaminsäure ersetzt, um die negative Ladung der Phosphatgruppen zu simulieren. Mbc-PB wäre also durch die vermeintliche „Phosphorylierung“ dauerhaft inaktiv und die ektopische Überexpression dieses Konstrukts sollte somit keinen Einfluss auf die Migration der ePG haben. Theoretisch könnte es auch noch zusätzliche Phosphorylierungsstellen geben, die für die Inaktivierung

von Mbc-PB notwendig sind, z. B. S 928 oder T 932. Beide Aminosäuren sind in fast allen Dipteren konserviert.

Ein vielversprechender Kandidat für die Modifikation der analysierten Phosphorylierungsstellen und der damit verbundenen Inaktivierung von Mbc-PB scheint die Kinase Wnd zu sein. Das zeigt zum einen die Analyse der *wnd* Mutanten, bei denen ePG9 über die wildtypische Position hinaus migriert. Zum anderen die gliale Überexpression von Wnd, die zu Migrationsdefekten bei ePG9 führt. Bei Wnd handelt es sich um eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAP3K). In dieser sehr heterogenen Gruppe werden Kinasen zusammengefasst, die MAP-Kinase-Kinasen (MAP2K) durch Phosphorylierung aktivieren. Dabei werden 2 Serine oder Threonine innerhalb einer Aktivierungsschleife phosphoryliert. Wnd ist ortholog zu den humanen Kinasen MAP3K12 und MAP3K13, die beide zur Gruppe der *mixed-lineage kinases* (MLKs) gehören. Innerhalb dieser Gruppe bilden die beiden die Untergruppe der *double leucine-zipper domain kinases* (DLK), die zusätzlich zur katalytischen Domäne zwei *Basic Leucine Zipper* (bZIP) Domänen enthalten. Über diese charakteristischen Domänen können die DLKs Homodimere oder Heterodimer mit anderen MLKs bilden und somit aktiviert werden. Da die gliale Überexpression von Wnd ausreicht um die Migration von ePG9 zu hemmen scheint Wnd die Aktivität von Mbc-PB als Homodimer und damit unabhängig von anderen MLKs zu regulieren. Analog zur Phosphorylierung innerhalb der Aktivierungsschleife bei den MAP2Ks könnte auf diese Weise sowohl das S905 als auch eins der beiden Threonine (T935 oder T936) phosphoryliert werden. Somit kann auch erklärt werden, warum für die Inaktivierung von Mbc-PB die Phosphorylierung an zwei Aminosäuren notwendig ist. Weitere Experimente könnten Aufschluss darüber geben, ob Wnd tatsächlich Teil eines Signalwegs ist, an dessen Ende die Phosphorylierung von Mbc-PB innerhalb des von Exon 9 kodierten Bereichs steht. Dazu sollte Wnd zusammen mit den phosphomutanten Formen von Mbc-PB in allen Gliazellen coexprimiert werden. Wenn in diesem Fall die Übermigration von ePG9 nicht beeinflusst wird, spricht das für eine von Wnd abhängige Phosphorylierung von Mbc-PB. Wird dagegen der Effekt, der durch die Expression der phosphomutanten Formen von Mbc-PB hervorgerufen wird durch die Coexpression von Wnd abgeschwächt, deutet das auf einen alternativen von Mbc-PB unabhängigen Signalweg hin. Um zu untersuchen, ob Wnd Mbc-PB direkt phosphoryliert, könnten weitere Experimente in Zellkultur durchgeführt werden. Dazu müsste in einem Ansatz Mbc-PB alleine exprimiert werden und in einem zweiten Ansatz Wnd und Mbc-PB zusammen. Durch einen Westernblot könnte mit Hilfe von Antikörper gegen Phosphoserin und Phosphothreonin der Phosphorylierungsstatus von Mbc-PB mit und ohne Wnd untersucht werden. Ob es zu direkter Interaktion zwischen Mbc-PB und Wnd kommt, könnte z. B mit Hilfe des *Yeast Two-Hybrid System* oder durch Immunpräzipitations-Experimente untersucht werden.

#### 4.3.4. Ubiquitinierung von Mbc und Abbau durch das Proteasom

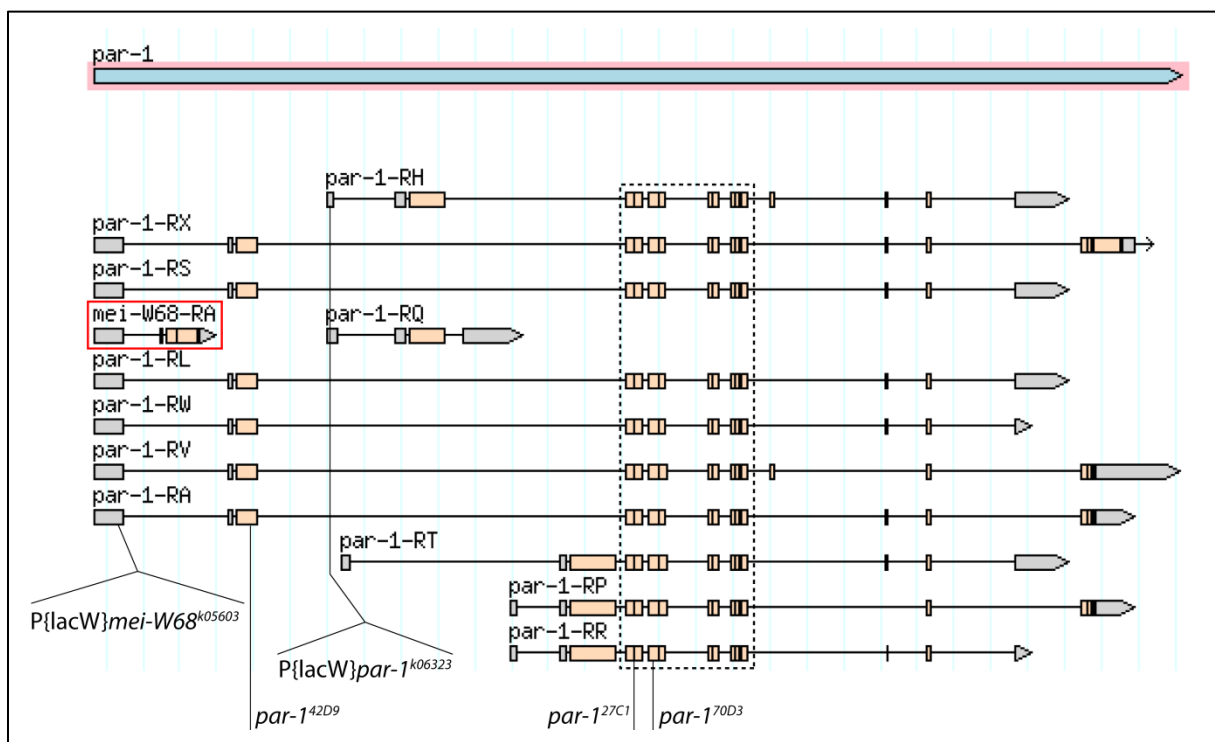
In Zellkultur konnte gezeigt werden, dass DOCK1 nach der Rekrutierung an die Plasmamembran ubiquitiniert und anschließend über das Proteasom abgebaut wird. Dieser Schritt kann allerdings durch die direkte Bindung von Elmo1 an DOCK1 inhibiert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der Zellen mit extrazellulären Faktoren wie *epidermal growth factor* (EGF) oder Fibronectin, einem Glykoprotein der extrazellulären Matrix, zu einer erhöhten Rekrutierung von DOCK1, vermittelt über Crk, an die Plasmamembran führt. Beide Faktoren sorgen zudem für eine verstärkte Ubiquitinierung von DOCK1 (Makino et al., 2006). Die Stimulation mit Fibronectin führt zusätzlich zu verstärkter Phosphorylierung von DOCK1, die Stimulation mit EGF dagegen nicht (Kiyokawa et al., 1998). EGF scheint also die Ubiquitinierung von DOCK1, nicht jedoch die Phosphorylierung von DOCK1 zu beeinflussen, könnte also z. B. für die Aktivierung einer membrangebundenen Ubiquitinligase (E3-Ligase) wichtig sein. Meine eigenen Experimente zeigen, dass die Coexpression von dominant negativen Formen von Egfr und Pvr in allen Gliazellen zur Übermigration von ePG9 führt. Diese Ergebnisse stehen damit im Gegensatz zu der Erkenntnis, dass diese beiden Rezeptoren in humanen Glioblastomazellen zu einer verstärkten Phosphorylierung von DOCK1 und damit zu einer verstärkten Zellmigration führen (Feng et al., 2011, Feng et al., 2012, Feng et al., 2013). In *D. melanogaster* scheint vielmehr die Stimulation von EGF durch die dominant negative Form des Egfr unterbrochen zu sein, was zu einer verminderten Ubiquitinierung von Mbc führt. Somit kommt es zu einem verzögerten Abbau und das Protein bleibt länger an der Plasmamembran. In *D. melanogaster* gibt es insgesamt vier zu EGF homologe Liganden: Keren (Krn), Spitz (Spi), Vein (Vn) und Gurken (Grk), wobei Krn und Spi in die Migration der *border cells* involviert sind (McDonald et al., 2006). Ob und in wie weit einer dieser Faktoren bei der Migration der ePG eine Rolle spielt, muss allerdings durch weitere Experimente untersucht werden. Beispielsweise könnten Mutanten der einzelnen Faktoren auf gliale Migrationsdefekte hin untersucht werden. Eine weitere Möglichkeit um zu untersuchen, inwieweit Ubiquitinierung bei der Migration der ePG eine Rolle spielt, wäre der gezielte *knock-down* von Ubiquitin oder von glial exprimierten E3-Ligasen. Falls die Aktivität von Mbc-PB tatsächlich auf diese Weise reguliert wird, müsste in diesem Fall eine Übermigration von ePG9 zu beobachten sein. Außerdem könnte mit Mbc, das ektopisch in Gliazellen exprimiert wurde, Westernblots durchgeführt werden und mit Hilfe eines Antikörpers gegen Ubiquitin die Ubiquitinierung von Mbc in Gliazellen analysiert werden.

Insgesamt zeigt sich, dass Mbc/DOCK1 durch eine Vielzahl von Proteinen modifiziert werden kann, was Auswirkungen auf die katalytische Aktivität, die Lokalisierung sowie die Stabilität des Proteins hat. Jede dieser Modifikationen hat Einfluss auf die Aktivität des Proteins, letztendlich wird Mbc/DOCK1 so, als Teil eines Netzwerkes, auf mehreren Ebenen reguliert.

#### 4.4. Die Kinase Par-1 ist vermutlich unabhängig von Mbc in die Migration der ePG involviert

Im Gegensatz zu den verschiedenen *wnd* Mutanten liegt bei einer der beiden analysierten *par-1* Mutanten ePG9 signifikant weiter vom Ich entfernt als im WT. Verschiedene Arbeiten zeigen, dass Par-1 an der Ablösung der *border cells* aus den umgebenden Zellen zum Beginn der Migrationsphase beteiligt ist und in diesem Fall für die Aktivierung von nicht-muskulärem Myosin II (NMII) verantwortlich ist (McDonald et al., 2008, Majumder et al., 2012). In Vertebraten gibt es mehrere zu *par-1* orthologe Gene (MARKs), die für die Regulation der Mikrotubuli durch Phosphorylierung von assoziierten Proteinen wie z. B. tau verantwortlich sind (Drewes et al., 1997). Durch *knock-down* Experimente in Zelllinien von *D. melanogaster* konnte wiederum Einfluss von Par-1 auf Aktinfilamente und Mikrotubuli gezeigt werden (Kiger et al., 2003). Interessanterweise zeigt nur eine von zwei untersuchten *par-1* Mutanten bei der Migration der ePG einen Phänotyp. Bei beiden verwendeten Allelen handelt es sich um P-Element-Insertionen im *par-1* Locus, wobei das P-Element im Fall von *par-1<sup>K05603</sup>*, das keinen Phänotyp zeigt, im 5'-UTR von insgesamt 6 *par-1* Isoformen und dem Gen *mei-W68* (Abb. 4.2, rote Box) liegt (P(lacW)*mei-68<sup>K05603</sup>*). Das P-Element des zweiten Allels dagegen liegt im 5'-UTR der beiden Isoformen *par-1-RH* und *par-1-RQ* (P(lacW)*par-1<sup>K06323</sup>*). Insgesamt sind bisher 11 Isoformen für *par-1* annotiert, 10 davon stimmen in allen zentralen Exons überein (Abb. 4.2, gestrichelte Box). Diese Exons kodieren zum einen für die katalytische Kinasedomäne, zum anderen für eine *Ubiquitin-associated/translation elongation factor EF1B*-Domäne. Fast alle der übrigen Exons können alternativ gespleißt werden. In den bisherigen Arbeiten wurde Par-1 durch *knock-down* Experimente herunter reguliert, wobei allerdings immer alle Isoformen ausgeschaltet wurden (McDonald et al., 2008, Majumder et al., 2012). Da die P-Elemente in den untersuchten Allelen jeweils im 5'-UTR unterschiedlicher Isoformen liegen, lässt sich vermuten, dass für die Migration der ePG die Isoform *par-1-RH* bzw. *par-1-RQ* benötigt wird, da die Insertion des P-Elements in den 5'-UTR dieser Isoformen einen Migrationsphänotyp hervorruft. Da die Isoform *par-1-RQ* über keine katalytische Domäne verfügt, scheint *par-1-RH* hier von entscheidender Bedeutung zu sein. Um das genauer zu untersuchen, sollten weitere Allele auf gliale Migrationsdefekte hin analysiert werden. Zur Verfügung stehen zum einen *par-1<sup>42D9</sup>* mit einem im dritten Exon der Isoformen, die vermutlich keine Rolle bei der glialen Wanderung spielen (McDonald et al., 2008). Bei dieser Mutante sollte die Migration der ePG nicht beeinträchtigt sein. Zum anderen sind zwei Allele mit Mutationen in der zentralen Kinasedomäne beschrieben. Bei dem Allel *par-1<sup>27C1</sup>* ist die 5' Spleißstelle des zweiten zentralen Exons mutiert (GT->AT) und bei *par-1<sup>70D3</sup>* tritt ein Stopcodon in der Kinasedomäne auf (McDonald et al., 2008). Da in diesem Fall alle Isoformen mit Kinasedomäne betroffen sind, sollten gliale Migrationsdefekte auftre-

ten. Es sei denn die Isoform *par-1-RQ* ist in die gliale Migration involviert. Um zu überprüfen ob Par-1 zellautonom auf die Migration der ePG wirkt, könnten isoformspezifische *knock-down* Experimente oder gliale Überexpressionen einzelner *par-1* Isoformen durchgeführt werden. Vermutlich nimmt Par-1 auch bei der glialen Migration auf die bereits bekannten Faktoren wie NMII oder Mikrotubuli Einfluss, die wahrscheinlich auch bei der glialen Migration eine Rolle spielen. Demnach ist Par-1 vermutlich nicht an der Phosphorylierung von Mbc-PB beteiligt, stellt jedoch dennoch einen interessanten Kandidaten für weiter Forschungen da.



**Abb. 4.2: *par-1* Genlokus**

Schematische Darstellung des *par-1* Genlokus. Dargestellt sind die 11 Isoformen von *par-1*, sowie das Transkript von *mei-W68* (rote Box). Alle Isoformen, außer *par-1-RQ*, verfügen über die gleichen Exons im zentralen Bereich (gestrichelte Box), fast alle übrigen Exons können alternativ gespleißt werden. Außerdem ist die Insertionsstelle der P-Elemente bei den beiden Allelen *par-1*<sup>k05603</sup> und *par-1*<sup>k06323</sup>, sowie die Position der Mutationen der Allele *par-1*<sup>42D9</sup>, *par-1*<sup>27C1</sup> und *par-1*<sup>70D3</sup> angegeben.

## 4.5. Interaktionspartner von Mbc-PB

### 4.5.1. Die Rolle von Rac1 bei der Migration der ePG

Die Migration von Zellen ist ein äußerst komplexer Vorgang, der mit einer stetigen Reorganisation des Aktinzytoskellets einhergeht. Eine zentrale Rolle nehmen dabei Rho1, Rac1 und Cdc42 ein, die alle zu den kleinen GTPasen der Rho-Familie zählen (Nobes and Hall, 1995).

Arbeiten von K. Sepp und V. Auld zeigen, dass Rho1 (RhoA) und Rac1 auch in die Migration der ePG involviert sind, Cdc42 allerdings keine Rolle spielt (Sepp and Auld, 2003). Die Autoren exprimieren, um sekundäre Effekte zu vermeiden, konstitutiv aktive und dominant negative Formen von Rac1 und Rho1 in allen Gliazellen, wobei die ektopische Expression der konstitutiv aktiven Formen in beiden Fällen einen sehr viel stärkeren Effekt auf Migration und Morphologie der ePG hat, als die Expression der dominant negativen Form. Problematisch ist, dass die Analyse der auftretenden Phänotypen lediglich auf der Morphologie der ePG, visualisiert durch das Aktinzytoskelet, beruht. Somit kann die genaue Position einzelner ePG nicht ermittelt werden. Außerdem wurde das Zytoskelet aller ePG gleichzeitig visualisiert, was es unmöglich macht, die Morphologie einzelner ePG zu analysieren. Im Rahmen dieser Arbeit war die Funktion von Rac1 als Substrat von Mbc von besonderem Interesse. Rac1 aktiviert eine Vielzahl von Faktoren, die an der Polymerisation von Aktin beteiligt sind, darunter auch SCAR, welches wiederum den Arp2/3 Komplex aktiviert (Zallen et al., 2002). Letztendlich führt dieser Signalweg zur Verzweigung und Verlängerung der Aktinfilamente. Von mir durchgeführte Experimente mit der dominant negativen Form von Rac1 (Rac1.N17) zeigen jedoch, dass keinesfalls alle ePG gleichermaßen auf Rac1.N17 reagieren. Bei der Expression in allen ePG mit der Treiberlinie *gcm>nGFP* wird z. B. die Migration der beiden Zellen ePG4 und ePG10 nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse lassen sich mit Hilfe des Treiberstamms Mz97-Gal4 reproduzieren. Bei dieser Treiberlinie exprimieren ebenfalls ePG4 und ePG10 Rac1.N17, zeigen jedoch keine Migrationsdefekte und sind an ihren typischen Positionen an den peripheren Nerven zu finden. Die ektopische Expression der konstitutiv aktiven Form von Rac1 (Rac1.V12) in allen ePG führt dagegen zu starken Migrationsdefekten in allen positiven Zellen. Wobei es scheint, dass auch ePG4 und ePG10 betroffen sind (Sepp and Auld, 2003). Allerdings zeigt dieses Experiment meiner Meinung nach nicht, dass Rac1 in die Migration dieser ePG involviert ist, sondern lediglich, dass Faktoren, die von Rac1 aktiviert werden können, wie z. B. SCAR an der Migration beteiligt sind. Sowohl für SCAR als auch das orthologe Protein WAVE1 konnte allerdings gezeigt werden, dass es unabhängig von Rac1 z. B. durch das Adapterprotein NCK adaptor protein 1 (*dreadlocks (dock)* in *D. melanogaster*) aktiviert werden kann (Eden et al., 2002, Kaipa et al., 2013). Ein solcher alternativer Signalweg wird natürlich durch die ektopische Expression von konstitutiv aktivem Rac1 völlig überdeckt. Da ePG4 und ePG10 nur auf die Expression von Rac1.V12, nicht aber auf Rac1.N17 reagieren, wird SCAR in diesen Zellen anscheinend von einem zu Rac1 alternativen bzw. von einem redundanten aber von Rac1 unabhängigen Faktor aktiviert. *dock* Mutanten wurden bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit analysiert, wobei keine Migrationsdefekte gefunden wurden (Daten nicht gezeigt), was eher für eine redundante Funktion von Rac1 und Dock bei der Migration von ePG4 und ePG10 spricht. Die Analyse von *Rac1/dock* Doppelmutanten könnte hier genauere Einblicke liefern. Im Unterschied zu ePG4

und ePG10 wird die Migration aller ePG distal von ePG4 durch die Expression von Rac1.N17 mit der Treiberlinie *gcm-Gal4* beeinflusst. Derselbe Phänotyp tritt auch auf, wenn die ektopische Expression von Rac1.N17 auf ePG7 begrenzt ist. Die Migration von ePG7 wird also direkt von Rac1.N17 beeinflusst, was dafür spricht, dass in dieser einen Zelle Rac1 entscheidend an der Migration beteiligt ist und Faktoren wie z. B. SCAR aktiviert. Anscheinend liegen in diesem Fall keine redundanten Faktoren vor, die diese Aufgabe übernehmen können. Die Migrationsdefekte von ePG6, ePG8 und ePG9 treten dagegen auf, obwohl keine dieser Zellen Rac1.N17 exprimiert, d. h. es handelt sich um sekundäre Effekte.

Insgesamt zeigen die von mir durchgeführten Experimente, dass Rac1 lediglich in die Migration von ePG7 involviert ist. In allen übrigen ePG scheinen alternative Signalwege für die Reorganisation des Aktinzytoskellets während der Migration genutzt zu werden.

#### **4.5.2. Die Rolle von Ced-12 bei der glialen Migration**

Bei Ced-12 bzw. dem orthologe Protein Elmo1 handelt es sich um ein *scaffold* oder Gerüst-Protein ohne eigene katalytische Aktivität, das über seinen prolinreichen C-Terminus mit der SH3-Domäne von Mbc/DOCK1 interagieren kann. Bisher ist umstritten, ob Ced-12 für die Aktivierung von Rac1 notwendig ist. Experimentell konnte zwar gezeigt werden, dass DOCK1 bzw. sogar die DHR1-Domäne alleine sowohl *in vitro* als auch *in vivo* für die Aktivierung von Rac1 ausreichend ist, d. h. GDP durch GTP ausgetauscht wird (Côté and Vuori, 2002), allerdings zeigen andere Arbeiten, dass Elmo1 einen Komplex mit DOCK1 und dem Nukleotid-freien Rac bildet, um so Rac zu aktivieren (Lu et al., 2004). Außerdem wurde in mehreren Publikationen gezeigt, dass Mbc nur im Komplex mit Ced-12 aktiv ist, z. B. ist die Migration der *border cells* in *elmo*<sup>KO</sup> Mutanten stark eingeschränkt (Bianco et al., 2007). Außerdem führt die Coexpression von Mbc und Ced-12 im Mesoderm, aus dem sich die Muskeln entwickeln, zu Defekten bei der Myoblastenfusion, die Überexpression der einzelnen Faktoren jedoch nicht (Geisbrecht et al., 2008). Für die orthologen Proteine DOCK1 und Elmo1 konnte zudem gezeigt werden, dass im Zellkultursystem eine Coexpression der beiden Faktoren zu verstärkter Migration führt, Expression der einzelnen Faktoren jedoch nicht (Grimsley et al., 2004). In diesem Zusammenhang ist es wichtig zwischen der katalytischen Funktion von Mbc/DOCK1, d. h. dem Austausch von GDP zu GTP bei Rac1 und der Funktionalität auf zellulärer Ebene zu unterscheiden. Bei der Zellmigration ist es z. B. sehr wichtig, das Rac1 nur am Leitsaum (*engl. leading edge*) aktiviert wird, damit die Zelle in eine bestimmte Richtung wandert. Für die oben genannten Beispiele würde das bedeuten, dass Mbc/DOCK1 Rac1 auch ohne die Hilfe von Ced-12/Elmo1 aktivieren kann, allerdings fehlt die subzelluläre Lokalisierung, weshalb es zu keiner Reaktion kommt. Dafür sprechen einige Arbeiten, die zeigen, dass Elmo für die Rekrutierung von DOCK1 an die Plasmamembran

benötigt wird, z. B. über die Bindung an RhoG (*Rho-like* in *D. melanogaster*) (Katoh and Negishi, 2003) oder Arf6 (*ADP ribosylation factor at 51F (Arf51F)* in *D. melanogaster*) (Santy et al., 2005). In anderen Arbeiten wird eine Autoinhibition von DOCK1, hervorgerufen durch eine intramolekulare Bindung der SH3- mit der DHR1-Domäne, diskutiert, die durch die Bindung von Elmo an die SH3-Domäne aufgehoben wird (Lu et al., 2005). Zusätzlich verhindert, wie bereits beschrieben, die Bindung von Elmo1 an DOCK1 die Ubiquitinierung von DOCK1 und den anschließenden Abbau durch das Proteasom (siehe Kapitel: 4.3.4).

Die von mir durchgeführten *knock-down* Experimente zeigen eindeutig, dass *Ced-12* an der Migration der ePG beteiligt ist. Dabei kann diese Funktion sowohl von der maternalen als auch von der glialen Komponente übernommen werden, da nur die Reduzierung beider zu einem signifikanten Effekt führt. Allerdings führt, anders als bei der Muskelentwicklung, die ektopische Expression von Mbc-PB alleine, zur Übermigration der Pionierglia ePG9. D. h. entweder kann Mbc-PB während der glialen Migration Rac1 ohne die Hilfe von Ced-12 aktivieren oder Ced-12 ist in den Gliazellen im Überschuss vorhanden. Für die zweite Alternative spricht, dass es erst durch den *knock-down* der maternalen und der zygotischen Komponente zu glialen Migrationsdefekten kommt. Eine mögliche Funktion von Ced-12 während der glialen Migration könnte die Verstärkung der katalytischen Aktivität von Mbc-PB sein, z. B. über die Stabilisierung eines Komplexes zwischen Mbc-PB und einem Nukleotid-freien Rac1 oder über die Aufhebung der Autoinhibition. Außerdem könnte Ced-12 die Ubiquitinierung von Mbc-PB an der Plasmamembran und den damit verbundenen Abbau durch das Proteasom verhindern (siehe Kapitel: 4.3.4). Interessant wäre es hier zu überprüfen, ob die Coexpression von Mbc-PB und Ced-12 die Übermigration von ePG9 verstärkt oder ob die glialen Migrationsdefekte in den *Ced-12 knock-down* Experimenten durch Mbc-PB gerettet werden können.

#### 4.6. Funktion der HEAT-repeats

HEAT-repeats wurden zunächst in sehr unterschiedlichen Proteinen identifiziert, von denen sich auch der Name ableitet. Im Einzelnen sind das Huntingtin, elongation factor 3 (EF3), PPP2R1A (eine Untereinheit der Proteinphosphatase A) und TOR1 (Andrade and Bork, 1995). Später wurde diese Struktur beispielsweise auch bei Importin-β1 und -β2 gefunden. Für die beiden letztgenannten Proteine konnte zudem eine molekulare Funktion beschrieben werden. Die HEAT-repeats von Importin-β1 interagieren mit Importin-α (Cingolani et al., 1999), die von Importin-β2 dagegen mit dem kleinen G-Protein Ran (Chook and Blobel, 1999). In der Proteindatenbank *Interpro* (EMBL-EBI) wird als Funktion der HEAT-repeats allgemein Proteinbindung angegeben. Mbc-PB könnte demnach über den von Exon 9 kodierten Bereich, der Bestandteil zweier benachbarter HEAT-repeats ist, mit anderen Proteinen

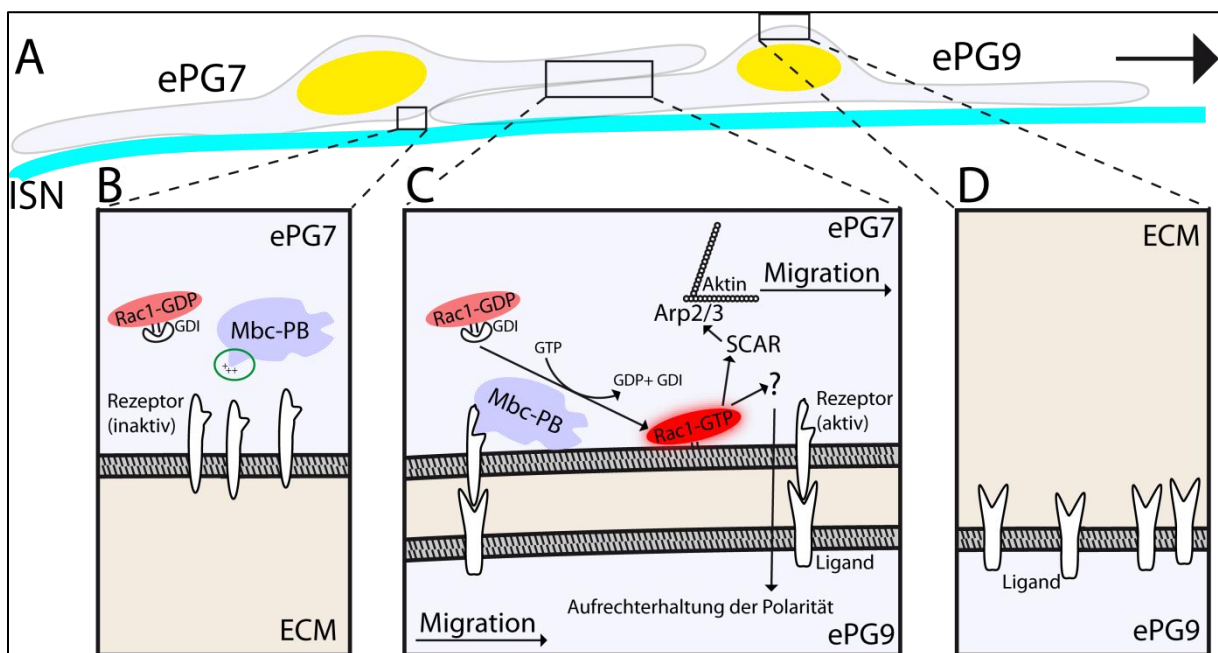


interagieren. Über diese Interaktion könnte Mbc-PB an die Membran rekrutiert werden und dort Rac1 aktivieren. Mbc-PA, das diese Interaktion nicht eingehen kann, würde dagegen nicht an die Membran rekrutiert werden und bliebe somit inaktiv. Das würde erklären, warum lediglich die Überexpression von Mbc-PB, jedoch nicht von Mbc-PA, zu einer Übermigration von ePG9 führt. Um herauszufinden, um welchen Interaktionspartner es sich dabei handelt, könnte das *Yeast Two-Hybrid System* genutzt werden, um Proteininteraktion zwischen den HEAT-*repeats* von Mbc-PB und verschiedenen Transmembranproteinen oder Adapterprotein zu untersuchen. Ebenfalls interessant wäre es zu untersuchen, welche Aminosäuren innerhalb des von Exon 9 kodierten Bereichs für Proteininteraktion wichtig sind. Ein besonderer Fokus sollte dabei auf den drei positiv geladenen Aminosäuren liegen, die in allen untersuchten Arthropoden vorkommen. Eine Möglichkeit dies zu untersuchen, wären mutante UAS-Konstrukte, bei denen eine oder mehrere dieser Aminosäuren gegen ungeladene oder negativ geladene Aminosäuren ausgetauscht wurden. Falls dieser Bereich wichtig für die Interaktion mit anderen Proteinen ist, sollte bei einer Überexpression in Gliazellen keine Übermigration von ePG9 auftreten.

#### **4.7. Modell des Signalwegs zwischen ePG7 und ePG9**

Durch verschiedene Experimente wie z. B. Laserablation (Altenhein et al., in Vorbereitung) oder die ektopische Expression von Rho1.V14 konnte gezeigt werden, dass ePG9 als Pionierglia die Migration von ePG7 leitet. Da die beiden Zellen während der gesamten Migrationsphase in direktem Kontakt miteinander stehen, wird das Signal zwischen den Zellen vermutlich über Transmembranproteine vermittelt. Wie sich zudem durch die verschiedenen *knock-down* Experimente, bei denen *mbc* herunter reguliert wurde, und die Rettungsexperimente mit Mz97>CD4::tdGFP gezeigt hat, spielt Mbc-PB lediglich bei der Migration von ePG7 eine Rolle. Passend dazu reagiert ePG7 auch auf die ektopische Expression von Rac1.N17, dem Substrat von Mbc-PB, wohingegen die Migration der übrigen ePG davon nicht beeinflusst wird. Wie bereits diskutiert, ist die Aktivität von Mbc u. a. abhängig von der Rekrutierung an die Plasmamembran (Kapitel: 4.3.1). Zudem ist die Lokalisierung von Mbc im vorderen Teil der Zelle notwendig, um dort gezielt, über die Aktivierung von Rac1, die Reorganisation des Aktinzytoskelllets zu steuern und so eine gerichtete Migration zu ermöglichen. Die Lokalisierung von Mbc-PB könnte relativ einfach über ein System gesteuert werden, dass aus einem in der Membran verankertem Liganden auf der Seite von ePG9 und einem Transmembranrezeptor auf Seite von ePG7 besteht. Im hinteren Bereich von ePG7, der nicht mit ePG9 interagiert, ist der Rezeptor inaktiv, da kein Ligand vorhanden ist (Abb. 4.3B). Mbc-PB liegt hier im Zytoplasma vor und ist nicht aktiv. Im vorderen Bereich von ePG7, der mit ePG9 interagiert, kann der Rezeptor an den Liganden binden und wird durch

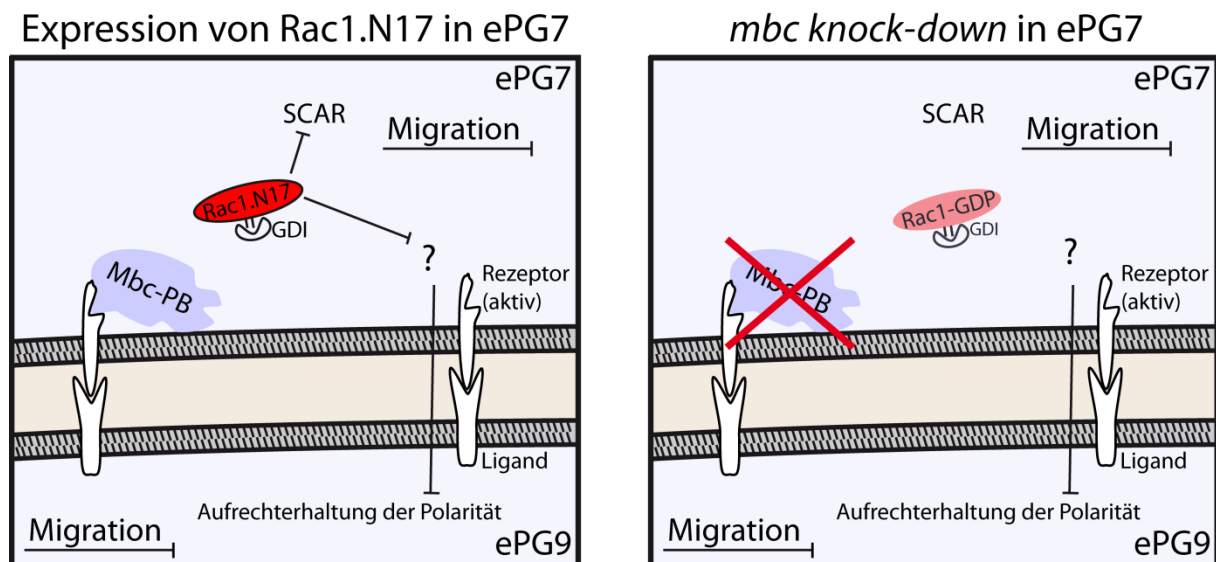
eine Konformationsänderung aktiviert (Abb. 4.3C). Durch die Aktivierung wird eine Bindestelle zugänglich, an die Mbc-PB über die im Vergleich zu Mbc-PA veränderten HEAT-repeats binden kann, zumindest würde das erklären, warum Mbc-PA während der Migration der ePG keine Funktion zeigt. Alternativ könnte Mbc-PB auch über ein Adapterprotein rekrutiert werden. Die Bindung zwischen Mbc-PB und dem Rezeptor bzw. dem Adapter könnte über ionische Bindungen zwischen den konservierten positiv geladenen Aminosäuren der ersten  $\alpha$ -Helix des von Exon 9 kodierten Bereichs und negativ geladenen Aminosäuren des Rezeptors/Adapters stabilisiert werden. Auf diese Weise wird Mbc-PB an die Plasmamembran rekrutiert und gleichzeitig am vorderen Ende der Zelle lokalisiert. Nach der Rekrutierung kann Mbc-PB Rac1, das im inaktiven Zustand GDP gebunden hat und in einem Komplex mit einem *GDP Dissociation Inhibitor* (GDI) vorliegt, aktivieren. Dazu wird das gebundene GDP durch GTP ausgetauscht, worauf der GDI von Rac1 dissoziiert. Auf diese Weise wird der Geranylgeranylrest von Rac1 freigegeben und Rac1 an die Membran rekrutiert. An der Membran kann Rac1 wiederum über Faktoren wie SCAR und Arp2/3 die Polymerisation von Aktin fördern und damit letztlich die Zelle weiter migrieren lassen (Abb. 4.3C).



**Abb. 4.3: Modell für den Signalweg zwischen ePG9 und ePG7**

(A) Schematisch Darstellung von ePG7 und ePG9. (B-D) Ausschnitte aus verschiedenen Bereichen der beiden Zellen. Die Faktoren die im Fokus dieser Arbeit stehen sind farbig dargestellt (Mbc-PB in blau und Rac1 in rot). (B) In dem Bereich von ePG7, der nicht in Kontakt zu ePG9 steht, liegt der Rezeptor inaktiv vor und Mbc-PB kann mit dem von Exon 9 kodierten Bereich (grün markiert) nicht an den Rezeptor binden. (C) Im Bereich, in dem ePG7 und ePG9 in Kontakt stehen, kann der Rezeptor auf Seite von ePG7 an den Liganden in der Membran von ePG9 binden. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung und Mbc-PB kann mit dem von Exon 9 kodierten Bereich an den Rezeptor binden und wird an die Membran rekrutiert. An der Membran kann Mbc-PB Rac1 aktivieren, was zu einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts in diesem Bereich der Zelle führt. Vermutlich führt die Aktivierung von Rac1, über einen noch unbekanntem Signalweg zur Aufrechterhaltung der Polarität in ePG9. (D) Der Ligand ist über die gesamte Oberfläche von ePG9 verteilt.

Die Migration von ePG9 verläuft dagegen unabhängig von Mbc-PB, wird allerdings durch Migrationsdefekte von ePG7 beeinflusst. Das zeigen Experimente, bei denen nur in ePG7 entweder eine dominant negative Form von Rac1 (Rac1.N17) exprimiert oder Mbc-PB durch RNAi ausgeschaltet wurde (zusammengefasst in Abb. 4.4). In beiden Fällen wird die Migration von ePG7 gestoppt, zudem bleibt aber ePG9 hinter ihrer wildtypischen Position zurück. Daher muss es ein zweites reziprokes Signal geben, das ausgehend von ePG7 die Migration von ePG9 beeinflusst. Ausgehend von aktiviertem Rac1 in ePG7 könnte dieser noch unbekanntes Signalweg z. B. an der Aufrechterhaltung der Zellpolarität in ePG9 beteiligt sein (Abb. 4.3C). Das würde zumindest erklären, warum in der *mbc* Mutante die Position von ePG7 und ePG9 zueinander sehr variabel ist und von komplett getrennt bis zu sehr eng nebeneinander positioniert reicht. Hier würde zunächst die Migration von ePG7, da sie abhängig von Mbc-PB bzw. Rac1 verläuft, stoppen. ePG9 dagegen kann unabhängig von Mbc-PB und Rac1 migrieren. Infolgedessen verlieren die beiden Zellen ihren Kontakt und das damit verbundene reziproke Signal. Durch den anschließenden Verlust ihrer Polarität stoppt ePG9 ebenfalls ihre Migration und wandert teilweise zurück in ventrale Richtung, um erneut Kontakt mit ePG7 aufzunehmen. Ähnliches wurde auch bei Experimenten beobachtet, bei denen ePG7 mit Hilfe eines UV-Lasers ablatiert wurde (Altenhein et al., in Vorbereitung).

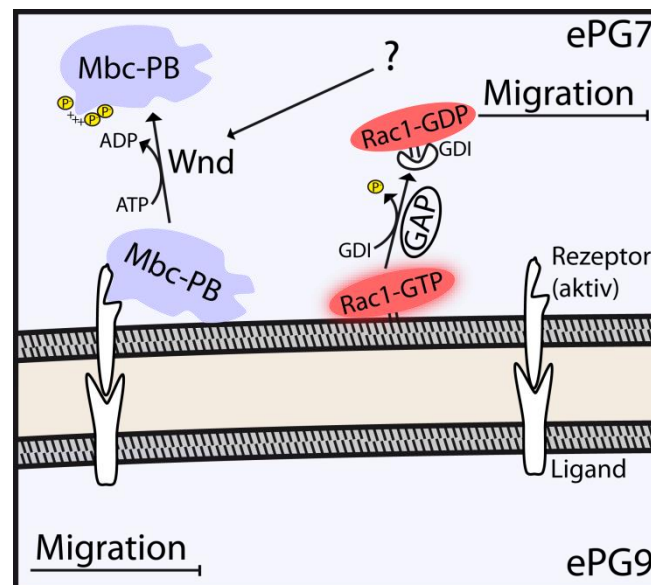


**Abb. 4.4: Rac1 ist vermutlich Teil eines reziproken Signalwegs zwischen ePG7 und ePG9**

Wenn Rac1 in ePG7 nicht aktiviert wird, beeinflusst das zum einen die Migration von ePG7, aber auch die Migration von ePG9. Daher ist Rac1 vermutlich Teil eines Signalwegs, der ausgehend von ePG7 die Polarität von ePG9 aufrechterhält.

Nachdem die beiden Zellen ihr finales Ziel erreicht haben, muss Rac1 deaktiviert werden, um die Migration von ePG7 zu stoppen. Dazu wird ein *GTPase-activating protein* (GAP) benö-

tigt, das als Gegenspieler von Mbc-PB Rac1 wieder in seine, an GDI gebundene, inaktive Form versetzt (Abb. 4.5). Um Rac1 nicht wieder zu reaktivieren, muss zusätzlich Mbc-PB inaktiviert, d. h. von der Zellmembran und damit vom Rezeptor entfernt werden. Wie Experimente mit phosphomutanten Formen von Mbc-PB zeigen, wird dieser Schritt wahrscheinlich über Phosphorylierung von Mbc-PB innerhalb des von Exon 9 kodierten Bereichs reguliert (siehe Kapitel: 4.3.3). Die negativ geladenen Phosphatgruppen könnten in diesem Fall die positiven Ladungen der ersten  $\alpha$ -Helix des von Exon 9 kodierten Bereichs abschirmen. Ebenfalls denkbar wäre, dass es durch die negativen Ladungen zu einer Konformationsänderung der benachbarten HEAT-repeats kommt, die teilweise von dem alternativ gespleißten Bereich gebildet werden. In beiden Fällen würden sich die Bindungen zwischen Mbc-PB und Rezeptor lösen und Mbc-PB würde inaktiv. Für die Phosphorylierung von Mbc-PB ist wahrscheinlich die Kinase Wnd verantwortlich. Durch welche Signale wiederum Wnd reguliert wird, ist bisher nicht bekannt.



**Abb. 4.5: Modell für die Inaktivierung von Mbc-PB**

Über einen noch unbekanntem Signalweg wird die Kinase Wnd aktiviert, die wiederum Mbc-PB innerhalb des von Exon 9 kodierten Bereichs phosphoryliert. Durch die Phosphorylierung wird die Bindung zum aktiven Rezeptor aufgehoben und Mbc-PB von der Membran entfernt. Rac1 wird durch einen noch nicht bekannten GAP inaktiviert und die Migration von ePG7 stoppt.

Insgesamt zeigt sich, dass Mbc-PB Teil eines bisher völlig unbekanntem Signalwegs ist, der größtenteils unabhängig von den für Mbc-PA beschriebenen Interaktionspartnern funktioniert. Lediglich Rac1 und Ced-12 scheinen als eine Art Kernkomplex mit Mbc-PB zu interagieren. Die bisher unbekanntem Interaktionspartner von Mbc-PB müssen durch weitere Forschungen identifiziert werden.

## **5. Zusammenfassung und Ausblick**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Signalwege untersucht, die an der Migration der embryonalen peripheren Gliazellen (ePG) beteiligt sind. Der Fokus lag dabei auf dem nicht kanonischen GTP-Austauschfaktor Myoblast city (Mbc) und der kleinen GTPase Rac1. Zunächst wurden dazu unterschiedliche *mbc* Mutanten analysiert, bei denen es zu starken glialen Migrationsdefekten kommt (Kapitel 3.1.2). Um die auftretenden Phänotypen quantitativ zu analysieren, wurde eine Methode entwickelt um die Position der Pionierglia ePG9 zu bestimmen. Diese Methode ermöglicht es, auch sehr subtile gliale Migrationsphänotypen zu detektieren, was zuvor in dieser Form nicht möglich war. Durch Rettungsexperimente konnte gezeigt werden, dass die starken Migrationsdefekte der ePG in den *mbc* Mutanten teilweise durch Fehlentwicklung der somatischen Muskeln, die sich abhängig von Mbc entwickeln, hervorgerufen werden (Kapitel 3.6.1). Gleichzeitig spielt Mbc aber eine zellautonome Rolle bei der glialen Migration, was durch *knock-down* Experimente gezeigt werden konnte (Kapitel 3.3). Besonders interessant ist die Tatsache, dass während der Migration der ePG eine alternativ gespleißte Isoform benötigt wird, die bisher kaum untersucht wurde (Kapitel 3.6.2). Durch bioinformatische Methoden konnte gezeigt werden, dass diese neue Isoform (Mbc-PB) nur innerhalb der Arthropoden auftritt und sich von der anderen (Mbc-PA) nur in einem sehr kleinen Bereich unterscheidet (Kapitel 3.10). Durch Strukturvorhersagen konnte gezeigt werden, dass sich der Bereich, in dem sich die beiden Isoformen unterscheiden in einer Region liegt, die sich zu HEAT-*repeats* faltet (Kapitel 3.11). Da diese Strukturen meistens für Interaktionen zwischen Proteinen wichtig sind, scheint Mbc-PB über einen Bereich zu verfügen, der im Vergleich zu Mbc-PA zusätzliche Interaktionen erlaubt. Innerhalb dieses Bereichs scheint es zudem mehrere Phosphorylierungsstellen zu geben, die für die Inaktivierung von Mbc-PB notwendig sind. Wenn eine oder mehrere dieser Stellen mutiert werden, entsteht eine Art konstitutiv aktive Form von Mbc-PB, die zu einer starken Übermigration von ePG9 führt (Kapitel 3.8.4). Die Kinase Wallenda konnte im Rahmen eines *screens* als Kandidat identifiziert werden, der für die Phosphorylierung und somit die Inaktivierung von Mbc-PB verantwortlich ist (Kapitel 3.8.3). Durch weitere Rettungs- und *knock-down* Experimente konnte gezeigt werden, dass Mbc-PB lediglich an der Migration einer einzelnen Zelle (ePG7) beteiligt ist, die indirekt die Migration der Pionierglia ePG9 beeinflusst.

Durch die vorliegende Arbeit konnten somit weitere Einblicke in die Migration der ePG gewonnen werden. Dabei zeigt sich, dass es sich bei dieser Zellpopulation um eine sehr heterogene Gruppe handelt, deren Migration entweder individuell oder in sehr kleinen Gruppen gesteuert wird. Zudem scheint Mbc-PB Teil eines neuen und von Mbc-PA unabhängigen Signalwegs zu sein, was die Möglichkeit für weitere Forschungen ergibt.

## 6. Literatur

- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M, Henderson SN, Sutton GG, Wortman JR, Yandell MD, Zhang Q, Chen LX, Brandon RC, Rogers YH, Blazej RG, Champe M, Pfeiffer BD, Wan KH, Doyle C, Baxter EG, Helt G, Nelson CR, Gabor GL, Abril JF, Agbayani A, An HJ, Andrews-Pfannkoch C, Baldwin D, Ballew RM, Basu A, Baxendale J, Bayraktaroglu L, Beasley EM, Beeson KY, Benos PV, Berman BP, Bhandari D, Bolshakov S, Borkova D, Botchan MR, Bouck J, Brokstein P, Brottier P, Burtis KC, Busam DA, Butler H, Cadieu E, Center A, Chandra I, Cherry JM, Cawley S, Dahlke C, Davenport LB, Davies P, de Pablos B, Delcher A, Deng Z, Mays AD, Dew I, Dietz SM, Dodson K, Doup LE, Downes M, Dugan-Rocha S, Dunkov BC, Dunn P, Durbin KJ, Evangelista CC, Ferraz C, Ferriera S, Fleischmann W, Fosler C, Gabrielian AE, Garg NS, Gelbart WM, Glasser K, Glodek A, Gong F, Gorrell JH, Gu Z, Guan P, Harris M, Harris NL, Harvey D, Heiman TJ, Hernandez JR, Houck J, Hostin D, Houston KA, Howland TJ, Wei MH, Ibegwam C, Jalali M, Kalush F, Karpen GH, Ke Z, Kennison JA, Ketchum KA, Kimmel BE, Kodira CD, Kraft C, Kravitz S, Kulp D, Lai Z, Lasko P, Lei Y, Levitsky AA, Li J, Li Z, Liang Y, Lin X, Liu X, Mattei B, McIntosh TC, McLeod MP, McPherson D, Merkulov G, Milshina NV, Mobarry C, Morris J, Moshrefi A, Mount SM, Moy M, Murphy B, Murphy L, Muzny DM, Nelson DL, Nelson DR, Nelson KA, Nixon K, Nusskern DR, Pacleb JM, Palazzolo M, Pittman GS, Pan S, Pollard J, Puri V, Reese MG, Reinert K, Remington K, Saunders RD, Scheeler F, Shen H, Shue BC, Siden-Kiamos I, Simpson M, Skupski MP, Smith T, Spier E, Spradling AC, Stapleton M, Strong R, Sun E, Svirskas R, Tector C, Turner R, Venter E, Wang AH, Wang X, Wang ZY, Wassarman DA, Weinstock GM, Weissenbach J, Williams SM, Woodage T, Worley KC, Wu D, Yang S, Yao QA, Ye J, Yeh RF, Zaveri JS, Zhan M, Zhang G, Zhao Q, Zheng L, Zheng XH, Zhong FN, Zhong W, Zhou X, Zhu S, Zhu X, Smith HO, Gibbs RA, Myers EW, Rubin GM, Venter JC (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185-2195.
- Akiyama-Oda Y, Hosoya T, Hotta Y (1999) Asymmetric cell division of thoracic neuroblast 6-4 to bifurcate glial and neuronal lineage in *Drosophila*. *Development* 126:1967-1974.
- Altenhein B, Becker A, Busold C, Beckmann B, Hoheisel JD, Technau GM (2006) Expression profiling of glial genes during *Drosophila* embryogenesis. *Dev Biol* 296:545-560.
- Altenhein T, von Hilchen CM, Kumar A, Giangrande A, Technau GM, Altenhein B (in Vorbereitung) Single cell ablation in vivo reveal functional requirements for individual cell identities during collective glia migration.
- Andrade MA, Bork P (1995) HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat Genet* 11:115-116.
- Andrade MA, Perez-Iratxeta C, Ponting CP (2001) Protein repeats: structures, functions, and evolution. *J Struct Biol* 134:117-131.
- Arendt D, Nübler-Jung K (1999) Comparison of early nerve cord development in insects and vertebrates. *Development* 126:2309-2325.
- Badenhorst P (2001) Tramtrack controls glial number and identity in the *Drosophila* embryonic CNS. *Development* 128:4093-4101.
- Balagopalan L, Chen MH, Geisbrecht ER, Abmayr SM (2006) The CDM superfamily protein MBC directs myoblast fusion through a mechanism that requires phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate binding but is independent of direct interaction with DCrk. *Mol Cell Biol* 26:9442-9455.
- Beckervordersandforth RM, Rickert C, Altenhein B, Technau GM (2008) Subtypes of glial cells in the *Drosophila* embryonic ventral nerve cord as related to lineage and gene expression. *Mech Dev* 125:542-557.
- Bianco A, Poukkula M, Cliffe A, Mathieu J, Luque CM, Fulga TA, Rorth P (2007) Two distinct modes of guidance signalling during collective migration of border cells. *Nature* 448:362-365.
- Birkholz O, Rickert C, Berger C, Urbach R, Technau GM (2013) Neuroblast pattern and identity in the *Drosophila* tail region and role of doublesex in the survival of sex-specific precursors. *Development* 140:1830-1842.

- Blom N, Gammeltoft S, Brunak S (1999) Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 294:1351-1362.
- Blom N, Sicheritz-Ponten T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S (2004) Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* 4:1633-1649.
- Bossing T, Technau GM (1994) The fate of the CNS midline progenitors in *Drosophila* as revealed by a new method for single cell labelling. *Development* 120:1895-1906.
- Brand AH, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401-415.
- Broughton SJ, Kane NS, Arthur B, Yoder M, Greenspan RJ, Robichon A (1996) Endogenously inhibited protein kinase C in transgenic *Drosophila* embryonic neuroblasts down regulates the outgrowth of type I and II processes of cultured mature neurons. *J Cell Biochem* 60:584-599.
- Brugnera E, Haney L, Grimsley C, Lu M, Walk SF, Tosello-Trampont AC, Macara IG, Madhani H, Fink GR, Ravichandran KS (2002) Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nat Cell Biol* 4:574-582.
- Chen EH, Olson EN (2004) Towards a molecular pathway for myoblast fusion in *Drosophila*. *Trends Cell Biol* 14:452-460.
- Chen EH, Olson EN (2005) Unveiling the mechanisms of cell-cell fusion. *Science* 308:369-373.
- Chook YM, Blobel G (1999) Structure of the nuclear transport complex karyopherin-beta2-Ran x GppNHp. *Nature* 399:230-237.
- Cingolani G, Petosa C, Weis K, Muller CW (1999) Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha. *Nature* 399:221-229.
- Collins CA, Wairkar YP, Johnson SL, DiAntonio A (2006) Highwire restrains synaptic growth by attenuating a MAP kinase signal. *Neuron* 51:57-69.
- Côté JF, Vuori K (2002) Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity. *J Cell Sci* 115:4901-4913.
- De Iaco R, Soustelle L, Kammerer M, Sorrentino S, Jacques C, Giangrande A (2006) Hucklebein-mediated autoregulation of *Glide/Gcm* triggers glia specification. *EMBO J* 25:244-254.
- Dietzl G, Chen D, Schnorrer F, Su KC, Barinova Y, Fellner M, Gasser B, Kinsey K, Oettel S, Scheiblaue S, Couto A, Marra V, Keleman K, Dickson BJ (2007) A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* 448:151-156.
- Drewes G, Ebner A, Preuss U, Mandelkow EM, Mandelkow E (1997) MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* 89:297-308.
- Duchek P, Rorth P (2001) Guidance of cell migration by EGF receptor signaling during *Drosophila* oogenesis. *Science* 291:131-133.
- Duchek P, Somogyi K, Jekely G, Beccari S, Rorth P (2001) Guidance of cell migration by the *Drosophila* PDGF/VEGF receptor. *Cell* 107:17-26.
- Eden S, Rohatgi R, Podtelejnikov AV, Mann M, Kirschner MW (2002) Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* 418:790-793.
- Edenfeld G, Altenhein B, Zierau A, Cleppien D, Krukkert K, Technau G, Klambt C (2007) Notch and Numb are required for normal migration of peripheral glia in *Drosophila*. *Dev Biol* 301:27-37.
- Edenfeld G, Volohonsky G, Krukkert K, Naffin E, Lammel U, Grimm A, Engelen D, Reuveny A, Volk T, Klambt C (2006) The splicing factor crooked neck associates with the RNA-binding protein HOW to control glial cell maturation in *Drosophila*. *Neuron* 52:969-980.
- Erickson MR, Galletta BJ, Abmayr SM (1997) *Drosophila* myoblast city encodes a conserved protein that is essential for myoblast fusion, dorsal closure, and cytoskeletal organization. *J Cell Biol* 138:589-603.
- Feng H, Hu B, Jarzynka MJ, Li Y, Keezer S, Johns TG, Tang CK, Hamilton RL, Vuori K, Nishikawa R, Sarkaria JN, Fenton T, Cheng T, Furnari FB, Cavenee WK, Cheng SY (2012) Phosphorylation of dedicator of cytokinesis 1 (Dock180) at tyrosine residue Y722 by Src family kinases mediates EGFRVIII-driven glioblastoma tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:3018-3023.

- Feng H, Hu B, Liu KW, Li Y, Lu X, Cheng T, Yiin JJ, Lu S, Keezer S, Fenton T, Furnari FB, Hamilton RL, Vuori K, Sarkaria JN, Nagane M, Nishikawa R, Cavenee WK, Cheng SY (2011) Activation of Rac1 by Src-dependent phosphorylation of Dock180(Y1811) mediates PDGFR $\alpha$ -stimulated glioma tumorigenesis in mice and humans. *J Clin Invest* 121:4670-4684.
- Feng H, Hu B, Vuori K, Sarkaria JN, Furnari FB, Cavenee WK, Cheng SY (2013) EGFRvIII stimulates glioma growth and invasion through PKA-dependent serine phosphorylation of Dock180. *Oncogene*.
- Freeman MR, Doe CQ (2001) Asymmetric Prospero localization is required to generate mixed neuronal/glial lineages in the *Drosophila* CNS. *Development* 128:4103-4112.
- Freeman MR, Doherty J (2006) Glial cell biology in *Drosophila* and vertebrates. *Trends Neurosci* 29:82-90.
- Geisbrecht ER, Haralalka S, Swanson SK, Florens L, Washburn MP, Abmayr SM (2008) *Drosophila* ELMO/CED-12 interacts with Myoblast city to direct myoblast fusion and ommatidial organization. *Dev Biol* 314:137-149.
- Giesen K, Hummel T, Stollewerk A, Harrison S, Travers A, Klambt C (1997) Glial development in the *Drosophila* CNS requires concomitant activation of glial and repression of neuronal differentiation genes. *Development* 124:2307-2316.
- Goberdhan DC, Paricio N, Goodman EC, Mlodzik M, Wilson C (1999) *Drosophila* tumor suppressor PTEN controls cell size and number by antagonizing the Chico/PI3-kinase signaling pathway. *Genes Dev* 13:3244-3258.
- Graveley BR, Brooks AN, Carlson JW, Duff MO, Landolin JM, Yang L, Artieri CG, van Baren MJ, Boley N, Booth BW, Brown JB, Cherbas L, Davis CA, Dobin A, Li R, Lin W, Malone JH, Mattiuzzo NR, Miller D, Sturgill D, Tuch BB, Zaleski C, Zhang D, Blanchette M, Dudoit S, Eads B, Green RE, Hammonds A, Jiang L, Kapranov P, Langton L, Perrimon N, Sandler JE, Wan KH, Willingham A, Zhang Y, Zou Y, Andrews J, Bickel PJ, Brenner SE, Brent MR, Cherbas P, Gingeras TR, Hoskins RA, Kaufman TC, Oliver B, Celniker SE (2011) The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 471:473-479.
- Grimsley CM, Kinchen JM, Tosello-Tramont AC, Brugnera E, Haney LB, Lu M, Chen Q, Klingele D, Hengartner MO, Ravichandran KS (2004) Dock180 and ELMO1 proteins cooperate to promote evolutionarily conserved Rac-dependent cell migration. *J Biol Chem* 279:6087-6097.
- Groth AC, Fish M, Nusse R, Calos MP (2004) Construction of transgenic *Drosophila* by using the site-specific integrase from phage  $\phi$ C31. *Genetics* 166:1775-1782.
- Groves MR, Barford D (1999) Topological characteristics of helical repeat proteins. *Curr Opin Struct Biol* 9:383-389.
- Halfon MS, Gisselbrecht S, Lu J, Estrada B, Keshishian H, Michelson AM (2002) New fluorescent protein reporters for use with the *Drosophila* Gal4 expression system and for vital detection of balancer chromosomes. *Genesis* 34:135-138.
- Halter DA, Urban J, Rickert C, Ner SS, Ito K, Travers AA, Technau GM (1995) The homeobox gene repo is required for the differentiation and maintenance of glia function in the embryonic nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Development* 121:317-332.
- Haralalka S, Abmayr SM (2010) Myoblast fusion in *Drosophila*. *Exp Cell Res* 316:3007-3013.
- Hasegawa H, Kiyokawa E, Tanaka S, Nagashima K, Gotoh N, Shibuya M, Kurata T, Matsuda M (1996) DOCK180, a major CRK-binding protein, alters cell morphology upon translocation to the cell membrane. *Mol Cell Biol* 16:1770-1776.
- Hitier R, Chaminade M, Preat T (2001) The *Drosophila* castor gene is involved in postembryonic brain development. *Mech Dev* 103:3-11.
- Ishimaru S, Ueda R, Hinohara Y, Ohtani M, Hanafusa H (2004) PVR plays a critical role via JNK activation in thorax closure during *Drosophila* metamorphosis. *EMBO J* 23:3984-3994.
- Ito K, Urban J, Technau G (1995) Distribution, classification, and development of *Drosophila* glial cells in the late embryonic and early larval ventral nerve cord. *Roux's Arch Dev Biol* 204:284-307.



- Jones BW, Abeysekera M, Galinska J, Jolicoeur EM (2004) Transcriptional control of glial and blood cell development in *Drosophila*: cis-regulatory elements of glial cells missing. *Dev Biol* 266:374-387.
- Kaipa BR, Shao H, Schafer G, Trinkewitz T, Groth V, Liu J, Beck L, Bogdan S, Abmayr SM, Onel SF (2013) Dock mediates Scar- and WASp-dependent actin polymerization through interaction with cell adhesion molecules in founder cells and fusion-competent myoblasts. *J Cell Sci* 126:360-372.
- Källberg M, Wang H, Wang S, Peng J, Wang Z, Lu H, Xu J (2012) Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nat Protoc* 7:1511-1522.
- Källberg M, Wang H, Wang S, Peng J, Wang Z, Lu H, Xu J (2012) Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nat Protocols* 7:1511-1522.
- Katoh H, Negishi M (2003) RhoG activates Rac1 by direct interaction with the Dock180-binding protein Elmo. *Nature* 424:461-464.
- Katzen AL, Kornberg T, Bishop JM (1991) Expression during *Drosophila* development of DER, a gene related to erbB-1 and neu: correlations with mutant phenotypes. *Dev Biol* 145:287-301.
- Kibbe WA (2007) OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res* 35:W43-46.
- Kiger AA, Baum B, Jones S, Jones MR, Coulson A, Echeverri C, Perrimon N (2003) A functional genomic analysis of cell morphology using RNA interference. *J Biol* 2:27.
- Kiyokawa E, Hashimoto Y, Kurata T, Sugimura H, Matsuda M (1998) Evidence that DOCK180 up-regulates signals from the CrkII-p130(Cas) complex. *J Biol Chem* 273:24479-24484.
- Klaes A, Menne T, Stollewerk A, Scholz H, Klämbt C (1994) The Ets transcription factors encoded by the *Drosophila* gene pointed direct glial cell differentiation in the embryonic CNS. *Cell* 78:149-160.
- Klämbt C, Goodman CS (1991) Role of the midline glia and neurons in the formation of the axon commissures in the central nervous system of the *Drosophila* embryo. *Ann N Y Acad Sci* 633:142-159.
- Klämbt C, Hummel T, Menne T, Sadlowski E, Scholz H, Stollewerk A (1996) Development and function of embryonic central nervous system glial cells in *Drosophila*. *Dev Genet* 18:40-49.
- Landgraf M, Bossing T, Technau GM, Bate M (1997) The origin, location, and projections of the embryonic abdominal motoneurons of *Drosophila*. *J Neurosci* 17:9642-9655.
- Lu M, Kinchen JM, Rossman KL, Grimsley C, deBakker C, Brugnera E, Tosello-Trampont AC, Haney LB, Klingele D, Sondek J, Hengartner MO, Ravichandran KS (2004) PH domain of ELMO functions in trans to regulate Rac activation via Dock180. *Nat Struct Mol Biol* 11:756-762.
- Lu M, Kinchen JM, Rossman KL, Grimsley C, Hall M, Sondek J, Hengartner MO, Yajnik V, Ravichandran KS (2005) A steric-inhibition model for regulation of nucleotide exchange via the Dock180 family of GEFs. *Curr Biol* 15:371-377.
- Majumder P, Aranjuez G, Amick J, McDonald JA (2012) Par-1 controls myosin-II activity through myosin phosphatase to regulate border cell migration. *Curr Biol* 22:363-372.
- Makino Y, Tsuda M, Ichihara S, Watanabe T, Sakai M, Sawa H, Nagashima K, Hatakeyama S, Tanaka S (2006) Elmo1 inhibits ubiquitylation of Dock180. *J Cell Sci* 119:923-932.
- Matsuda M, Ota S, Tanimura R, Nakamura H, Matuoka K, Takenawa T, Nagashima K, Kurata T (1996) Interaction between the amino-terminal SH3 domain of CRK and its natural target proteins. *J Biol Chem* 271:14468-14472.
- McDonald JA, Khodyakova A, Aranjuez G, Dudley C, Montell DJ (2008) PAR-1 kinase regulates epithelial detachment and directional protrusion of migrating border cells. *Curr Biol* 18:1659-1667.
- McDonald JA, Pinheiro EM, Kadlec L, Schupbach T, Montell DJ (2006) Multiple EGFR ligands participate in guiding migrating border cells. *Dev Biol* 296:94-103.
- Montell DJ, Yoon WH, Starz-Gaiano M (2012) Group choreography: mechanisms orchestrating the collective movement of border cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:631-645.

- Murai KK, Van Meyel DJ (2007) Neuron glial communication at synapses: insights from vertebrates and invertebrates. *Neuroscientist* 13:657-666.
- Ni JQ, Markstein M, Binari R, Pfeiffer B, Liu LP, Villalta C, Booker M, Perkins L, Perrimon N (2008) Vector and parameters for targeted transgenic RNA interference in *Drosophila melanogaster*. *Nat Methods* 5:49-51.
- Nobes CD, Hall A (1995) Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans* 23:456-459.
- Pielage J, Kippert A, Zhu M, Klambt C (2004) The *Drosophila* transmembrane protein Fear-of-intimacy controls glial cell migration. *Dev Biol* 275:245-257.
- Potter CJ, Luo L (2010) Splinkerette PCR for mapping transposable elements in *Drosophila*. *PLoS One* 5:e10168.
- Premkumar L, Bobkov AA, Patel M, Jaroszewski L, Bankston LA, Stec B, Vuori K, Cote JF, Liddington RC (2010) Structural basis of membrane targeting by the Dock180 family of Rho family guanine exchange factors (Rho-GEFs). *J Biol Chem* 285:13211-13222.
- Prokop A, Landgraf M, Rushton E, Broadie K, Bate M (1996) Presynaptic development at the *Drosophila* neuromuscular junction: assembly and localization of presynaptic active zones. *Neuron* 17:617-626.
- Ragone G, Van De Bor V, Sorrentino S, Kammerer M, Galy A, Schenck A, Bernardoni R, Miller AA, Roy N, Giangrande A (2003) Transcriptional regulation of glial cell specification. *Dev Biol* 255:138-150.
- Rickert C, Kunz T, Harris KL, Whittington PM, Technau GM (2011) Morphological characterization of the entire interneuron population reveals principles of neuromere organization in the ventral nerve cord of *Drosophila*. *J Neurosci* 31:15870-15883.
- Rossmann KL, Der CJ, Sondek J (2005) GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:167-180.
- Rushton E, Drysdale R, Abmayr SM, Michelson AM, Bate M (1995) Mutations in a novel gene, myoblast city, provide evidence in support of the founder cell hypothesis for *Drosophila* muscle development. *Development* 121:1979-1988.
- Santy LC, Ravichandran KS, Casanova JE (2005) The DOCK180/Elmo complex couples ARNO-mediated Arf6 activation to the downstream activation of Rac1. *Curr Biol* 15:1749-1754.
- Schmidt I, Franzdottir SR, Edenfeld G, Rodrigues F, Zierau A, Klambt C (2011) Transcriptional regulation of peripheral glial cell differentiation in the embryonic nervous system of *Drosophila*. *Glia* 59:1264-1272.
- Sepp KJ, Auld VJ (1999) Conversion of lacZ enhancer trap lines to GAL4 lines using targeted transposition in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 151:1093-1101.
- Sepp KJ, Auld VJ (2003) RhoA and Rac1 GTPases mediate the dynamic rearrangement of actin in peripheral glia. *Development* 130:1825-1835.
- Sepp KJ, Schulte J, Auld VJ (2000) Developmental dynamics of peripheral glia in *Drosophila melanogaster*. *Glia* 30:122-133.
- Sepp KJ, Schulte J, Auld VJ (2001) Peripheral glia direct axon guidance across the CNS/PNS transition zone. *Dev Biol* 238:47-63.
- Silies M, Klambt C (2010) APC/C(Fzr/Cdh1)-dependent regulation of cell adhesion controls glial migration in the *Drosophila* PNS. *Nat Neurosci* 13:1357-1364.
- Somjen GG (1988) Nervenkitz: notes on the history of the concept of neuroglia. *Glia* 1:2-9.
- Stork T, Engelen D, Krudewig A, Silies M, Bainton RJ, Klambt C (2008) Organization and function of the blood-brain barrier in *Drosophila*. *J Neurosci* 28:587-597.
- Stothard P (2000) The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* 28:1102, 1104.
- Technau GM, Berger C, Urbach R (2006) Generation of cell diversity and segmental pattern in the embryonic central nervous system of *Drosophila*. *Dev Dyn* 235:861-869.
- Treherne JE, Schofield PK (1981) Mechanisms of ionic homeostasis in the central nervous system of an insect. *J Exp Biol* 95:61-73.

- Udolph G, Prokop A, Bossing T, Technau GM (1993) A common precursor for glia and neurons in the embryonic CNS of *Drosophila* gives rise to segment-specific lineage variants. *Development* 118:765-775.
- Udolph G, Rath P, Chia W (2001) A requirement for Notch in the genesis of a subset of glial cells in the *Drosophila* embryonic central nervous system which arise through asymmetric divisions. *Development* 128:1457-1466.
- Unger T, Jacobovitch Y, Dantes A, Bernheim R, Peleg Y (2010) Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. *J Struct Biol* 172:34-44.
- Venken KJ, Schulze KL, Haelterman NA, Pan H, He Y, Evans-Holm M, Carlson JW, Levis RW, Spradling AC, Hoskins RA, Bellen HJ (2011) MiMIC: a highly versatile transposon insertion resource for engineering *Drosophila melanogaster* genes. *Nat Methods* 8:737-743.
- von Hilchen CM, Beckervordersandforth RM, Rickert C, Technau GM, Altenhein B (2008) Identity, origin, and migration of peripheral glial cells in the *Drosophila* embryo. *Mech Dev* 125:337-352.
- von Hilchen CM, Bustos AE, Giangrande A, Technau GM, Altenhein B (2013) Predetermined embryonic glial cells form the distinct glial sheaths of the *Drosophila* peripheral nervous system. *Development* 140:3657-3668.
- von Hilchen CM, Hein I, Technau GM, Altenhein B (2010) Netrins guide migration of distinct glial cells in the *Drosophila* embryo. *Development* 137:1251-1262.
- Xie X, Auld VJ (2011) Integrins are necessary for the development and maintenance of the glial layers in the *Drosophila* peripheral nerve. *Development* 138:3813-3822.
- Xiong WC, Okano H, Patel NH, Blendy JA, Montell C (1994) repo encodes a glial-specific homeo domain protein required in the *Drosophila* nervous system. *Genes Dev* 8:981-994.
- Xue Y, Ren J, Gao X, Jin C, Wen L, Yao X (2008) GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy. *Mol Cell Proteomics* 7:1598-1608.
- Yang J, Zhang Z, Roe SM, Marshall CJ, Barford D (2009) Activation of Rho GTPases by DOCK exchange factors is mediated by a nucleotide sensor. *Science* 325:1398-1402.
- Yuasa Y, Okabe M, Yoshikawa S, Tabuchi K, Xiong WC, Hiromi Y, Okano H (2003) *Drosophila* homeodomain protein REPO controls glial differentiation by cooperating with ETS and BTB transcription factors. *Development* 130:2419-2428.
- Zallen JA, Cohen Y, Hudson AM, Cooley L, Wieschaus E, Schejter ED (2002) SCAR is a primary regulator of Arp2/3-dependent morphological events in *Drosophila*. *J Cell Biol* 156:689-701.

## 7. Anhang:

>pUASTattB\_abc-RA

CGAGCACGCTCATTCAACAACAAACAGTTGAAACGCGCGTGTGTTTTCCGAGAGCGGTTATTTAATTAATTGGCA  
ACTGTCACACACGAGTGTGTGTGCGTTCGAGTGCCTGTACATGTGATAATTAGCTGAGCGGCAGCGGCCAACTCC  
CAGCCCAAATACAAGTCGAGAACAAAACGAGCGAAAAACGGCGCAAAATGCATTTGCGGAGCGACAATTTGTGCG  
GAATGCTAGCTTTTTGTGCAATAATTAATTAATGACGATTGGTTGCAATTGTCCAACCGGTGTGCTTTTCGTGCAAA  
TCTGTAGCGAAATCGGAGGCGAAATGCTTGTGTGGCGGCATTGTGAAAAAGAAATCAAAATTTCAACTACGTT  
TGCTTTTTGCGGTTGCCTAATTAATGTCTTGTGTTTTATTTTCGCAAACGAAAGTCCATCGCTTTGCATGT  
GTGAGTAGCGATCGTTTTGTCGCCGTGTGGTGTAAAAGTCGGCGCAAAAACAACAATATCAGCAACAACACTAG  
TAGAAGCAACAACAACGAGAAGAAAAAGCCTTCAAGATGAGTGTGTGGAGCGACTGCAATGCCAAGCAAGCAGAAT  
TCGGCATTGCCAAGTGCAATTCGACCAGGAGTGAAGCCACATCGCTTAATCTGGATGTGGGTGATGCGGTCA  
TAATTTAAGGAGACCACCCATTGGTACTACGGCTACAGACAAAAGCAAAGGAAATACGCGGCATATTTCCCA  
AGAGCTATATACACTTATGCGAATATAATATCGTGAATGGGGAGTACTGCATCCAGCGCACGGATATTGTGCGAGG  
AGATCACTAAAGTCTTCTCGAGTGGGGTCCATAGCCAAGGATTACTTTCTGACCACAAATCCCAGCTTTCCCA  
AAATTCGACGAAAAATGAACGAATTAATAAATAGGGCGGCTTTGATCTCCGAAACCTGCCATTGGACGAGG  
TGCGAAAGGTGAAGCTGCTGGCCACCAATCAGATCGACTGGCAACAAGCTCCTGGCCTGGACATGGTGGTTC  
GCGACGAGAGCGGAGACATCTTGGACACCAATGCCATCTGCACCACCGAGCTCTACGAGCAACATATGCACGCTG  
TTCAGCGCATCGACAAGGCCAATCGGCTGTCAAGCGAGCGGGAACTACAAGAACCCAAACAAGTATTCACACA  
ACATCCTGCTACACGTGAACGCCTTCGTTTGAAGTTCAGGAGGACTCTGACCTGCTTTCACGCTTTTCGACG  
GCGAAACACACAAACCCATAGCGGAGAATGTGGTCAAGTGGTACGGACAGGTATTGCGCGTGATACTGACC  
AGATCGACAACAACCGCGTGTCTTTCACGGATCTAGTAAAGCGACCTAGCCATTGCCAAAATGTACTGGTGT  
GCTATGCCATCCGAATCGGTTGATGACGAGTTAAGGATTCTGCCGAGTCGAAACGGACCGATGAGCTTTGCCA  
ACAGCATGCTGAACGCCTCCAGTCGCAAGGCCTCCAGCTATCGGTGAGCTCCAGTGGATCGTCCAGCAGCAATG  
GGGAATACATCATTGACGTCGTTTTGGTGTGGCCTGCAAGGACCTCACGCCCTTCATCAATAAGTCGGACGACT  
TCCGAGGCAACATAGACCTGCCCTTCATCATGTGCGAAAAGGAAACGCTGGACGGAAACGCTGCGGAAGCTAATCG  
CGAATAAGGATATTGGCAAGATTGACTCCAAGATGGCTGTAACATCGAGGTGCTTCGGGGCGACATCAAGCAGA  
TAAAGGAAGAATTCACGCTTGTGACACACAATGTGCCAGTTGCCGAAAAATGGGATTTCCCTGAGTCAATTT  
TGCCAGGCGATGTGCGAAATGATTTGTACCTTACCATCTGCAGTGGAGAAATCGCACGCATTGCCAAGACTCGG  
AGAAGAACGTTGAGGTGTGCGTGTGTGGCCAATGAGCAGGGATACCTTATGCCGGTGTGCTAAGCATTGGAG  
CTGGACATCAACCCATTGATGAGTACAAATCGGTTGTATACTACCACGATGACAAGCCAAAGTGGCAAGAGACCT  
TCAAGATCCACGTGCCATTGAAGACTTTAAACAATGTCATTTGCGATTTGTGCTCAAACATCGTAGCAGTAATG  
AGCAGAAGGATCGAAGTAAAAACCCCTCGGTTCCGCTATGTGCGTCAATGCAGGCCAACGGGACAACCAACA  
CGAGGGTCAACATATCTGGCCGTTTACAAAATGATCACAAAAGTACGACAAAACAGTAGCCAATTTGTTATT  
TAGAATCTCCAGCCACGGTTGACAGCTGCAAGGTGCAAGCCTTCTATCGGTGGACTTACTCTTGGCAAAGG  
ATCAGCTATCGATTGGGGTTAACCTGTGCAGCACCAAGCTCACGCAGAGCGTGAGCTTGTGGACTTCTGAATT  
GGTGGCGCACAAAGGAGACGCTGGAACAGTCGCTAAACGCCTTGTCCACAGTCCGGAGAGGAGGTGGTGAAGT  
TCCTGCAGGACATACTCGATGCCTTGTAAATATACTGGTGGAGAATGATCATCCTGAGAAATATGACCAGCTCG  
TCTTTATGAGCATTATACATTTGATTGAAACGGTGTCCGATCTCAAGTACCAACACTTTCTCAGTGTCTCGAT  
TGTACATTAATGAAAGCTTCTCGTTTACACTTGGCTACACAAAATGATGGATGTGCTGAGGAAAGAATATTAGT  
AAGCGATCTACCAAAAAGAAAAGTCTGCTGATGGCAATGATCTGGAGGAGAGCCAGAGGTGCGCCGCTGTACA  
AGACAACCTCGTTACCTTCACTATGTGATGAAGTTCGTGATTGATCGCGTGTGCTCTACGCCGAGATGAAGTCA  
ACACGGACTATATGGACTTTGCTACCCGGCTGCAGGAGCTTCTCGCATGTTATCGACATGATTGGCTGTCCGA  
GCAATCTGCTTAAATCGGAGGGAGCGCTGCTCAAGAATCTGCACATCATCGCCACAGATTTGATGCAGGTCTTTG  
AACATGTGCGCTTAAGCATATCCATTGTGAAATCTTTGAGAAATCCCAGCGGACGCTTACTCAGTCTAAGA  
TGGGATGCATTAAGATTTTGTGGAGACAAAAGTTCGTTACGTTGCCAAGTGTGCGGCTTACTACTGCCGCTGT  
TCTGCAACACATCAAGGATCACCTCGAGAGCAAGGAGGAGATTGCCGAGTGCATCAACATCATGAACAACATAC  
TGAACCTTCTGTTCCGATCGGATGTGGGTTCCACGCACAATGACATTGAGACATTATGATCATCCTGTTTCGCA  
CTGTGATGAAGGAGCTCACGCCCTGGACAGGGACACGGGTTGGTGGGCAAATCTTTGCCATTATGCTGGGTA  
TACTGCAGCGCATGGACGCCAGCACTACGAGTACTTTGTGAAGGACCTGCACCAGAGCGGCGAGTTGAAACACT  
TTGTATAGAGATCCTTCTGGTATTTGAGGAGCTGGTGTCTCCGACCAGAAAAGCAGTGTTCGCGGGACTGGA  
TGGACATGATTATGCACCAGAATACTGTGATCCTTGGTGTCTGAAGCACTCACCGTGGTCAATACGGACTACT  
TCTTGTGCCGCTTCGAGAAAACAGATCTGGTGAACCTTCTTCCAGTGTCTATTGCTTCTTGGTGAATCCCCGC  
TTCAATTGAATGATTTCAACGATAATAAACGGCAAATTTGTGTTGCAAGATATCGTGACATCGCAAGGATACGG  
CCATGGAGATCAGGAAGATGTGGTTCCAGCTGGGGCAGCAAAACCCAAGTTTGTGCCGAGTTGGTGGAGCCAA  
TACTGAAATGAGCATGATACCGGAGAAGGAGTGCGCCAGGAGACCAATCCCATCTTCTTCGACATGATGCACT  
GCGAGTACTATGCTCGCATTTGGAACCGAAGTTACGGCGACACCAAAATTAACAATGCCACCACAAGGGTA  
ACTTTTCCGACTTCAAGACAGCGATGATTGAGAAGTTGGACATCCTGATTGGAGCTGGTAAAGGCAAGCTGAA  
ACAAGCATCTGTTGAGACAATTATGCTAGAGCGCTGCGCTGCCACAACACTCTTAACGTGGATGGCACTGCCT  
TTGTGACAGATGGTAACCCGGCTGATGGACAAGTTGTTGGAGTATCGCTTTATAATCCAGGATGAGAGCAAGGAGA  
ATCGCATGGCTTGCACGTTCTCTGTTGACGTTCTATTGCGAGGTGGATCTCAAGGAGATGTACATACGTTATG  
TCAACAAACTGTGCGCTCTGCACATGGAGTTGAGAACTACACGGAGGCGGCGTTACGCTTAAGCTGCACACGG  
AATGCTGCGTTGGACGGATACGGAGCTGTGCAACCAACTGCGCAGCTATCGGCATAAATACTGCCGTACTCACC  
GGCAACTGAAGGAGCTCTTTACTTTCGAGATCTGAGTACTTTCGACAAGGGCAACAGTGGGAGTGCCTACCG  
ATATGTGACGGGTGCTGGCCCGCAGTACGAGGAGGAGATCTTGCATCTCAAGCTGGCGGAACTTCTGAATC  
GCATGGCATTGTTCTATGAGAAGATCATCAAGGAGCTGCGCCACAATCTGAATATTTCCGCGTGTGCTTCTATG  
GGCGTGGATTCCCAGGTTTCTTCAAGACCGTGTCTACATCTCCGTTGGCAAGGAGTACGAGCGGCACAGTGACT  
TCTGCGCCCGTATGCTAGTACAGCATCCACAGGCTGAGCTCATGCAACGCTGGAGGCTCCGGGCGACGACATCA

```

CCAACAGTGATGGTCAGTACATACAGGTGAACAAGGTGGAGCCGATAATGGGTGAGCGTTCAACAAGTTCAACG
ATAAGATTATCAACAACGAAATCGTCAAATACTTACCCGCAACAACGTGCAAAAAGTTTCAGTTTTACGTCCT
TCCGGGACAGCACGAACGGTGGCGATAGGGACGATGTACGAAATCTGTGGCTGGAGCGACAGAGCTGCGTATCA
GCTACCCACTTCCGGGTATTCTGCGCTGGTTCCTCCGTCGTTGAGACCAATACTTTTAAAATCTCTCCCCTAGAGC
GGGCGGTGAAATTATGAAAGATACGAACCGTGACATTCGACAACCTGGTGATCCTGCACAAGAGCGACGAAACTC
TGACATTAATCCGCTGAGTATGAAACTTAATGGCATTGTGGATCCGGCTGTAATGGGTGGCTTTGCCAAGTACG
AGGAAGCCTTCTAACCAGCAGCTACTTGGAGCAGAATCCGGACGACAAGGAGTTGGTAGAAGAGCTCAAAGAAC
TGATTGCGAACAGATTCCACTGCTCGATTTAGCAATTCAGCTTCATCGCTTGCAGGACCAAGATAGTTTAAAAG
CGCTGCAGGAACACCTGGAGCGTTGCTTCGCCGACATGCAGCAGCATGTGGAGCAGCGCTATGGTCGCAAGTCCT
GCGACCTCAAAATCGAACGGGATTCCGTGGTGATGCGACGTCCAAACTCCTTTCTGCCTTCGCTTTTCGATGGCA
GCAACAATCGACACTCCGAAACCAGCATGGGATCTTCAGACAGCGGCTGTCAAAGTCAACGTTTTCTGCCGCGTC
CACAGACGAATTTCTATTA AAAAACCATTTTTCCGGCCTAAGTTTCAACACAAGGCCAGTTTGGGACACTCGCCGA
GCATTAAGAGCAACAAGAGCAAGGATAAGACTCCGAGTAAGCGAAGAACCAAGGATGGAAAGTTAAGGAGCGTG
AAGCCCATAGCCTGTCCAGCAGTCAGTGGTACACACCGCCATTGTCCACAATAACATCGACGCCGGAAGGAGA
TCAACACATCCATAGCCTCGCTAGCGAGCACATCAAATAGTTCTCTAAGTGGTCCCAAGACGCCAGATCCTCATG
TCCTGACAGAGGAGCTAACCCTAAGCGACCTCTGCGTTCGGAAATGGAGAAGGAACGTCGACTCTCTCGTCTG
CTAGCATCGCTACGCCAACCGCCAGTATCAAGAATTTCCCTGACACGCGCTCCCTGTCCGAAAGCAGCAACCGCA
ACTCTGTTGAAACCACCGATTCCACTTCAGAGGAGGACATTGACCTCCCTCCCTTGGCCGCAAGGCACGTGACT
CAACTGATTTTACCAGCCTGTCGCAAAACATGGATTGGACCCCGAATGTTATGCTATGCTCAGCACTATTAGCA
ATACCAGCAGCATGAGCACCACCTCAACCCTGACGAAGACCAGTATTACCAATACCACGTACGAGTATTTGGAGA
CCACGAACTTCAGTTTGGTGGGTGCCATCGATGGAAACAAACCGCGTCCGCCGACGCCGCCCGGAAGCCATCGC
GCCACAGCAAACACATTCATACCCATACCCATACCCATACCCATACCCATACCCATACCCATACCCATACCCATAC

```

**Anhang 1: Sequenz von pUASTattB\_ *mbc-RA***

Die dargestellte Sequenz wurde aus den überlappenden Sequenzen von insgesamt 12 Sequenzierungen zusammengesetzt und zeigt einen Teil des 5' UTR (kursiv), das Startcodon (grün) und die kodierende Sequenz von *mbc-RA*. In rot sind Nukleotide markiert, die von der annotierten Sequenz von *mbc-RA* (NM\_057796) abweichen. Bei allen Austauschen handelt es sich um stille Mutationen, die zu keinem Aminosäureaustausch führen. Am 3' Ende schließt sich außerdem die Sequenz für den *HA-tag* (gelb) an.

>pUASTattB\_ *mbc-RB* (von Bsu36I bis BstEII)

```
CCTGAGGTCATTTTCCAGGCGATGTGCGAAATGATTTGTACCTTACCATCTGCAGTGGAGAATTGCGACGCATT
GCCAAGACITCGGAGAAGAACGTTGAGGTGTGGTGTGTGGCCAATGAGCAGGGATACCTTATGCCIGGTGTG
CTGAGCATTGGAGCTGGACATCAACCCATTGATGAGTACAAATCGGTTGTATACTACCACGATGACAAGCCAAAG
TGGCAGGAGACTTTCAAGATCCACGTGCCATTGAAGACTTTAAACAATGTCATTTGCGCTTTGTGCTCAAACAT
CGTAGCAGTAATGAGCAGAAGGATCGAACTGAAAAACCTTCGGTCTGCGTATGTGCGTCTAATGCAGGCCAAI
GGGACAACCATCACGCAGGGTCAACATATCCTGGCCGTTTACAAAATTGATCACAAAAAGTACGACAAAACAGTA
GCCAATTGTTATTTAGAACTTCCAGCCACGGTTGCAGAGCTGCAAGGTGCAAAGCCTTCTATCGGTGGACTTACT
CTCTTGCCAAAGGATCAGCTATCGATTGGGGTTAACCTGTGCAGCACI AAGCTCACGCAGAGCGTGAGCTTGCTG
GGACTTCTGAATTGGTCCGCGCACAAAGGAGACGCTGGAACAGTGCCTAAACGCCTTGTCCACAGTGCCTGGAGAG
GAGGTGGTGAAGTTCCTGCAGGACATACTCGATGCCTTGTAAATACTGGTGGAGAATGATCATCCTGAGAAA
TATGACCAGCTCGTCTTTATGAGCATTATACATTTGATTGAAACGGTGTCCGATCTCAAGTACCAACACTTTCTC
AGTGTCTCGATGTGTACATTAATGAAAGITCTCGTTTACACTTGCCTACACCAAATTGATGGATGTGCTGCAG
AAGAATATTAGTGAAGCGATCTCACAAAAGAAAAGTCTGCTGATGGCAATGATCTGGAGGAGAGCCAGAGGTG
CGCCGCCTATACAAGACAACCTGTTACCTTCACTATGTGATGAAGTTTCGTGATTCGATCGCGTGTGCTCTACGCC
GAGATGAACTGCAACACGGACTATATGGACTTTGCTACCCGGCTGCAGGAGCTTCTTCGCATGTTTCATCGACATG
ATTGGCTGTCCGAGCAATCTGCTTAAATCGGAGGGAGCGCTGCTCAAGAATCTGCACATCATCGCCACAGATTTA
ATGCAGGTCTTTGAACATGTGCGCTTAAAGCATATCCATTGTGAAAATCCTTGAGAAATCCCAGCCGCGACGTCTT
ACTCAGTCTAAGATGGGATGCATTAAGATTTTGTGGAGACAAAAGTTCACGTTGCCAAGTGTGGGCCATC
CTACTGCCCGTGTITGCAAACACATCAAGGATCACCTCGAGAGCAAGGAGAGGGAGACTCGAAAACCGATATC
TGGCAGCAAGAAAAGAATCTTTGAAAGCCGCCAAAAGTCTTAGGACAGAAAAAATCCCAACTGCATACATGTGAT
ACGACTGCCAACAAAAAGATTGCCGAGTGCATCAACATCATGAACAACATACTGAAACTTCTGTTCCGATCGGAT
GTGGGTTCCACGCACAATGACATTCGAGACATTATGATCATCCTGTTTCGCACTGTGATGAAGGCAGTCCAGCC
CTGGACAGGGACACGGGGTTGGTGGGCAAATTTCTTTGCCATTATGCTGGGTATACTGCAGCGCATGGACGCCAG
CACTACGAGTACTTTGTGAAGGACCTGCACCAGAGCGGCGAGTTGAAACACTTTGTCATAGAGATCCTTCTGGTA
TTTGAGGAGCTGGTGTCTCCGCACCAGAAAAGCAGTGTTCGCGGGACTGGATGGACATGATTATGCACCAGAAT
ACTGTGATCCTTGGTGTCTGAAGCAITCACCGTGGTCATTACGGACTACTTCTTGTGCCCGTTCGAGAAAACAG
ATCTGGTCAACTTCTCCAGTGTCTATTGCCTTTCTGGTGCAATCCCCGTTCAATTGAATGATTTCAACGAT
AATAAGCGGCAAATTTGTTCGCAAGATATCGTGACATTCGCAAGGATACGGCCATGGAGATCAGGAAGATGTGG
TTCCAGCTGGGGCAGCACAAACCAAGTTTGTGCCGAGTTGGTGGAGCCAATACTGGAAATGAGCATGATACCG
GAGAAGGAGCTGCGCCAGGAGACCATTCCATCTTCTTCGACATGATGCAATGCGAGTACTATAGCTCGCGATTG
GAACACGAAAGTTACGGCGACACCAAATTAACAATGCCCAACCAAGGGTAACTTTCCGACTTCAAGACAGCG
ATGATTGAGAAGTTGGACATCCTGATTGGAGCTGGTAAAGGCGACGCTGAATACAAGCATCTGTTTCGAGACAAT
ATGCTAGAGCGCTGCGCTGCCACAACACTCTAACGTGGATGGCACTGCCTTTGTICAGATGGTAACC
```

## Anhang 2: Sequenz von UAS-*mbc-RB* (von der Bsu36I- bis zur BstEII-Schnittstelle)

Die dargestellte Sequenz wurde aus den überlappenden Sequenzen von insgesamt 3 Sequenzierungen zusammengesetzt und zeigt den Teil der kodierenden Sequenz von *mbc-RB* zwischen den Restriktionsschnittstellen von Bsu36I (magenta) bis BstEII (cyan). Exon 9 ist in grün dargestellt. Die neu hinzugefügte AvrII Schnittstelle ist unterstrichen. In rot sind Nukleotide markiert, die von der annotierten Sequenz von *mbc-RB* (NM\_001260338) abweichen. Bei allen Austauschen handelt es sich um stille Mutationen, die zu keinem Aminosäureaustausch führen.

>pUASTattB\_ *mbc-RB* S905A (von Bsu36I bis BstEII)

CCTGAGGTCATTTTCCAGGCGATGTGCGAAATGATTTGTACCTTACCATCTGCAGTGGAGAATTTCGCATGCATT  
GCCAAGACTTCGGAGAAGAACGTTGAGGTGTGGTGTGTGGCCAATGAGCAGGGATACCTTATGCCGGTGTG  
CTGAGCATTGGAGCTGGACATCAACCCATTGATGAGTACAAATCGGTTGTATACTACCACGATGACAAGCCAAAG  
TGGCAGGAGACTTCAAGATCCACGTGCCATTGAAGACTTTAAACAATGTCATTTGCGATTTGTGCTCAAACAT  
CGTAGCAGTAATGAGCAGAAGGATCGAACTGAAAAACCTTCGGTCTGCGTATGTGCGTCTAATCCCGGCCAA  
GGGACAACCATCACGCAGGGTCAACATATCCTGGCCGTTTACAAAATTGATCACAAAAGTACGACAAAACAGTA  
GCCAATTGTTATTTAGAACTTCCAGCCACGGTTGCAGAGCTGCAAGGTGCAAAGCCTTCTATCGGTGGACTTACT  
CTCTTGCCAAAGGATCAGCTATCGATTGGGGTTAACCTGTGCAGCACAAAGCTCACGCAGAGCGTGAGCTTGCTG  
GGACTTCTGAATTTGGTCCGCGCACAAGGAGACGCTGGAACAGTGCCTAAACGCCTTGTCCACAGTGCCTGGAGAG  
GAGGTGGTGAAGTTCTGCAGGACATACTCGATGCCTTGTAAATACTGTTGAGAGAAATGATCATCCTGAGAAA  
TATGACCAGCTCGTCTTTATGAGCATTATACATTTGATTGAAACGGTGTCCGATCTCAAGTACCAACACTTTCTC  
AGTGTTCGATGTGTACATTAATGAAAGTTCTCGTTTACACTTGCCTACACCAAATTGATGGATGTCCTGCAG  
AAGAATATTAGTGAAGCGATCTCACAAAAGAAAAGTCTGCTGATGGCAATGATCTGGAGGAGAGCCAGAGGTG  
CGCCGCCTATACAAGACAACCTGTTACCTTCACTATGTGATGAAGTTTCGTGATTCGATCGCGTGTGCTTACGCC  
GAGATGAACTGCAACACGGACTATATGGACTTTGCTACCCGGCTGCAGGAGCTTCTTCGCATGTTTCATCGACATG  
ATTGGCTGTCCGAGCAATCTGCTTAAATCGGAGGGAGCGCTGCTCAAGAACTGCACATCATCGCCACAGATTTA  
ATGCAGGTCTTTGAACATGTGCGCTTAAGCATATCCATTGTGGAATCCTTGAGAAATCCCGCCGCGACGTCTT  
ACTCAGTCTAAGATGGGATGCATTAAGATTTTGTGGAGACAAAACCTGTTACGTTGCCAAGTGTGGGCCATC  
CTACTGCCCGTGTGTTGCAAAACACATCAAGGATCACCTCGAGAGCAAGGAGGAGGGAGACCGAAAACCGATATC  
TGGCAGCAAGAAAAGAATCTTTCGAAAGCCGCCAAAAGTCTAGGACAGAAAAATCCCAACTGCACACATGTGAT  
ACGACTGCCAACAAAAAGATTGCCGAGTGCATCAACATCATGAACAACATACTGAACTTCTGTTCCGATCCGAT  
GTGGGTTCCACGCACAATGACATTCGAGACATTATGATCATCCTGTTTCGCACTGTGATGAAGGCAGTCAAGCC  
CTGGACAGGGACACGGGGTTGGTGGGCAAATTTCTTGGCATTATGCTGGGTATACTGCAGCGCATGGACGCCAG  
CACTACGAGTACTTTGTGAAGGACCTGCACCAGAGCGGCGAGTTGAAACACTTTGTATAGAGATCCTTCTGGTA  
TTTGAGGAGCTGGTGTCTCCGCACCAGAAAAGCAGTGTTCGCGGGGACTGGATGGACATGATTATGCACCAGAAT  
ACTGTGATCCTTGGTGTCTGAAGCACTCACCGTGGTCAATACGGACTACTTCTTGTGCCCGTTCGAGAAAACAG  
ATCTGGTCAACTTCTCCAGTCTATTGCTTTCTGGTCAATCCCGCTTCAATTGAATGATTTCAACGAT  
AATAAGCGGCAAATTTGTTTCGCAAGATATCGTGACATTCGCAAGGATACGGCCATGGAGATCAGGAAGATGTGG  
TTCCAGCTGGGGCAGCACAACCCAAAGTTTGTGCCGAGTTGGTGGAGCCAATACTGGAAATGAGCATGATACCG  
GAGAAGGAGCTGCGCCAGGAGACCATTCCGATCTTCTTCGACATGATGCAATGCGAGTACTATAGCTCGCGATTG  
GAACACGAAAGTTACGGCGACACCAAATTTAACAATGCCACCAAGGGTAACTTTCCGACTTCAAGACAGCG  
ATGATTGAGAAGTTGGACATCCTGATTGGAGCTGGTAAAGGCGACGCTGAATACAAGCATCTGTTTCGAGACAAT  
ATGCTAGAGCGCTGCGCTGCCACAACACTCTTAACGTGGATGGCACTGCCTTTGTACAGATGGTAACC

>pUASTattB\_ *mbc-RB* T935AT936A (von Bsu36I bis BstEII)

CCTGAGGTCATTTTCCAGGCGATGTGCGAAATGATTTGTACCTTACCATCTGCAGTGGAGAATTTCGCATGCATT  
GCCAAGACTTCGGAGAAGAACGTTGAGGTGTGGTGTGTGGCCAATGAGCAGGGATACCTTATGCCGGTGTG  
CTGAGCATTGGAGCTGGACATCAACCCATTGATGAGTACAAATCGGTTGTATACTACCACGATGACAAGCCAAAG  
TGGCAGGAGACTTCAAGATCCACGTGCCATTGAAGACTTTAAACAATGTCATTTGCGATTTGTGCTCAAACAT  
CGTAGCAGTAATGAGCAGAAGGATCGAACTGAAAAACCTTCGGTCTGCGTATGTGCGTCTAATCCCGGCCAA  
GGGACAACCATCACGCAGGGTCAACATATCCTGGCCGTTTACAAAATTGATCACAAAAGTACGACAAAACAGTA  
GCCAATTGTTATTTAGAACTTCCAGCCACGGTTGCAGAGCTGCAAGGTGCAAAGCCTTCTATCGGTGGACTTACT  
CTCTTGCCAAAGGATCAGCTATCGATTGGGGTTAACCTGTGCAGCACAAAGCTCACGCAGAGCGTGAGCTTGCTG  
GGACTTCTGAATTTGGTCCGCGCACAAGGAGACGCTGGAACAGTGCCTAAACGCCTTGTCCACAGTGCCTGGAGAG  
GAGGTGGTGAAGTTCTGCAGGACATACTCGATGCCTTGTAAATACTGTTGAGAGAAATGATCATCCTGAGAAA  
TATGACCAGCTCGTCTTTATGAGCATTATACATTTGATTGAAACGGTGTCCGATCTCAAGTACCAACACTTTCTC  
AGTGTTCGATGTGTACATTAATGAAAGTTCTCGTTTACACTTGCCTACACCAAATTGATGGATGTCCTGCAG  
AAGAATATTAGTGAAGCGATCTCACAAAAGAAAAGTCTGCTGATGGCAATGATCTGGAGGAGAGCCAGAGGTG  
CGCCGCCTATACAAGACAACCTGTTACCTTCACTATGTGATGAAGTTTCGTGATTCGATCGCGTGTGCTTACGCC  
GAGATGAACTGCAACACGGACTATATGGACTTTGCTACCCGGCTGCAGGAGCTTCTTCGCATGTTTCATCGACATG  
ATTGGCTGTCCGAGCAATCTGCTTAAATCGGAGGGAGCGCTGCTCAAGAACTGCACATCATCGCCACAGATTTA  
ATGCAGGTCTTTGAACATGTGCGCTTAAGCATATCCATTGTGGAATCCTTGAGAAATCCCGCCGCGACGTCTT  
ACTCAGTCTAAGATGGGATGCATTAAGATTTTGTGGAGACAAAACCTGTTACGTTGCCAAGTGTGGGCCATC  
CTACTGCCCGTGTGTTGCAAAACACATCAAGGATCACCTCGAGAGCAAGGAGGAGGGAGACCGAAAACCGATATC  
TGGCAGCAAGAAAAGAATCTTTCGAAAGCCGCCAAAAGTCTAGGACAGAAAAATCCCAACTGCACACATGTGAT  
GCGGCTGCCAACAAAAAGATTGCCGAGTGCATCAACATCATGAACAACATACTGAACTTCTGTTCCGATCCGAT  
GTGGGTTCCACGCACAATGACATTCGAGACATTATGATCATCCTGTTTCGCACTGTGATGAAGGCAGTCAAGCC  
CTGGACAGGGACACGGGGTTGGTGGGCAAATTTCTTGGCATTATGCTGGGTATACTGCAGCGCATGGACGCCAG  
CACTACGAGTACTTTGTGAAGGACCTGCACCAGAGCGGCGAGTTGAAACACTTTGTATAGAGATCCTTCTGGTA  
TTTGAGGAGCTGGTGTCTCCGCACCAGAAAAGCAGTGTTCGCGGGGACTGGATGGACATGATTATGCACCAGAAT  
ACTGTGATCCTTGGTGTCTGAAGCACTCACCGTGGTCAATACGGACTACTTCTTGTGCCCGTTCGAGAAAACAG  
ATCTGGTCAACTTCTCCAGTCTATTGCTTTCTGGTCAATCCCGCTTCAATTGAATGATTTCAACGAT  
AATAAGCGGCAAATTTGTTTCGCAAGATATCGTGACATTCGCAAGGATACGGCCATGGAGATCAGGAAGATGTGG  
TTCCAGCTGGGGCAGCACAACCCAAAGTTTGTGCCGAGTTGGTGGAGCCAATACTGGAAATGAGCATGATACCG  
GAGAAGGAGCTGCGCCAGGAGACCATTCCGATCTTCTTCGACATGATGCAATGCGAGTACTATAGCTCGCGATTG

GAACACGAAAGTTACGGCGACACCAAATTCAACAATGCCACCACAAGGGTAACTTTTCCGACTTCAAGACAGC  
 GATGATTGAGAAGTTGGACATCCTGATTGGAGCTGGTAAAGGCGACGCTGAATACAAGCATCTGTTTCGAGACAAT  
 TATGCTAGAGCGCTGCGCTGCCACAACACTCTTAACGTGGATGGCACTGCCTTTGT CAGATGGTAACC

>pUASTattB\_ *mbc-RB* S905AT935AT936A (von Bsu36I bis BstEII)

CCTGAGGTCATTTTCCAGGCGATGTGCGAAATGATTTGTACCTTACCATCTGCAGTGGAGAATTCGCATGCATT  
 GCCAAGACTTCGGAGAAGAACGTTGAGGTGTCGGTGTGTGTGGCCAATGAGCAGGGATACCTTATGCCGGTGTG  
 CTGAGCATTGGAGCTGGACATCAACCCATTGATGAGTACAAATCGTTTGTATACTACCACGATGACAAGCCAAAG  
 TGGCAGGAGACTTCAAGATCCACGTGCCATTGAAGACTTTAAACAATGTCATTTGCGATTTGTGCTCAAACAT  
 CGTAGCAGTAATGAGCAGAAGGATCGAACTGAAAAACCCCTTCGGTCTGCGTATGTGCGTCTAATCCCGGCCAA  
 GGGACAACCATCACGCAGGGTCAACATATCCTGGCCGTTTACAAAATTGATCACAAAAGTACGACAAAACAGTA  
 GCCAATTGTTATTTAGAACTTCCAGCCACGGTTGAGAGCTGCAAGGTGCAAAGCCTTCTATCGGTGGACTTACT  
 CTCTTGCCAAAGGATCAGCTATCGATTGGGGTTAACCTGTGCAGCACAAAGCTCACGCAGAGCGTGAGCTTGCTG  
 GGACTTCTGAATTGGTCGGCGCACAAGGAGACGCTGGAACAGTCGTAACCGCCTTGCCACAGTGCCTGGAGAG  
 GAGGTGGTGAAGTTCCTGCAGGACATACTCGATGCCTTGTTTAATACTGGTGGAGAATGATCATCCTGAGAAA  
 TATGACCAGCTCGTCTTTATGAGCATTATACATTTGATTGAAACGGTGTCCGATCTCAAGTACCAACACTTTCTC  
 AGTGTCTCGATGTGTACATTAATGAAAGTTCTCGTTTACACTTGCTACACCAAATTGATGGATGTCCTGCG  
 AAGAATATTAGTGAAGCGATCTCACAAAAGAAAAGTCTGCTGATGGCAATGATCTGGAGGAGAGCCAGAGTG  
 CGCCGCTTACAAGACAACCTCGTTACCTTCACTATGTGATGAAGTTCTGATTCGATTCGATCGCGTGTGCTTACGCC  
 GAGATGAACTGCAACACGGACTATATGGACTTTGCTACCCGGCTGCAGGAGCTTCTTCGCATGTTTCATCGCATG  
 ATTGGCTGTCCGAGCAATCTGCTTAAATCGGAGGGAGCGCTGCTCAAGAATCTGCACATCATCGCCACAGATTTA  
 ATGCAGGTCTTTGAACATGTGCGCTTAAGCATATCCATTGTGAAAATCCTTGAGAAAATCCCGCCGCGACGTCTT  
 ACTCAGTCTAAGATGGGATGCATTAAGATTTTGTGGAGACAAAACCTGTTACGTTGCCAAGTGTGGGCCATC  
 CTACTGCCCGTGTGTTTGCAAACACATCAAGGATCACCTCGAGAGCAAGGAGGAGGGAGGAGGAGCGAAAACCGATATC  
 TGGCAGCAAGAAAAGAATCTTTGAAAAGCCGCCAAAGTCTAGGACAGAAAAAATCCCAACTGCACACATGTGAT  
 GCGGCTGCCAACAAAAAGATTGCCGAGTGCATCAACATCATGAACAACATACTGAAACTTCTGTTCCGATCGGAT  
 GTGGTTCCACGCACAATGACATTCGAGACATTATGATCATCCTGTTTCGCACTGTGATGAAGGCAGCTCACGCC  
 CTGGACAGGGACACGGGGTGGTGGGCAAATCTTTGCCATTATGCTGGGTATACTGCAGCGCATGGACGCCAG  
 CACTACGAGTACTTTGTGAAGGACCTGCACCAGAGCGGCGAGTTGAAACACTTTGTCATAGAGATCCTTCTGGTA  
 TTTGAGGAGCTGGTGTCTCCGCACCAGAAAGCAGTGTTCGCGGGACTGGATGGACATGATTATGCACCAGAAT  
 ACTGTGATCCTTGGTGTCTGAAGCATCTCACCGTGGTCACTACGGACTACTTCTGTGCCGTTTCGAGAAACAG  
 ATCTGGTCAACTTCTCCAGTGCTCTATTGCCTTTCTGGTGCAATCCCCGTTCAATTGAATGATTTCAACGAT  
 AATAACCGCAAATTGTGTTTCGCAAGATATCGTGACATTTCGCAAGGATACGGCCATGGAGATCAGGAAGATGTGG  
 TTCCAGCTGGGGCAGCACAAACCAAGTTTGTGCCGAGTTGGTGGAGCCAATACTGGAAATGAGCATGATACCG  
 GAGAAGGAGCTGCGCCAGGAGACCATTCCATCTTCTTCGACATGATGCAATGCGAGTACTATAGCTCGCGATTG  
 GAACACGAAAGTTACGGCGACACCAAATTCAACAATGCCACCACAAGGGTAACTTTTCCGACTTCAAGACAGCG  
 ATGATTGAGAAGTTGGACATCCTGATTGGAGCTGGTAAAGGCGACGCTGAATACAAGCATCTGTTTCGAGACAAT  
 ATGCTAGAGCGCTGCGCTGCCACAACACTCTTAACGTGGATGGCACTGCCTTTGT CAGATGGTAACC

**Anhang 3: Sequenz der phosphomutanten UAS-Konstrukte (von der Bsu36I- bis zur BstEII-Schnittstelle)**

Die dargestellte Sequenz wurde aus den überlappenden Sequenzen mehrerer Sequenzierungen zusammengesetzt und zeigt den Teil der kodierenden Sequenz der phosphomutanten UAS-Konstrukte zwischen den Restriktionsschnittstellen von Bsu36I (magenta) bis BstEII (cyan). Exon 9 ist in grün dargestellt. Die neu hinzugefügte Alel Schnittstelle ist unterstrichen. In gelb sind Nukleotide markiert, die während der Klonierung verändert wurden um neue Schnittstellen zu generieren. In violett sind die Mutationen markiert, die zum Austausch der phosphorylierbaren Aminosäuren führen. In rot sind Nukleotide markiert, die von der annotierten Sequenz von *mbc-RB* (NM\_001260338) abweichen. Bei allen Austauschen (rot und gelb) handelt es sich um stille Mutationen, die zu keinem Aminosäureaustausch führen.



(A)

```

>mbc-RB   TACTGCCCGTGTCTGCAAACACATCAAGGATCACCTCGAGAGCAAGGAGGAGGGAGACTCGAAAACCGATATCTGGCAGCAAGAAAAGAATCTTTCCG
>5108rev   TGCCCGTGTCTGCAAACACATCAAGGATCACCTCGAGAGCAAGGAGGAGGGAGACTCGAAAACCGATATCTGGCAGCAAGAAAAGAATCTTTCCG
>5107rev   TACTGCCCGTGTCTGCAAACACATCAAGGATCACCTCGAGAGCAAGGAGGAG-----

>mbc-RB   AAAGCCGCCAAAAGTGCTTGGACAGAAAAATCCCAACTGCATACATGTGATACGACTGCCAACAAAAAGATTGCCGAGTGCATCAACATCATGAACAA
>5108rev   AAAGCCGCCAAA
>5107rev   -----ATTGCCGAGTGCATCAACATCAT

>mbc-RB   CATACTGAAACTTCTGTTCCGATCGGATGTGGGTTCCACGCACAATGACAT

```

(B)

```

>GJ22588  GTGTTCTGCAAGCACATCAAGGATCATCTCGAGAGCAAGGAGGAGGGTACTCGAAAACCGATATCTGGCAGCAAGAAAAGAATCTTTTCGAAAGCCGC
>5110rev   TGCAAGCACATCAAGGATCATCTCGAGAGCAAGGAGGAGGGTACTCGAAAACCGATATCTGGCAGCAAGAAAAGAATCTTTTCGAAAGCCGC
>5109rev   GTGTTCTGCAAGCACATCAAGGATCATCTCGAGAGCAAGGAGGAG-----

>GJ22588  TAAAGTGCTCGGACAGAAAAATCCCACCTGCACACACGAGAAACGACTGCCAATAAAAAAGATCGCCGAGTGCATCAACATAATGAACAACATCCTGA
>5110rev   TAAAGTGCTCGGACAGTAAAAATCCCACCTGCACACACGAGAAACGACTGCCAATAAAAAAGATCGCCGAGTGCATCAACATAATGAACAAC
>5109rev   -----ATCGCCGAGTGCATCAACATAATGAACAACATCC

>GJ22588  AGCTGCTCTATCGCCCGGACGTGGGACCCACGCATAAC

```

#### Anhang 4: Sequenzierung der PCR-Produkte (Dmel und Dvir)

(A) Alignment zwischen *mbc-RB* (Bereich zwischen den Primern **Mbc-Exon8** und **Mbc-Exon10**) und den Sequenzierungen der beiden Banden (5108rev: ≈250 bp und 5107rev: ≈130 bp), Exon 9 ist grün markiert. (B) Alignment zwischen GJ22588 (Bereich zwischen den Primern **Dvir Exon8-fwd** und **Dvir Exon9-rev**) und den Sequenzierungen der beiden Banden (5110rev: ≈250 bp und 5109rev: ≈130 bp). Das alternativ gespleißte Exon (grün) wurde bisher nicht annotiert.

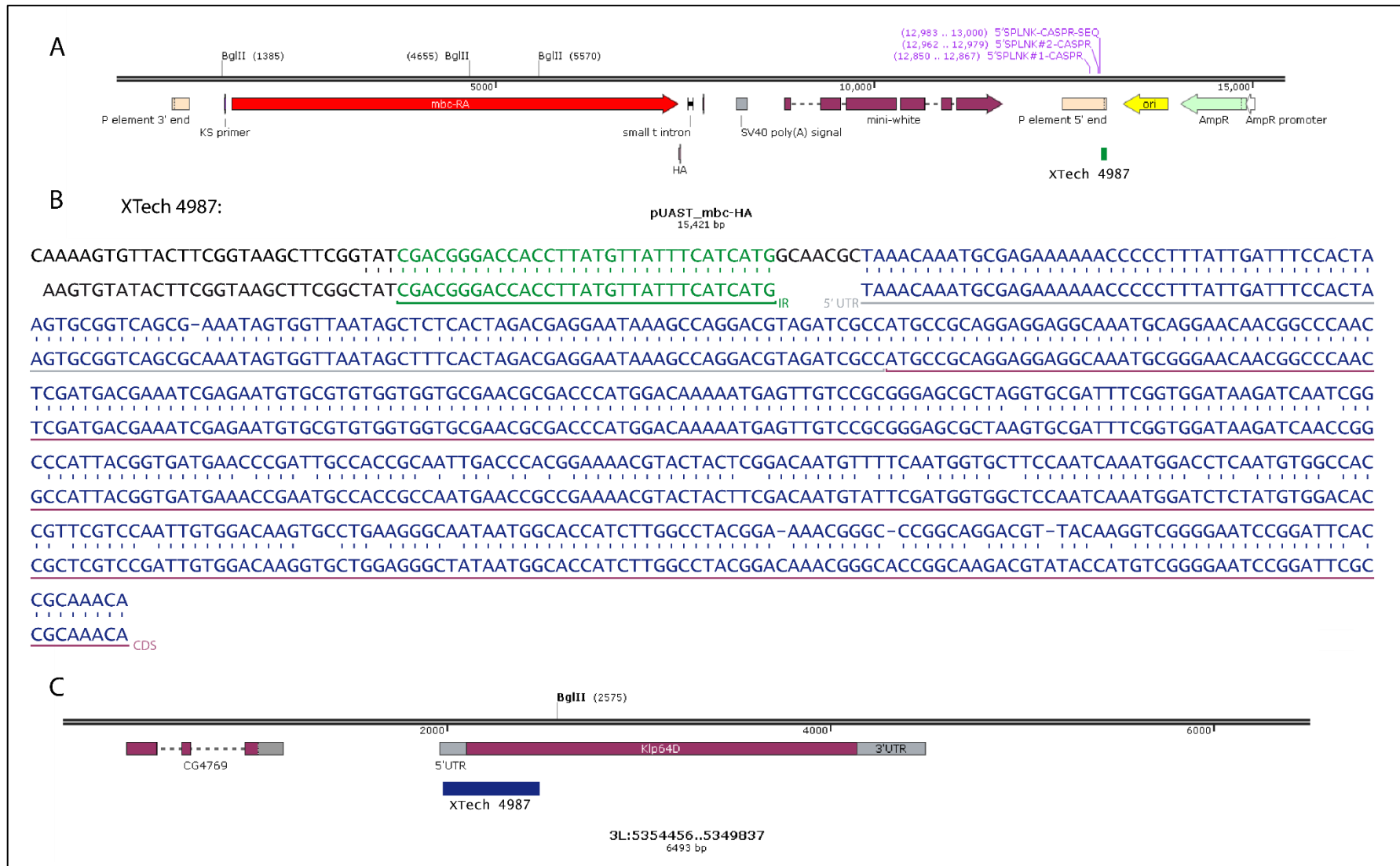
	<b>Exon junction</b>															
<b>Stadium</b>	<b>8/9</b>	<b>9/10</b>	<b>8/10</b>	<b>∅</b>	<b>1/2</b>	<b>2/3</b>	<b>3/4</b>	<b>5/6</b>	<b>6/7</b>	<b>7/8</b>	<b>10/11</b>	<b>11/12</b>	<b>12/13</b>	<b>13/14</b>	<b>14/15</b>	<b>14/15</b>
1-4	64	82	43	103,75	64	57	44	115	76	58	95	171	152	114	137	162
4-9	6	3	126	92,25	71	60	34	139	63	68	82	119	82	150	130	109
9-11	14	28	515	362,67	231	187	155	374	244	273	299	433	481	546	547	582
11-12	30	35	271	232,00	153	116	95	255	187	152	172	327	326	343	345	313
12-13	21	33	230	190,83	123	94	118	219	139	180	210	235	232	251	233	256
13-15	16	23	178	153,17	94	83	55	188	111	128	145	214	203	214	177	226
15-16	27	49	227	222,08	134	155	115	222	170	303	204	226	239	334	290	273
16	8	25	95	71,42	48	34	23	100	38	46	54	111	67	68	106	162
17(i)	25	28	93	101,92	78	47	52	125	53	80	82	134	126	129	147	170
17(ii)	22	35	80	92,17	55	40	35	110	81	67	61	123	99	173	130	132
17(iii)	16	18	24	35,42	20	18	10	65	26	23	24	36	39	57	53	54
17(iv)	26	35	58	63,58	52	42	35	48	41	68	60	74	73	109	92	69

#### Anhang 5: Read counts für alle *Exon junction* zu verschiedenen Zeitpunkten während der Embryonalentwicklung

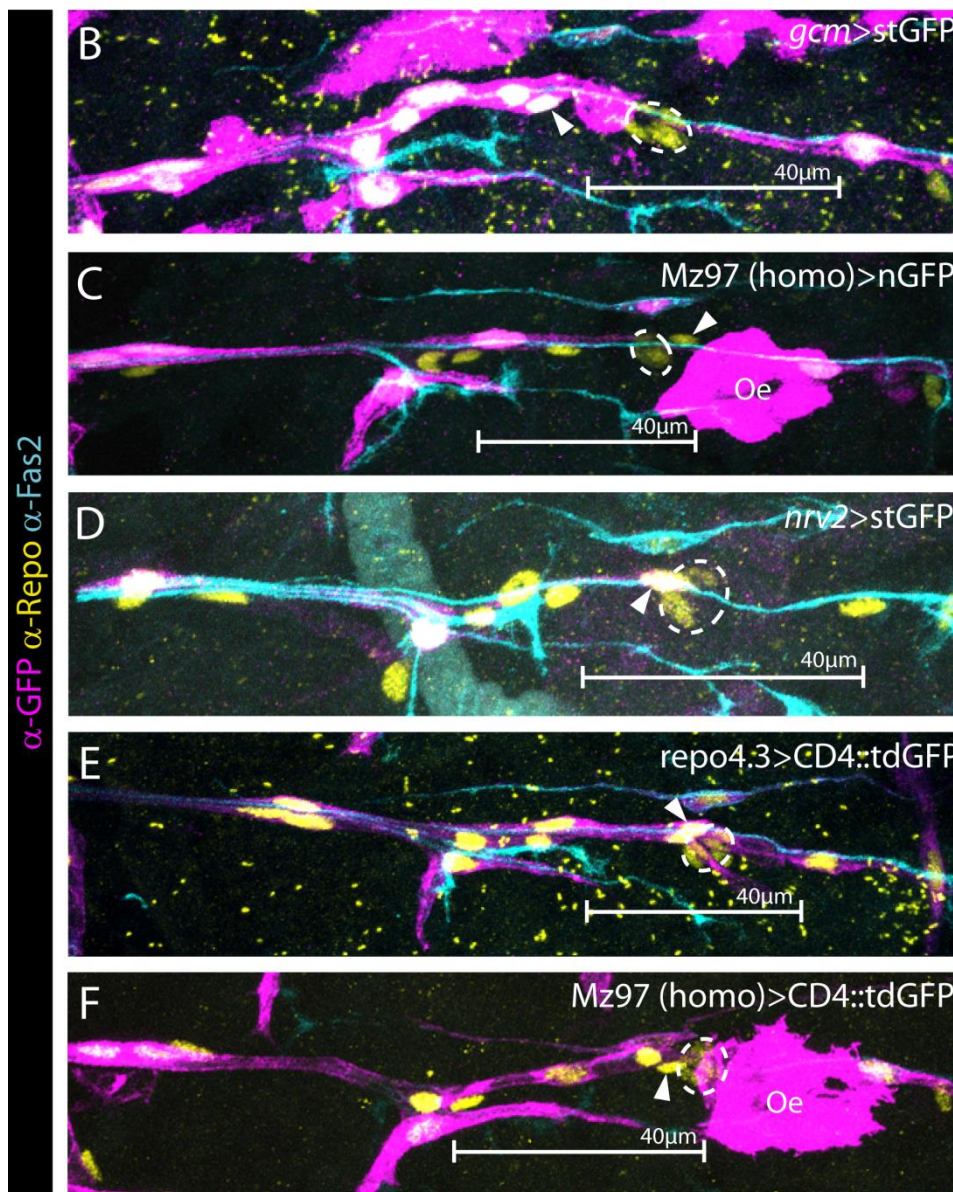
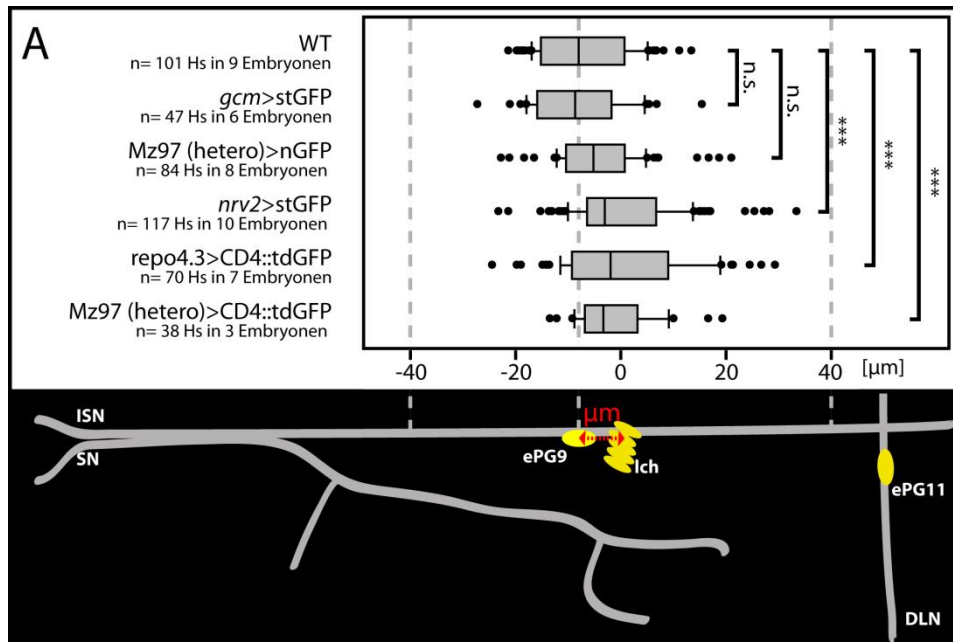
Alle Daten sind der *Library* modENCODE\_mRNA-Seq\_U\_junctions (Graveley et al., 2011) entnommen.

#### Anhang 6: Integrationsort von UAS-*mbc-RA* (siehe nächste Seite)

(A) Dargestellt ist der linearisierte Vektor pUAST\_*mbc-HA*, nach der Integration ins Genom bilden *P element 3' end* und *P element 5' end* die Grenzen zur genomischen DNA. In violett ist die Position der für die Splinkerette-PCR benutzten Primer (5'SPLINK#1-CASPR und 5'SPLINK#2-CASPR) sowie der Primer für die anschließende Sequenzierung des PCR-Produkts (5'SPLINK-CASPR-SEQ) gezeigt. Außerdem sind die Bgl II-Schnittstellen innerhalb des Plasmids angegeben. (B) Sequenzalignment zwischen der Sequenz des PCR-Produkts der Splinkerette-PCR und dem 5' Ende des Vektors bzw. der Integrationsstelle des Vektors im Genom. Die grün markierte Sequenz konnte dem *inverted repeat* (IR), also dem äußersten Rand des Integrierten Vektors zugeordnet werden (in A als grüner Balken dargestellt), darauf folgen 7 Basen die keiner Sequenz zugeordnet werden können. Die darauf folgende 490 Basen lassen sich dem Locus von *Klp64D* zuordnen (ab Base 27 im 5' UTR bis Base 378 der CDS, in blau dargestellt). (C) Dargestellt ist die genomische Region um *Klp64D*, die in B blau dargestellt Sequenz entspricht dem Bereich des blauen Balkens. Außerdem ist die Restriktionsschnittstelle, die für das *mapping* des P-Elements genutzt wurde (Bgl II) angegeben.



Anhang 6: Integrationsort von UAS-*mbc-RA* (Legende siehe vorherige Seite)



## Anhang 7: Auswirkungen von GFP Expression auf die Migration der ePG bei verschiedenen Gal4-Linien

(A) Um die Migration der ePG quantitativ zu analysieren, wurde der Abstand zwischen dem Zellkern von ePG9 und dem ICh gemessen. Die Messwerte für WT (Median = -8,02  $\mu\text{m}$ ), *gcm*>nGFP (Median = -8,68  $\mu\text{m}$ ), *Mz97* (hetero)>nGFP (Median = -5,2  $\mu\text{m}$ ), *nrv2*>nGFP (Median = -3,04  $\mu\text{m}$ ), *repo4.3*>CD4::tdGFP (Median = -1,94  $\mu\text{m}$ ), *Mz97* (hetero)>CD4::tdGFP (Median = -3,32  $\mu\text{m}$ ) sind als Boxplot dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit einem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test überprüft. \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; n.s.: nicht signifikant. (B-F) Abgebildet ist jeweils ein abdominales Hemisegment (Filetpräparat) von Embryonen im späten Stadium 16. Angefärbt sind sowohl die Zellkerne (gelb) als auch die Membranen (magenta) der ePG, sowie die peripheren Nerven (cyan). Markiert sind das ICh (gestrichelter Kreis) und ePG9 (Pfeilspitze). Bei allen Bildern ist anterior oben und ventral links.

## Anhang 8: Sequenzierung der PCR-Produkte (*D. spec*) (nächste Seite)

Alignment zwischen *ARP2\_G366* (Dpux) (Bereich zwischen den Primern **Dpux fwd** und **Dpux rev**, Exon 5 ist grün markiert) und den Sequenzierungen der beiden Banden (5112rev:  $\approx 250$  bp und 5111rev:  $\approx 130$  bp). Da die Nukleotidsequenz der beiden Banden nicht genau zur annotierten Sequenz von *ARP2\_G366* passt, ist hier zusätzlich die kodierte Aminosäuresequenz dargestellt, die fast vollständig mit *ARP2\_G366* übereinstimmt (nicht übereinstimmende Aminosäuren sind rot dargestellt). Vermutlich wurde für die cDNA Synthese nicht *Daphnia pulex*, sondern eine andere nah verwandte Spezies (*D. spec*) verwendet, was die Unterschiede in der Sequenz erklärt.

```

>Dpux TAGTCAAGCGCGTCAAAGAGTTGCTCACTGGTCCGCAGGAGGGTGGATGGGGAGGCTATAAAGTGGAACGCGCCACATCGAGAGGTCCAAGAGCAA
    V K R V K E L L T G P Q E G G W G G Y K V E L R H I E R S K S K
>5112rev TAGTCAAGCGCGTCAAAGAGTTGCTCACTGGTCCGCAAGAGGGTGGATGGGGCTGTATAAAGTGGAACCCGCAACATCGAGAAAATCCAAGAGTAAA
    V K R V K E L L T G P Q E G G W G C Y K V E L R N I E K S K S K
>5111rev TAGTCAAGCGCGTCAAAGAGTTGCTCACTGGTCCGCAAGAG-----
    V K R V K E L L T G P Q E

>Dpux GCGGCTCGGCTTCTGGGCGAACAAAGTCGATCAGAACGCATTGTCTCAAAAAGCCGCGTCCGCGGGGAGACGAGGGCCCAAGAGGTTGAGATGAGCGT
    A A R L L G E Q V D Q N A L S Q K A A V A G E T R A Q E V E M S V
>5112rev GCGGCCCCGGCTCCTTGGCGAGCAAGTCGATCAGAACGCATTGTCCCAAAAAGCCGTTGTCCGCGGAGAGACAAGGGCACAAGAGGTGGAAATGAGCGT
    A A R L L G E Q V D Q N A L S Q K A V V A G E T R A Q E V E M S V
>5111rev -----GTGGAATGAGCGT
                                         V E M S V

>Dpux GACTGTCATGTGCGACGTGATGCAAATCTCTACCGGAAAGGATGTCGGTGCACCCATAAC
    T V M C D V M Q I L Y R K D V G A T H N
>5112rev GACGGTC
    T V
>5111rev GACGGTC
    T V

```

Anhang 8: Sequenzierung der PCR-Produkte (*D. spec*) (Legend siehe vorherige Seite)

Spezies	Gen	Isoform-RA (RefSeq ID)	Isoform-RB (RefSeq ID)	Quelle
<i>D. sechellia</i>	GM26532	XM_00203262	potenziell	flybase.org
<i>D. melanogaster</i>	mbc	NM_057796	NM_001260338	flybase.org
<i>D. erecta</i>	GG11230	XM_001982054	potenziell	flybase.org
<i>D. pseudoobscura</i>	GA10288	XM_001358605	XM_003736501	flybase.org
<i>D. virilis</i>	GJ22588	XM_002054771	Experimentell gezeigt	flybase.org
<i>D. grimshawi</i>	GH23629	XM_001994221	Potenziell	flybase.org
<i>P. olivacea</i>	mbc-like	Experimentell gezeigt	Experimentell gezeigt	Sarah Brunck, Institut für Molekulargenetik, JGU
<i>A. gambiae</i>	AGAP004320	-	potenziell	vectorbase.org
<i>C. quinquefasciatus</i>	CPIJ002759	potenziell	-	vectorbase.org
<i>T. castaneum</i>	TC12454	-	-	<a href="http://bioinf.uni-greifswald.de/gb2/gbrowse/tcas">http://bioinf.uni-greifswald.de/gb2/gbrowse/tcas</a>
<i>A. pisum</i>	LOC100168224	XM_003248197.1	XM_001948664.2	aphidbase.com
<i>P. humanus</i>	PHUM252200	-	potenziell	vectorbase.org
<i>D. pulex</i>	ARP2_G366	Experimentell gezeigt	ID: hxAUG25p1s9g165t1	<a href="http://wfleabase.org/cgi-bin/gbrowse/daphnia_pulex/">http://wfleabase.org/cgi-bin/gbrowse/daphnia_pulex/</a>
<i>C. elegans</i>	ced-5	WormBase ID: C02F4.1	nicht vorhanden	wormbase.org
<i>H. sapiens</i>	DOCK1	Gene ID: 1793	nicht vorhanden	www.ncbi.nlm.nih.gov
<i>H. sapiens</i>	DOCK2	Gene ID: 94176	nicht vorhanden	www.ncbi.nlm.nih.gov
<i>H. sapiens</i>	DOCK5	Gene ID: 80005	nicht vorhanden	www.ncbi.nlm.nih.gov

**Anhang 9: Übersicht aller verwendeten Sequenzdaten**

```

ced-5      -----MATTGFYYAIVQYTFEDPLPSCDAPRLELFIGDRICVYGQHGEGWYGRKFDE
DOCK2     --MAPWRKAD--KERHGVAIYNF----QGSGAPQLSLQIGDVVRIQETCGDWYRGYLIKH
DOCK1     -----MIFYNY----DARGADELSLQIGDVTVHILETEYEGWYRGYTLRK
DOCK5     --MARWIPTK--RQKYGVAIYNY----NASQDVVELSLQIGDVTVHILEMTEYEGWYRGYTLQN
Dme1(A)   --MSVWSDCNAKQAEFGIAKCNFD---QESKPHRLNLDVGDVAIILKETTTHWYGYRQKA
Dme1(B)   --MSVWSDCNAKQAEFGIAKCNFD---QESKPHRLNLDVGDVAIILKETTTHWYGYRQKA
Poli(A)   --MDLWKSIG-SQYLLGIAK-NNF---HQSKSHRLDLVGDVCVIVIRESNDWYGYKIKKN
Poli(B)   --MDLWKSIG-SQYLLGIAK-NNF---HQSKSHRLDLVGDVCVIVIRESNDWYGYKIKKN
Agam(A)   -----MT-T----SPTKANYT---ALEKQHHLDLVGDVVIEQESYHWYGYCNSC-
Cqui(A)   --MVRWSVKC-V----KMTKANYN---ESGKEHRLLELDLGDVSVVVLQEAASWYGYGYSKSR
Dpux(B)   --MTQWIPTP-EKDRLGVVVTYNY----QHDGEYCLKLEVGDTVHNLCEEFWFYGYSVRN
Apim(A)   MTDENWTHVS-DRKRYGIAIYNY----LQSGPHRIKLLAGECVHVL EESAEWYGYGFSFKN
Apim(B)   MTDENWTHVS-DRKRYGIAIYNY----LQSGPHRIKLLAGECVHVL EESAEWYGYGFSFKN
Phum(A)   --MLYFTSFD-YNPINNNSIYNY----LETKEKHLSLHVGDTLILQQELGDWYLGCAQKN
Tcas(A)   --MSVWETVP-DELSYGIATYNF----AADSDFKLELTVGDSLHILDQEENWYGYLIHD
Tcas(B)   --MSVWETVP-DELSYGIATYNF----AADSDFKLELTVGDSLHILDQEENWYGYLIHD

```

. :.\* \* : \*

```

ced-5      KNGKCGIFPLAYVQIVQKSMFVSTS-----DGYLVVDEISRVINEWWTIKELMVETTR
DOCK2     K-MLQGI FPKSFIHIKEV TVEKRRNTENIIPAEIPLAQEVTTTLWEWGSIWKQLYVASK-
DOCK1     K-SKKGIFPASYIHLKEA IVEGKGQHETVIPGDLPLIQEVTTTLREWSTIWRQLYVQDN-
DOCK5     K-SKKGIFPETYIHLKEA TVEDLGOHETVIPGELPLVQELTSTLREWAVIWRKLYVNNK-
Dme1(A)   K-EIRGIFPKSYIHLCEY-N---IVNGEYCIQRTDIVEEITKVLLLEWGSIAKDYFLT--
Dme1(B)   K-EIRGIFPKSYIHLCEY-N---IVNGEYCIQRTDIVEEITKVLLLEWGSIAKDYFLT--
Poli(A)   D-LQKGI FPKSYVQLIADV T---IIKNEYVIKRSEIVDEITTVLKEWHEHFKRFFLFNN-
Poli(B)   D-LQKGI FPKSYVQLIADV T---IIKNEYVIKRSEIVDEITTVLKEWHEHFKRFFLFNN-
Agam(A)   S-GATGIFPKAYVHLVKN T---SRDGLVIKRSEIVEEITTVLREWQYL YRRLYLST--
Cqui(A)   P-SVRGIFPKSYVHIVESRQ---VKGGELQIVRSEIVEEITTVLGEWRHLYRRFYLT--
Dpux(B)   R-ALKGIYPKSFIHIQPSFIEKTAIGEQTACQSPVVQEVTSVLREWQIGQELYRTH--
Apim(A)   K-STHGI FPKKFVHIMDN VVEKFGPAELTVLKQPQIVHELTSVIREWGAIWKQLYISH--
Apim(B)   K-STHGI FPKKFVHIMDN VVEKFGPAELTVLKQPQIVHELTSVIREWGAIWKQLYISH--
Phum(A)   K-NLKGI FPKSYIKIKKI KD-----IQQPIVQEITTVVREWGTILKDLVYKN--
Tcas(A)   R-HKRGIFPKSYVHIKPC SVDRTGPTLTFNFKEPTIVQEITSVLEWAPHWKNLYVKN--
Tcas(B)   R-HKRGIFPKSYVHIKPC SVDRTGPTLTFNFKEPTIVQEITSVLEWAPHWKNLYVKN--

```

\*\*:\* : : : : : . \* : : : \* :

```

ced-5      IGSFEDLMSDFNELLIIKTKIESGGIPIEELSKLRLRVSKLVDRGNTILGQDVVIRNEEG
DOCK2     KERFLQVQSMMYDLMEWRSQILSGTLPKDELKELKQKVTSKIDYGNKILELDLIVRDEG
DOCK1     REMFRSVRHMIYDLIEWRSQILSGTLPQDELKELKKKVTAKIDYGNRMLDLDLIVRDEG
DOCK5     LTLFRQLQMQTYSLEIWRSQLSGTLPKDELAELKKKVTAKIDHG NRMLDLDLIVRDDNG
Dme1(A)   NPSFPKIRRKMNELNNNRAALISGNLPLDEVKVKLLATNQIDTG NKLGLDMVVRDESG
Dme1(B)   NPSFPKIRRKMNELNNNRAALISGNLPLDEVKVKLLATNQIDTG NKLGLDMVVRDESG
Poli(A)   NLGVRLLRGKMLELILKRLTQMLSGNLPVDAMKDTLKLATSEIDTG NKILELDMVVRDDNG
Poli(B)   NLGVRLLRGKMLELILKRLTQMLSGNLPVDAMKDTLKLATSEIDTG NKILELDMVVRDDNG
Agam(A)   HPSFKLIQSKMLELIRLRSQILSGNLPVDEMKNILKATSEIDTG NKLINLDMVVRDDGG
Cqui(A)   HPDSKTIRTKMLELIRLRSQILSGNLPVDEMKDRLKATSEIDTG NKLIRLDMVVRDECG
Dpux(B)   DHKWRAVYLLMRDLMSNRKMLTGTLTDELRELTHALTSQIDFG NNLGLDMVVRDELG
Apim(A)   NSNFKNVKNKIYELINFRSKILSGTLPVDELKEVQRLATSTIDIGNK LGLDMVVRDEQG
Apim(B)   NSNFKNVKNKIYELINFRSKILSGTLPVDELKEVQRLATSTIDIGNK LGLDMVVRDEQG
Phum(A)   NKKVKDIERRIYELVFRSEILSGALPVDEMKKMKRVAARIDFG NHILGLDMVVRDDDEC
Tcas(A)   SKHFEAIKNQIYDLITHRSKIISGTLPVDELKRITKQVTEEIDKGNKTLRLDLIVRNKNG
Tcas(B)   SKHFEAIKNQIYDLITHRSKIISGTLPVDELKRITKQVTEEIDKGNKTLRLDLIVRNKNG

```

: . \* : : : \* : : : : \* \* \* \* : : \* :

```

ced-5      VPLDVESLSLLRTEAHISSKGRVGLMREKP-----ENVTINDSFS
DOCK2     NILDPDNTSVISL FHAHEEATDKITERIKEEMSKDQ-----PDYAMYRSISSPHTS
DOCK1     NILDPELTSTISL FRAHEIASKQVEERLQEEKSQKQN-----IDINRQAKFAATPSLA
DOCK5     NILDPDETSTIAL FKAHEVASKRIEEKIQEEKSILQN-----LDLRGQSIFSTIHTYG
Dme1(A)   DILDNTAICTTELYEQMHAVQRIDKANRLS-SERG-----TTRTPNKYSHN
Dme1(B)   DILDNTAICTTELYEQMHAVQRIDKANRLS-SERG-----TTRTPNKYSHN
Poli(A)   NKLDINQSTTELYQQHVAQSLRIKRATQPDLNKNR-----TSKTMNKFSHN
Poli(B)   NKLDINQSTTELYQQHVAQSLRIKRATQPDLNKNR-----TSKTMNKFSHN
Agam(A)   NIVDIERTSTTQLYEHHLNAVDRIKRANTSS-SKNR-----NLDIVNRHSHN
Cqui(A)   NILNIDKTSTTQLYEHHLNAVDRIKRASVSR-RFVG-----VRRTMNRHSHN
Dpux(B)   SILNPDSASVVQLYRHHEQASQRICKAVASSNNMNGITNTIGMGP MNPTKIKLANRHS
Apim(A)   NILNPLHTPTIQLYKHHEIATERIQNSHTAGVYK-K-----SIQQINLYNYT
Apim(B)   NILNPLHTPTIQLYKHHEIATERIQNSHTAGVYK-K-----SIQQINLYNYT
Phum(A)   NILNPDTTSTVSLYWKHQRATENIKRAFEETHRS-----KPQIINNQYSHT
Tcas(A)   NVIEPEKTSTLQMYYLHKKATERMSRTNKNETK-HN-----HPKTAIQYSNI
Tcas(B)   NVIEPEKTSTLQMYYLHKKATERMSRTNKNETK-HN-----HPKTAIQYSNI

```

: : : \* : . :



```

ced-5      LLLSIKSVELHCKYSCEISISLYDLDDKMFTTDSYTFWNSGSGKH-----TDLNLKAL
DOCK2     LYVFNVRNFVCRIGEDAELFMSLYDPNKQTVISENYLVRWGSRGFPK---EIEMLNLLKVV
DOCK1     LFVNLKNVVKIGEDAEVLMSLYDPVESKFISENYLVRWSSSGLPK---DIDRLHNLRAV
DOCK5     LYVNFKNFVKNIGEDAELFMALYDPDQSTFISENYLIRWGSNGMPK---EIEKLNLLQAV
Dme1(A)   ILLHVNAFVCKFQEDSDLLFTLFDGETHKKPISENYVVKWSRTGIAR---DTDQIDNNRVL
Dme1(B)   ILLHVNAFVCKFQEDSDLLFTLFDGETHKKPISENYVVKWSRTGIAR---DTDQIDNNRVL
Poli(A)   LLISVHNFVCKVNEDETELLFTLYDGDEMKAITENYLKWSRQGIAP-----FFNNIRML
Poli(B)   LLISVHNFVCKVNEDETELLFTLYDGDEMKAITENYLKWSRQGIAP-----FFNNIRML
Agam(A)   LLLSVHNFVCRLEDTEILFTLYDGDEMRAITENYVVKWSRQGMMAA---DLDQFNNIKVL
Cqui(A)   LLLSVHNFVCRLEDTEILFTLYDGDEMRAITENYVVKWSRQGVAA---DLDQFNNIKVL
Dpux(B)   FFVAVRNFVCRIGEDTELLCLYDAKEWKPLTENYVLRWSRMGLSM---DLDL LGNMVRVL
Apim(A)   VYLSVHNFVCKIIDDAELLLTLYDAKSGKSFSENFARWATNKMDQGSQTDIFHNFRAL
Apim(B)   VYLSVHNFVCKIIDDAELLLTLYDAKSGKSFSENFARWATNKMDQGSQTDIFHNFRAL
Phum(A)   LFLCVRNFVCKINEDAELLMCLSDGT--VPFTENYVVRWSKEGFVR---DINQLHSLRVL
Tcas(A)   FIVAVKNFTCKMNEDAELMSLYDGKEYKSITENYVVRWSKDGLMC---DLDQMYNLRVM
Tcas(B)   FIVAVKNFTCKMNEDAELMSLYDGKEYKSITENYVVRWSKDGLMC---DLDQMYNLRVM
. : . . . . : : * * : : . *

```

```

ced-5      FTDFAKEDIQKK-YLMVTRVVHVSPIESSNATMRKHGH-----
DOCK2     FTDLGNKDLNRDKIYLICQIVRVGKMDLKDGTGAKK-----
DOCK1     FTDLGSKDLKREKISFVCQIVRVGMELRDNNTRK-----
DOCK5     FTDLSSMDLIRPRVSLVCQIVRVGHMELKEG--KK-----
Dme1(A)   FTDLSKSDLAIAKMYLVCYAIRIGSMEFKDSAESKRTSM-SIANSMLNASSRK-----
Dme1(B)   FTDLSKSDLAIAKMYLVCYAIRIGSMEFKDSAESKRTSM-SIANSMLNASSRK-----
Poli(A)   FTDLSSMDLHRNRIYLVAYVIRVGMADGRESDSRR-VSV---ASAVLSKRSST-----
Poli(B)   FTDLSSMDLHRNRIYLVAYVIRVGMADGRESDSRR-VSV---ASAVLSKRSST-----
Agam(A)   FTDLSGNDLSRNKIYLVAYVVRIGAMDGKDTDLRR-SSM---ANSTGSGSYKSHRNHLTT
Cqui(A)   FTDLSGNDLSRNRIFLVAYVVRVGAMEGKDTDSRR-SSM---ANSVGSSSVGKTKGQLTS
Dpux(B)   YTDLGSRDLARERVFLICYVIRVGNMDIRPEDPRR-----
Apim(A)   FTDLGTRDLTREKVYLVCIYIIRIGGMDNDSNSKKS-----
Apim(B)   FTDLGTRDLTREKVYLVCIYIIRIGGMDNDSNSKKS-----
Phum(A)   FTDLGSRDLEKEKVYLVQVIRLGAMEYKETEKNLKRSSHINN-----
Tcas(A)   FTDLGKRDLEREKIYLVCIYVVRVGAMEKPEPDHRR--SSVSVVN-----
Tcas(B)   FTDLGKRDLEREKIYLVCIYVVRVGAMEKPEPDHRR--SSVSVVN-----
:*:. * : : : :

```

```

ced-5      -----HEATIPKTFYCRQSYASDIMEMSSIFLAG
DOCK2     -----CTQGLRRPFGVAVMDITDIIK GK
DOCK1     -----LTSGLRRPFGVAVMDVTDIINGK
DOCK5     -----HTCGLRRPFGVAVMDITDIIHGK
Dme1(A)   -----ASQLSVSSSSGSSSSNGEYIIRRPFGVACKDLTPFINKS
Dme1(B)   -----ASQLSVSSSSGSSSSNGEYIIRRPFGVACKDLTPFINKS
Poli(A)   -----QSQNSSSLNLDLMRRPFGVAALDLTPIIKKA
Poli(B)   -----QSQNSSSLNLDLMRRPFGVAALDLTPIIKKA
Agam(A)   QMSNPSSPGPGGGAGGSSSTSSSGTPSIGSCHSSASNEFHMRPFGVATLDLQPIIKRS
Cqui(A)   QMSNPASPGLNSSG-----TESGGHEQQMRRPFGVATMDLKPIIKRS
Dpux(B)   -----QTTALRRPCGVAVMDVTDYLSGR
Apim(A)   -----WATTQIRRPWGVAAMDITLYFTQK
Apim(B)   -----WATTQIRRPWGVAAMDITLYFTQK
Phum(A)   -----KKSYSLGSDCMRRPFGVAAMDITLYSGK
Tcas(A)   -----KK---GTTDGIRRPFGVAAMEITHFMNGS
Tcas(B)   -----KK---GTTDGIRRPFGVAAMEITHFMNGS
* : . : :

```

```

ced-5      VGHEAK--ERVIFLNRE-----PELPLSLKAYHATNRIKPN
DOCK2     AESDEEKQHFIPFHPVT-----AENDFLHSLLGKVI-A---SKG
DOCK1     VD-DEEKQHFIPFQVA-----GENDFLQTVINKVI-A---AKE
DOCK5     VD-DEEKQHFIPFQIAMETYIRQRQLIMSPITSHVIGENEPLTSVLNKVI-A---AKE
Dme1(A)   DDFRGN--IDLPFIMCE-----K-ETLDGTLRKLII-A---NKD
Dme1(B)   DDFRGN--IDLPFIMCE-----K-ETLDGTLRKLII-A---NKD
Poli(A)   EDFKKDTQLSMPFVPC-----K-DTLELTLRKLII-T---NKD
Poli(B)   EDFKKDTQLSMPFVPC-----K-DTLELTLRKLII-T---NKD
Agam(A)   EDFKSDTQLKMPFIPE-----K-EPLETTLRKLII-T---NKD
Cqui(A)   EDFKSDTQLKMPFIACE-----K-ESLESTLKLII-T---NKD
Dpux(B)   QETDEEKQHFVPIFISCS-----ERDSL DVT LRRLIVS---GRE
Apim(A)   LESDEDKHHFMPFLPCE-----K-DNLENTLKRKYL-N---LRD
Apim(B)   LESDEDKHHFMPFLPCE-----K-DNLENTLKRKYL-N---LRD
Phum(A)   IEGNEDTDNFIPFFPCE-----K-ESLEQTFKRAL-Y---NKD
Tcas(A)   RESDLEQEFVPIFNCD-----K-DNLEQTLKK-I-I---NKD
Tcas(B)   RESDLEQEFVPIFNCD-----K-DNLEQTLKK-I-I---NKD
. : * * : :

```

ced-5 L--SNDMETKLLISTQLVPGNVSQIKARPHLFSRCPAAILRRADRTA-VSIEDSRNEMY  
DOCK2 ----DSGGQGLWVTMMLVGDIIQIRKDYPHLV-DRTTVVARKLGFPEIIMPGDVRNDIY  
DOCK1 V---NHKGQGLWVTLKLLPGDIHQIRKEFPHLV-DRTTAVARKTGFPPEIIMPGDVRNDIY  
DOCK5 V---NHKGQGLWVSLKLLPGDLTQVQKNFSLHV-DRSTAIARKMGFPEIILPGDVRNDIY  
Dme1(A) IGK---IDSKMAVTIEVLRGDIKQIKEEFPRLM-HTNVPVARKMGFPEVILPGDVRNDLY  
Dme1(B) IGK---IDSKMAVTIEVLRGDIKQIKEEFPRLM-HTNVPVARKMGFPEVILPGDVRNDLY  
Poli(A) MAK---DGSNIWVSVELLHGD LKHLKEEYPHLI-QNNVTFARKMGFPEVIFPGDVRNDLY  
Poli(B) MAK---DGSNIWVSVELLHGD LKHLKEEYPHLI-QNNVTFARKMGFPEVIFPGDVRNDLY  
Agam(A) LGEK--SDAAIWISVDILFGDIKQVRDEYPHLV-LGNVTFARKMGFPEVIFPGDVRNDLY  
Cqui(A) LGEK--SESGIWISVDILHGD LKQVKEEYPHLV-LGNVAFARKMGFPEVIFPGDVRNDLY  
Dpux(B) ISHKEHKNQGLWVSLRLLHGD LKQVSEEH PALVQVAQVAVSRKLGFPPEIILPGDVRNDLY  
Apim(A) YSHKEHKQGLYVSKLLHGD LKQVREECPHLV-LGNVALVRKMGFPEVILPGDVRNDLY  
Apim(B) YSHKEHKQGLYVSKLLHGD LKQVREECPHLV-LGNVALVRKMGFPEVILPGDVRNDLY  
Phum(A) VTQKDHKQGLWVSLKVLHGD LKQVSEENPHLV-LGNVAIARKMGFPEVILPGDVRNDLY  
Tcas(A) FAKTEHKNHALFVGMKLLRGDLKQVREENPHLV-LGNLSIARKMGFPEVILPGDVRNDLY  
Tcas(B) FAKTEHKNHALFVGMKLLRGDLKQVREENPHLV-LGNLSIARKMGFPEVILPGDVRNDLY  
: : : \* : : : \* . . \* : : \* \* : \*

ced-5 ITLMQAELS GK--SSDRNIEARLHVVESNGHVMENVFETISVTGSQSLSTVYKSI VVYHT  
DOCK2 ITLLQGDFDKYK- TTQRNVEVIMCVCAEDGKTL PNAICV--GAGDKPMNEYRSV VYYQV  
DOCK1 VTLVQGD FDKGSK- TTAKNVEVTVSVDYEDGKRLEHVI FFP--GAGDEAISEYKSV VYYQV  
DOCK5 VTLIHGEFDK GKK-KTPKNVEVTMSVHDEEGK LLEKAIHP--GAGYEGISEYKSV VYYQV  
Dme1(A) LTICSGEFARI-AKTSEKNVEVSVCVANEQGYLMPGVLSI--GAGHQPIDEYKSV VYYHD  
Dme1(B) LTICSGEFARI-AKTSEKNVEVSVCVANEQGYLMPGVLSI--GAGHQPIDEYKSV VYYHD  
Poli(A) VTLVSGEF SKISGKTS DKNIEVSIN VYKDNGETVSDVISQ--GGGASLVSEYRSIIYYHE  
Poli(B) VTLVSGEF SKISGKTS DKNIEVSIN VYKDNGETVSDVISQ--GGGASLVSEYRSIIYYHE  
Agam(A) LTLVSGEF SKG-SKSSDKNIEVTAVVCNKHGVAIPGVISY--GGGNALNEYKSVIYYHE  
Cqui(A) LTLVSGEF SKG-SKSSDKNIEVTAVVCNRSGEAIPGVICY--GGGGTPLNEYKSVIYYHD  
Dpux(B) LTLSSGEF SRGAK-SADKNVEVTVRVCNEKGVPIPGVMHL--GSGVTAQDEYRSV VYYHE  
Apim(A) LTLVNGEF SRGSLSSSDKNIQVTVTACNEKGVKLLGVIML--GGDSEPLSDFNSV VYYHE  
Apim(B) LTLVNGEF SRGSLSSSDKNIQVTVTACNEKGVKLLGVIML--GGDSEPLSDFNSV VYYHE  
Phum(A) LTLVSGDF SKGVK-NTDKNIQVTVTVCNEKQIIPGVIMY--GGGVEPLNEFKSVIYYHD  
Tcas(A) LTLIKGEF SKGSK-TCDKNVEVVVRCNEEGVPIPGVIAL--GSGVPPIDEYKSMIYYHE  
Tcas(B) LTLIKGEF SKGSK-TCDKNVEVVVRCNEEGVPIPGVIAL--GSGVPPIDEYKSMIYYHE  
:\* : : : : \* : : : : \* \* : \*

ced-5 DKPMWTEPIKIALPSCASHDVYLRILFYSKKAYDKPKPEKGPFAIAHVQLIRSS-ALLCD  
DOCK2 KQPRWME TVKVAVPIEDMQRHLRFTFRHRSSLESKDKGEKNFAMS YVKLMKEDGTTLRD  
DOCK1 KQPRWME TVKVAIPIEDVNRSHLRFTFRHRSSSQDSDKSEKIFALAFYKLMRYDGTTLRD  
DOCK5 KQPCWYETVKVSAIAIEEVTRCHIRFTFRHRSSQETRDKSERAFGVAFV KLMNPDGTTLQD  
Dme1(A) DKPKWQETFKIHVPIEDFKQCHLRVFLKHRSSNEQKDRTEKPFGLAYVRLMQANGTTITQ  
Dme1(B) DKPKWQETFKIHVPIEDFKQCHLRVFLKHRSSNEQKDRTEKPFGLAYVRLMQANGTTITQ  
Poli(A) DRPKWNETFKINVP IEEFAKCHLKF MFKHRSSNESKDKNEKPFAMAFV KLLQDDGTTLSQ  
Poli(B) DRPKWNETFKINVP IEEFAKCHLKF MFKHRSSNESKDKNEKPFAMAFV KLLQDDGTTLSQ  
Agam(A) DRPKWGETFKIDVPIEEFKQCHLRFTFKHRSSNEAKDRSEKPFGLSYVRLMDDGTTLQH  
Cqui(A) DKPKWNETYKIDVPIEEFKQCHLRFTFKHRSSNEAKDRTEKPFGLSFV KLMNDDGTTLQH  
Dpux(B) DKPRWSETFKIAIPIDEFYRSHLKFTFKHRSSNEAKDRTEKPFALSYV KLMQDNGTTLMD  
Apim(A) DKPRWYEVKLA IPIEDFKGSHLKF MFKHRSSNETKDKNEKPFALSFV KLMQDNGTTLRD  
Apim(B) DKPRWYEVKLA IPIEDFKGSHLKF MFKHRSSNETKDKNEKPFALSFV KLMQDNGTTLRD  
Phum(A) DKPKWNEIFKVAVPIEEFKSSHIKFTFKHRSSNETKDKSEKPFAMSF M KLMQENGTTIPD  
Tcas(A) DKPHWYETFKVAIPIEEFKTSHLKFTFKHRSSNEAKDKNEKPFAMSYVRLMQENGTTLKD  
Tcas(B) DKPHWYETFKVAIPIEEFKTSHLKFTFKHRSSNEAKDKNEKPFAMSYVRLMQENGTTLKD  
.: \* \* \* \* : : : : : : : : : : \* : : : : \*

ced-5 GEHDLAVYKIDNPGSHFDE-SNVHYMNL PDTRRTLKESI---GSAKPHSQGFLSDKSFV  
DOCK2 GFHDLVVLKGD SSK--MED--ASAYLTLPSYRHHVENKGATLSRSSSSVGGLSVSSRDVF  
DOCK1 GEHDLIVYKAEAKK--LED--AATYLSLPSTKAELEEKGHSATGKSMQSLGSCTISKDSF  
DOCK5 GRHDLVYKGD NKK--MED--AKFYLTLPGTKMEMEEKELQASKNLVTFPSKDSTKDSF  
Dme1(A) GQHILAVYKIDHKK--YDKTVANCYLELPATVAELQ-----GAKPSIGGLTLLPKDQL  
Dme1(B) GQHILAVYKIDHKK--YDKTVANCYLELPATVAELQ-----GAKPSIGGLTLLPKDQL  
Poli(A) DKHSLVYKIDYKK--IDKEAQFNYYTLPSRTFELMT-----TPKPSAPGFSLLPKDAF  
Poli(B) DKHSLVYKIDYKK--IDKEAQFNYYTLPSRTFELMT-----TPKPSAPGFSLLPKDAF  
Agam(A) KRHTLLVYKIDHKK--YDDEQTFNYLSLPSLAEELPNG-----SSKPSVSGFSLASKDSF  
Cqui(A) KRHQLLVYKIDHKK--FDHDTQYNYLQLPALADELVNVS----GGKPSVSGFSLASKDNL  
Dpux(B) TQHELLVYKVDHRK--LDE-NETAYLGLPSTRAELVEHG----SSKPSAPGLTVNSKDSL  
Apim(A) TLHELLVYKIDHKK--FDC-MDISYLSLASRKNELTE-T----NNQISVPGLSLANKDIF  
Apim(B) TLHELLVYKIDHKK--FDC-MDISYLSLASRKNELTE-T----NNQISVPGLSLANKDIF  
Phum(A) TKHTLCVYKIDHKK--FDE-TDIGYLSLPWTRPDEK--I----DKNS-CSGLNFSNKDFF  
Tcas(A) ARHNLIVYKIDYKK--FDE-KGLDYFKLPSIVSDVK--D----NAKPSVAGLT-MSKDIF  
Tcas(B) ARHNLIVYKIDYKK--FDE-KGLDYFKLPSIVSDVK--D----NAKPSVAGLT-MSKDIF  
\* \* \* \* : : \* \* : : . .

ced-5 MISTHSCSSMLTQNEHL LNVLWRVNCV--NLTSSLVALAQPIGDEHEMIRFFSHLLDA  
DOCK2 SISTLVCSTKLTQNVGL LGLLKWWRMPQ--LLQENLEKLIKIVDG---EEVVKFLQDTLDA  
DOCK1 QIATLVCSTKLTQNVDL LGLLKWRSNTS--LLQQLNRQLMKVDG---GEVVKFLQDTLDA  
DOCK5 QIATLICSTKLTQNVDL LGLLNWRSNSQ--NIKHNLKKLMEVDG---GEIVKFLQDTLDA  
Dme1(A) SIGVNLCSSTKLTQSVSL LGLLNWSAHKE--TLEQSLNALSTVPG---EEVVKFLQDILDA  
Dme1(B) SIGVNLCSSTKLTQSVSL LGLLNWSAHKE--TLEQSLNALSTVPG---EEVVKFLQDILDA  
Poli(A) TIETNLCSTKLTQDVKLL LGLLKWDEDELDQDQLQLSLVELLKVPA---EEIVKFLQDILDA  
Poli(B) TIETNLCSTKLTQDVKLL LGLLKWDEDELDQDQLQLSLVELLKVPA---EEIVKFLQDILDA  
Agam(A) TIETNLCSTKLTQNVDI LGLLNWSSRKE--KMEESLNALMNVK---EEVVKFLQDILDA  
Cqui(A) TIETNLCSTKLTQNVDI LGLLNWSSRKE--KMEESLNALMNVK---EEVVKFLQDILDA  
Dpux(B) LIGTCLCSTKLTQNVLL LGLLKYHSSQS--QQLPAIISALMKVDG---EEVVKFLQDVLDA  
Apim(A) IIQSNICSTKLTQNVDL LGLLNWTSHP--DKLRTSLSALMIVDG---EEVVKFLQDVLDA  
Apim(B) IIQSNICSTKLTQNVDL LGLLNWTSHP--DKLRTSLSALMIVDG---EEVVKFLQDVLDA  
Phum(A) FITTNVCSTKLTQNVLL LGLLNWSCK--P--EGLRHSLTAFRNVSG---GEVVKYLQDVLDA  
Tcas(A) VMSSNICSTKLTQNVDL LGLLNWKTH--K--DDLKSLRALIKVDG---EEVVKLLQDTLDS  
Tcas(B) VMSSNICSTKLTQNVDL LGLLNWKTH--K--DDLKSLRALIKVDG---EEVVKLLQDTLDS  
: \*\* : \*\*\* : \* : \* : : \* : : \* : : \* : : \* :

ced-5 LFEIWHGRE---TSEKVVFDVIVAVLRICEEPRHYQAAKIFEVYLK--RFSFTSAALKIL  
DOCK2 LFNIMMEHSQSDEYDILVFDALVIYIIGLI--ADRKFQHFNTVLEAYIQHFSATLAYKLLM  
DOCK1 LFNIMMENSESETFDTLVFDALVFIIGLI--ADRKFQHFNPVLEAYIQHFSATLAYKLLT  
DOCK5 LFNIMMEMSDSETYDFLVFDALVFIISLI--GDIKFQHFNPVLEAYIQHFSATLAYKLLS  
Dme1(A) LFNILVENDHPEKYDQLVFMSSIIHLIETV--SDLKYQHFLSVLDVYINESFSFTLAYTKLM  
Dme1(B) LFNILVENDHPEKYDQLVFMSSIIHLIETV--SDLKYQHFLSVLDVYINESFSFTLAYTKLM  
Poli(A) LFRILVFNADSLKYNDLVFQCLLLLLIEIV--SDKKYQHFSVLDLYINESFSSTLAYNKLI  
Poli(B) LFRILVFNADSLKYNDLVFQCLLLLLIEIV--SDKKYQHFSVLDLYINESFSSTLAYNKLI  
Agam(A) LFNILVSNDDPAKYDNLVFKCLLRLEIEIV--YDLKYQHFSVLDLYINESFSATLAYEKLI  
Cqui(A) LFNILVNLNEDPVKFDNLVFRCLLRLEIEIV--YDLKYQHFSVLDLYINESFSATLAYEKLI  
Dpux(B) LFNILMLNSDSNIFDHSVFDCLVFIIGLV--TDRKYEHFKPVLVDVYIKDNFSATLAYKLL  
Apim(A) LFNILMHNSDSDLFDNMVFECLLYIIGLV--SDRKYQHFPVLDLYIKESFSATLAYNKLI  
Apim(B) LFNILMHNSDSDLFDNMVFECLLYIIGLV--SDRKYQHFPVLDLYIKESFSATLAYNKLI  
Phum(A) LFNILMQNSDSLDYDDL VFKCILHIIRLV--NERQYQHFGPVLVDVYIQESFCATLAYNKLI  
Tcas(A) LFNILIEFTETDTYDIYVFDCLLHIISLVSNDWKYQHFPVLDLYIKENFSAHAKKLI  
Tcas(B) LFNILIEFTETDTYDIYVFDCLLHIISLVSNDWKYQHFPVLDLYIKENFSAHAKKLI  
\* \* \* : \*\* : : : : : : : \* : \* \* \* :

ced-5 KCLNHYVISDSED-----SNEKARNAFKVMGPLFKLVVVSKKCGIKFEE  
DOCK2 TVLKTYLDTSSR-----GEQCEPILRTLKALEYVFKFIVRSRILFSQLYE  
DOCK1 KVLKNYVDGAEK-----PGVNEQLYKAMKALESIFKFIVRSRILFNQLYE  
DOCK5 KVLNFIYVANADD-----SSKTELLFAALKALKYLFRFIIQSRVLYLRFYGY  
Dme1(A) DVLQKNISEAISPKEKSADGNDLE--ESPEVRRLYKTTRYLHYVMKFVIRSRVLYAEMNC  
Dme1(B) DVLQKNISEAISPKEKSADGNDLE--ESPEVRRLYKTTRYLHYVMKFVIRSRVLYAEMNC  
Poli(A) DVLERHFLDAFNNDKNSDPVMIFDADKPKSEKKLYKTIKLNQYIMKFIIRSILFSLKND  
Poli(B) DVLERHFLDAFNNDKNSDPVMIFDADKPKSEKKLYKTIKLNQYIMKFIIRSILFSLKND  
Agam(A) NVVQTHIRNAINNISKDRAMANIYTVN--ENDEALYRTTKYLQYIMKFIIRSILFANLNQ  
Cqui(A) NVVQTHIKNAINNVSSS-----GSG--SNDETLFRTTKYLQYIMKFIIRSILFADLNQ  
Dpux(B) VVLNDCVQSSVMTK-----LQGDDLLRVMKALQYLKFKVVRSRQLFVNLYG  
Apim(A) VVLKFHLSNL-----DQTDKDLLLKIMKSFKYIMKFIARSRILFSQLYE  
Apim(B) VVLKFHLSNL-----DQTDKDLLLKIMKSFKYIMKFIARSRILFSQLYE  
Phum(A) VVLRSYIESANVKE-----SDKDFYLNIMKSLEYLFRFIVRSRILFSDLN  
Tcas(A) SVLKNIIGRANSKT-----PDSKDDLIFKTMKSLQYVMRFVSKSRILMKVVD--  
Tcas(B) SVLKNIIGRANSKT-----PDSKDDLIFKTMKSLQYVMRFVSKSRILMKVVD--  
: . : : : : : : \* :

ced-5 FD--DFEKTYKQYLREFMKSLVALMSEK-----KAKMTVQNTALKSIPTIIDLLNESDS  
DOCK2 GK--EQ--MEFEESMRRLFESINNLMMKSQY-----KTTILLQVAALKYIPSVLHDVE--MV  
DOCK1 NK--GE--ADVFESLLQLFRSINDMMSMS-----DQTVRVKGAALKYLPTIVNDVK--LV  
DOCK5 QS--KDGDEFNNSIRQLFLAFNMLMDRPL-----EEAVKIKGAALKYLPSIINDVK--LV  
Dme1(A) N---TDYMDFATRLQELLRMFIDMIGCP-----SNLLKSEGALLKNLHIIATDLM--QV  
Dme1(B) N---TDYMDFATRLQELLRMFIDMIGCP-----SNLLKSEGALLKNLHIIATDLM--QV  
Poli(A) D---AERLAFETRLEDLMGYFVQLISIP-----HHLLRSQGAILKYLHVIASDLM--QV  
Poli(B) D---AERLAFETRLEDLMGYFVQLISIP-----HHLLRSQGAILKYLHVIASDLM--QV  
Agam(A) D---KDRELFVANLEELLESFSELIKYQ-----NDLLKSQGAILKYLHIIASDLM--QV  
Cqui(A) D---KDRELFETMLEDLLESFIELIKYQ-----NDLLKSQGAILKYLHIIASDLM--QV  
Dpux(B) DVEEGADSDFESLLLNLFASMSDFMRRSD-----GLVLLAQGAACKLYIPCAIPDLL--LV  
Apim(A) G---KGQQT FEMSMYEMKLLSKLMCSNS-----DATLFLQGAACKLYVPYSIPDIM--TV  
Apim(B) G---KGQQT FEMSMYEMKLLSKLMCSNS-----DATLFLQGAACKLYVPYSIPDIM--TV  
Phum(A) G---RGQEEFETQLKSLNNAIVKLMMSQEQAGNQDPALLVLVQGAACKLHIPSIIIDLI--KV  
Tcas(A) ----DVEDDFEESLRDLLQDITDMMALTS-----DGILREQGAACKLYLPSTIPDIL--MI  
Tcas(B) ----DVEDDFEESLRDLLQDITDMMALTS-----DGILREQGAACKLYLPSTIPDIL--MI  
: : : : : : : \* :

ced-5 VSPENLCGFIVDLMNNGFSNIVTRERLNFIAQIVETRRFFSLSICREQLLIPCLQIALDII  
DOCK2 FDKLLSQQLLYEFYTCIPPVKLQKQVQSMNEIVQSNLFKKQECRDILLPVITKELKELL  
DOCK1 FDPKELSKMFEFILNVPMLLTIQKLYCLIEIVHSDLFTQHDCREILLPMMTDQLKYHL  
DOCK5 FDPVELSVLFCKFIQSIPDNQLVRQKLNCMTKIVESTLFRQSECREVLLPLDQLSGQL  
Dmel(A) FEHVRLSISIVEILEKFPFRRLTQSKMGCIDFVETKLFKLPKCRAILLPVFCKHIKDH  
Dmel(B) FEHVRLSISIVEILEKFPFRRLTQSKMGCIDFVETKLFKLPKCRAILLPVFCKHIKDH  
Poli(A) YDPLKLSNFIVEMLTKIPQGRNLNQSMTCIKDLVDSKLFRLPLCRGILLPVFCSQIKDKL  
Poli(B) YDPLKLSNFIVEMLTKIPQGRNLNQSMTCIKDLVDSKLFRLPLCRGILLPVFCSQIKDKL  
Agam(A) YDPVKLSQKIVDIITNVPTGRLNQSMTCIKDVVDSKLFKLPKCRAILLPVFCRQIKDKL  
Cqui(A) YDPVKLSQRIVDIITNVPTGRLNQSMTCIKDVCDKLFKLPQCRAILLPVFCRQIKDKL  
Dpux(B) IDDDQLSTSLADIVTSVPAGRLNQNMMTLNDIVHSQLFLKPECRAIILPVVVKRVKELL  
Apim(A) FSTTQLSTLLVELIGNLPPSRLVKQKLITMSDIVHSQLFLNSDCRAIILPSILARIKELL  
Apim(B) FSTTQLSTLLVELIGNLPPSRLVKQKLITMSDIVHSQLFLNSDCRAIILPSILARIKELL  
Phum(A) FNVSDLSLILAEVLQKIPTQRLAHQKLSMVSNEIVKGPLFLIPVARGLLLPAVTKLIKLL  
Tcas(A) FDAKELSVILCNIITNIPPGRLLTKQKMMTINEIVHSQLFLYTECRRIMLPIFTKQVKTLLF  
Tcas(B) FDAKELSVILCNIITNIPPGRLLTKQKMMTINEIVHSQLFLYTECRRIMLPIFTKQVKTLLF  
. \* . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . :

ced-5 QIDNMATE-----KGEF  
DOCK2 EQKDDMQH-----Q  
DOCK1 ER---Q-----  
DOCK5 DDNSNK-----  
Dmel(A) ESKEE-----  
Dmel(B) ESKEE---GDSKTDIWQOEKNLSKAAKVLGQKKSQHLTCDTTANKK-----  
Poli(A) ESKEE-----  
Poli(B) ESKEE---GDIISDIWQOEKNLTKAAKILGESKSQLHARETTGKTK-----  
Agam(A) ESKEE-----  
Cqui(A) ESKEE---GDFMFDIRQQEKNLIKAAKVLGESKSQLHTRETTAKTKVFSYYAYCVRLLFS  
Dpux(B) TGPQE GGGWGGYKVELRHIERSKSKAARLLGEQVDQNALSQKAAVAGETRAQE-----  
Apim(A) ESSDE-----  
Apim(B) ESSDE---AKTSIEFRNKTKSVAKIAKVLGENGRKLLDSPDMSDQ-----  
Phum(A) ETNDE-----  
Tcas(A) ELHEE-----  
Tcas(B) ELHEE---GDRRLDGRRQRNSVAKVAQLLGTQHCLNQHRGYSEE-----

ced-5 ADRAAEACASIIAAILERLFADAKSGEGNAERELTSFILMVYRPLVQAMIRVIHDDKHTDD  
DOCK2 VLERKYCVELLNSILEVLSY--Q-DAAFTYHHIQEIMVQLLRTVNRTVITMG-----RDH  
DOCK1 -EDLEACCQLLSHILEVLYR--K-DVGPTQRHVQIIMEKLLRTVNRTVISMG-----RDS  
DOCK5 -PDHEASSQLLSNILEVLDLDR--K-DVGATAVHIQLIMERLLRRINRTVIGMN-----RQS  
Dmel(A) ---IAECINIMNNILKLLFR--S-DVGSTHNDIRDIMILFRTVMKAAHALD-----RDT  
Dmel(B) ---IAECINIMNNILKLLFR--S-DVGSTHNDIRDIMILFRTVMKAAHALD-----RDT  
Poli(A) ---VAECVIMNNMLEMLFL--D-DIGPVENDIRDIMILLRTVIQSSIAMD-----RDN  
Poli(B) ---VAECVIMNNMLEMLFL--D-DIGPVENDIRDIMILLRTVIQSSIAMD-----RDN  
Agam(A) ---VAECVIMNNMLEMLFL--D-DIGPVENDIRDIMILLRTVIQSSIAMD-----RDN  
Cqui(A) DLFVAECVIMNNMLEMLFL--D-DIGPVENDIRDIMILLRTVIQSSIAMD-----RDN  
Dpux(B) ---VEMSVTVMCDVMQILYR--K-DVGATHNDVAEVMANGLRTIITIIISID-----RED  
Apim(A) ---VEMCVKLLGDIMDLYV--A-DTGSTFRDITEIMLTVMRTVIQTTIAMN-----REG  
Apim(B) ---VEMCVKLLGDIMDLYV--A-DTGSTFRDITEIMLTVMRTVIQTTIAMN-----REG  
Phum(A) ---IDLCKVVLSDIMELLFR--N-DVGATIHVDVTEIMLTVLRTVIQTSIGMD-----REN  
Tcas(A) ---VELCIKILSDILELLFR--K-DIGPTYDDINEIITTVLRTLIIHTRVGMP-----KED  
Tcas(B) ---VELCIKILSDILELLFR--K-DIGPTYDDINEIITTVLRTLIIHTRVGMP-----KED  
. : : : \* . : : : \* : : : .

ced-5 DARGHFFSVILALLDKMSAQMFSEYVEERS-SDIDKRDFLMEMVQMIRDLLN---RNAFP  
DOCK2 ILISHFVACMTAILNQMGDQHYFYIETFQ-TSSELVDFLMETFIMFKDLIG---KNVYP  
DOCK1 ELIGNFVACMTAILRQMEDIYHYAHLIKTFGKMRTDVDFLMETFIMFKDLIG---KNVYP  
DOCK5 PHIGSFVACMIALLQMQDDSHYSHYISTFK-TRQDIIDFLMETFIMFKDLIG---KNVYA  
Dmel(A) GLVGKFFAIFMLGILQRMDAQHYEYFVKDLH-QSGELKHFVIEILLVFEELVSPHQAVFP  
Dmel(B) GLVGKFFAIFMLGILQRMDAQHYEYFVKDLH-QSGELKHFVIEILLVFEELVSPHQAVFP  
Poli(A) PLVGNLVAIMLAI FRNMTEHYKMYVNHFN-TRYDLQDFL TEILLVFKELVS---KPVFA  
Poli(B) PLVGNLVAIMLAI FRNMTEHYKMYVNHFN-TRYDLQDFL TEILLVFKELVS---KPVFA  
Agam(A) PLVGNLVAIMLGI FRSMTEAHYQCYVRSFL-TSYDLLDFL TEILLVFKELVS---KPVFP  
Cqui(A) PLVGNLVAIMLGI FRSMTEAHYQCYVRSFL-TSYDLLDFL TEILLVFKELVS---KPVFP  
Dpux(B) PFVGPLVSVMLSI FRQMPHHRNYLGHFA-TRSDLLDFL IEILMVFKDLVA---KHVYA  
Apim(A) PLVGYLVSIMISTLRQMTAEHFDIYIKNFP-TNIDLLDFL MEILLVFKDLVI---RPVFP  
Apim(B) PLVGYLVSIMISTLRQMTAEHFDIYIKNFP-TNIDLLDFL MEILLVFKDLVI---RPVFP  
Phum(A) SSVAPLVVIMIAI FRQMTAHHFEYVTHFQ-TIYDRDLDFL MEILLVFNLDVS---RPVFP  
Tcas(A) PQLGNLVALMIDI FRQMSERHYEAYIERFN-TRFDVLDLFL MEILLFFQNLVD---DKVFP  
Tcas(B) PQLGNLVALMIDI FRQMSERHYEAYIERFN-TRFDVLDLFL MEILLFFQNLVD---DKVFP  
. : : : \* : : : . : : \* . : : : \* : : .

ced-5 STWKDMIMLQNKVIHKSRLRFVMSAVQT--FFSNDKFCVEMWREYMVTVVSFVTQEGLNSKH  
DOCK2 GDWVAMSMVQNRVFLRAINKFAETMNNQKFLFHTNFEFQLWNNYFHLAVAFITQDSLQLEQ  
DOCK1 FDWVIMNMVQNKVFLRAINQYADMLNKKFLDQANFELQLWNNYFHLAVAFITQESLQLEN  
DOCK5 KDWVMVMNMTQNRVFLRAINQFAEVLTRFFMDQASFELQLWNNYFHLAVAFITQESLQLET  
Dme1(A) RDWMDMIMHQNTVILGALKHLTVVITDYFLC--PFEKQIWSNFFQCSIAFLVQSPLQLND  
Dme1(B) RDWMDMIMHQNTVILGALKHLTVVITDYFLC--PFEKQIWSNFFQCSIAFLVQSPLQLND  
Poli(A) PDWLDMIMHQNTVILESLRHFAHIIKENFFD--PFERQVWSNFFHCSIAFLIQPALQLDQ  
Poli(B) PDWLDMIMHQNTVILESLRHFAHIIKENFFD--PFERQVWSNFFHCSIAFLIQPALQLDQ  
Agam(A) IDWLDMIMHQNMVILGSLRHFAAIIMDQFFS--PFEKQVWSNYFQCSITFLTQPALQLNL  
Cqui(A) ADWLDMIMHQNTVILESLRHFAIIMEWFFS--PFEKQVWSNYFQCSITFLTQPALQLNL  
Dpux(B) PDWAQMILLQNSIVLKALRFFSHTIRDRFSN--PYEGQLWNNYFFCAITYVCQPALQLES  
Apim(A) KDWCEMIMLQNSVILKSLRYFSHTIRDYFFK--DFEHQAWNNFFHCAVTFLTQPSLQLEQ  
Apim(B) KDWCEMIMLQNSVILKSLRYFSHTIRDYFFK--DFEHQAWNNFFHCAVTFLTQPSLQLEQ  
Phum(A) KDWCEMIMLQNSVILKSLRFFSHTIRDYFFN--PFEHQAWNNFFHCAISFLTQPALQLES  
Tcas(A) YDWCDMIMLQNSVILKALRFFSHTIRDRFFE--RFEHQAWNNFFHCAIAFMTQPALQLET  
Tcas(B) YDWCDMIMLQNSVILKALRFFSHTIRDRFFE--RFEHQAWNNFFHCAIAFMTQPALQLET  
\* \* : \*\* : . : . : : \* : : \* : : : : : \* : .

ced-5 EWMKN--EDEMRIQLRKAANKDLRSMWFRLTPSQKLNYPISMIGSFLKVSLVDDDETRE  
DOCK2 FSHAKYNKILNKYGDMMRLIGFSIRDMMWYKLGQ--NKICFIPGMVGPILEMTLIPAEALRK  
DOCK1 FSSAKRAKILNKYGDMMRQIGFEIRDMMWYNLGP--HKIKFIPEMVGPILEMTLIPAEALRK  
DOCK5 FSQAKRNKIVKKYGDMMRQIGFRIRDMMWYNLGP--HKIKFIPSMVGPILEMTLIPAEALRK  
Dme1(A) FNDNKRQIVFARYRDIRKDTAMEIRKMWFLGQ--HKPKFVPQLVEPILEMSMIPEKELRQ  
Dme1(B) FNDNKRQIVFARYRDIRKDTAMEIRKMWFLGQ--HKPKFVPQLVEPILEMSMIPEKELRQ  
Poli(A) FTTNKQSIILSRYCDIRRDANEICNMWFKLGE--HKIHFPVPSMVGSLLEMSMIPETELRR  
Poli(B) FTTNKQSIILSRYCDIRRDANEICNMWFKLGE--HKIHFPVPSMVGSLLEMSMIPETELRR  
Agam(A) FSKTKQSVIRSTYRDIRRETFEIRKMWFLNLE--HKIMFVPRLVGPILEMSMIPEELRR  
Cqui(A) FSKTKQSMILSSYRDIRRETFEIRKMWFLNLE--HKIMFVPRLVGPILEMSMIPEELRR  
Dpux(B) FTQTKRRQVLARYRDMRREMGEFIRTMWFLNLE--HKINFVPAMVGFLEMTLLPETELRR  
Apim(A) FSSNKRWRRIISRYKDMRRETGFELSMWFLNLE--YKVNFPVPSLVGSFLEMTLLPETELRR  
Apim(B) FSSNKRWRRIISRYKDMRRETGFELSMWFLNLE--YKVNFPVPSLVGSFLEMTLLPETELRR  
Phum(A) FSVNKKARIVSRYNDMRRETGFELSMWFLNLE--YKVNFPVPSLVGSFLEMTLLPETELRR  
Tcas(A) FSKTKRMKIIRIYKDMRRETGFELSMWFLNLE--YKVNFPVPSLVGSFLEMTLLPETELRR  
Tcas(B) FSKTKRMKIIRIYKDMRRETGFELSMWFLNLE--YKVNFPVPSLVGSFLEMTLLPETELRR  
: .

ced-5 ATIIPIFFDMMQTEYNTSA-----SRSFTEFASLVSQLDTNVDQHSATK  
DOCK2 ATIIPIFFDMMMLCEYQ--R-----SGDFKKFENEIILKLDHEVEGGRGDE  
DOCK1 ATIIPIFFDMMQCEFH--S-----TRSFQMFENEIITKLDHEVEGGRGDE  
DOCK5 ATIIPIFFDMMQCEFNFSG-----NGNFHMFENELITKLDHEVEGGRGDE  
Dme1(A) ETIIPIFFDMMQCEYYSSRLEHESYGDTKFNNAAHHKGNFSDFKTAMIEKLDILIGAGKGD  
Dme1(B) ETIIPIFFDMMQCEYYSSRLEHESYGDTKFNNAAHHKGNFSDFKTAMIEKLDILIGAGKGD  
Poli(A) CTIIPIFFDMMQCEYVSSRFHVESFGDTKRNMSHMKNFRDFEKEFIEKLDILVEAGRGDN  
Poli(B) CTIIPIFFDMMQCEYVSSRFHVESFGDTKRNMSHMKNFRDFEKEFIEKLDILVEAGRGDN  
Agam(A) ATIIPIFFDMMQCEYYSSRYMESYGDTKRNTAHIKGNFNDFEKEIIEKLDHYIEGGYGD  
Cqui(A) ATVPIFFDMMQCEYYSSRYMESYGDTKRNTSHIKGNFNDFEKEIIEKLDHYIEGGYGD  
Dpux(B) ATIIPIFFDMMQCEFYSPRLQGEAYSSTKRDSSHIGKNFQEVENKLTQDLVLEGGRGDE  
Apim(A) ATIIPIFFDMMQCEFYSCFD----GHTNKRDSNIKAKFNDFENEMIAKLDHLEGGKGD  
Apim(B) ATIIPIFFDMMQCEFYSCFD----GHTNKRDSNIKAKFNDFENEMIAKLDHLEGGKGD  
Phum(A) ATIIPIFFDMMQCEFYSSKNCS--VSFTKRDSSTIKGNFSEFENEMIFKLDILFEGKGD  
Tcas(A) ATIIPIFFDMMQCEFYSSRFELESYGDTKRDSSSHIGKNFNDFENEMIAKLDILVEGGKGD  
Tcas(B) ATIIPIFFDMMQCEFYSSRFELESYGDTKRDSSSHIGKNFNDFENEMIAKLDILVEGGKGD  
\* : \*\*\*\*\* \* : . . \* . . : : \* . . .

ced-5 GFKEHFRQLSITLCQSDKELMANGGEELIERIDRLLTALIEYHEVASKSLVECVDLSMR  
DOCK2 QYMQLLLESILMECAAHPT--IAKSVENFVNLVKGLLEKLLDYRGV--MT--DESKNRMSC  
DOCK1 QYKVLFDKILLEHCRKHKY--LSSSGEVFALLVSSLLENLLDYRTIIMQ--DESKNRMSC  
DOCK5 QYKVLLEKLLLEHCRKHKY--LSSSGEVFALLVSSLLENLLDYRTIIMQ--DESKNRMSC  
Dme1(A) EYKHLFETIMLERCAAHNT--LNVDGTA FVQMVTRLMKLLLEYRFI--IQ--DESKNRMAC  
Dme1(B) EYKHLFETIMLERCAAHNT--LNVDGTA FVQMVTRLMKLLLEYRFI--IQ--DESKNRMAC  
Poli(A) EYKDLFYEIMMELSSNHVA--LKHEGTFVHMATKLMERLLEYRFL--IN--DESKNRMSC  
Poli(B) EYKDLFYEIMMELSSNHVA--LKHEGTFVHMATKLMERLLEYRFL--IN--DESKNRMSC  
Agam(A) EYKDLFYEIMHESCSNHAT--LQTYGVQCVQLTRLMEKLLLEYRCL--IH--DESKNRMAC  
Cqui(A) EYRELFDYDIMYESCSNHST--LRVPGIQVDVLT KLMKLLLEYRCL--IH--DESKNRMAC  
Dpux(B) HYKDLFQSLMTELCEKHST--MRDQGLKLVRTVTRLMERLLEYRSI--IT--DENRENRMSC  
Apim(A) QFKELFESIMLRKCNHST--MRDQGNRFVKIVTGLLERLLEYRAV--IN--DENKENRMNC  
Apim(B) QFKELFESIMLRKCNHST--MRDQGNRFVKIVTGLLERLLEYRAV--IN--DENKENRMNC  
Phum(A) EYKSLFKSIMLSLCEQHSS--FKTQGVKFKVTVSRLMERLLEYRSI--IT--DENKENRMSC  
Tcas(A) NYKDLFHDIMMEHCSQHAT--MNETGIKFKVTVTRLMERLLEYRCL--IT--DENKENRMSC  
Tcas(B) NYKDLFHDIMMEHCSQHAT--MNETGIKFKVTVTRLMERLLEYRCL--IT--DENKENRMSC  
: : : . . : : \* : \* : : : : \* : . \*

ced-5 TVQLMRYYNQYSHKELYVKYIYKLYDLHTSYGNKIEAAKTLRHRATMLTFDDDALPQWLI  
DOCK2 TVNLLNFYKDNREEMYIRYLYKLRDLHLDCDNYTEAAYTLLLHTWLLKWSDEQCASQVM  
DOCK1 TVNLLNFYKEIEREEMYIRYLYKLRDLHLDCDNYTEAAYTLLLHAKLLKWSDEQVCAHLT  
DOCK5 TVNVLNFYKEKREDIYIRYLYKLRDLHRDCENYTEAAYTLLLHAELLQWSDKPCVPHLL  
Dme1(A) TFSLLQFYSEVDLKEMYIRYVNLKCALHMEFENYTEAAFTLKLHTELLRWDTTELSHQLR  
Dme1(B) TFSLLQFYSEVDLKEMYIRYVNLKCALHMEFENYTEAAFTLKLHTELLRWDTTELSHQLR  
Poli(A) TVSLLQFYSEVNRKEMYIRYVNLKCDLHMEFDNYTEAAFTLKLHSNLLHWDDTQLSPLLK  
Poli(B) TVSLLQFYSEVNRKEMYIRYVNLKCDLHMEFDNYTEAAFTLKLHSNLLHWDDTQLSPLLK  
Agam(A) TVSLLQFYSDVNRKEMYIRYVNDKLYELHMEFDNFTEAAYTLKLHSNELNWDDTPLSLLK  
Cqui(A) TVSLLQFYSEVNRKEMYIRYVNLKCDLHMDFDNFTEAAYTLKLHSNELYWDDTPLSPLLK  
Dpux(B) TVNLLNFYQEISRKEMYIRYLNKLCDLHLECDNFTEAAYTLQLHAQLLRWSDEPLPTLLL  
Apim(A) TVNLLNFYMDIKRQEMYIRYVNLKCSLHLECDDFAEAAAYTLRLHSELLSWSNDPLPPLLR  
Apim(B) TVNLLNFYMDIKRQEMYIRYVNLKCSLHLECDDFAEAAAYTLRLHSELLSWSNDPLPPLLR  
Phum(A) TVNLLDFYSEINRKEMYIRYVNLKCELHLECDNYTEAAFTLKLHSSLLNWSSEEILSPLK  
Tcas(A) TVSLLDFYAEINRKEMYIRYLNKLYDLHLECDNYTEAAYTIDLHAKLLNWTTDEDLPQLLK  
Tcas(B) TVSLLDFYAEINRKEMYIRYLNKLYDLHLECDNYTEAAYTIDLHAKLLNWTTDEDLPQLLK  
\*..:: :\* : . :::\*::\* : \*\* \*\* . : \*\*\* \* : \* : \* : :

ced-5 ARSLNRHRELHRQLKEDLMEEAGNFLFSKGEDWEDALIVYNQLVPVYQNIIMDYDKLAGLL  
DOCK2 Q-TGQHPQTHRQLKETLYETIIGYFDKGMWEEAISLCKELAEQYEMEIFDYELLSQL  
DOCK1 Q-RDGYQATTGQLKEKLYQEIHYFDKGMWEEAIALGKELAEQYENEMFDYEQLSLL  
DOCK5 Q-KDSYVYTTQQLKEKLYQEIISYFDKGMWEKAIKLSKELAETYESKVFYDEGLNLL  
Dme1(A) S-YRHNNCRTHRQLKEALYFEIMEYFDKGMWECAIDMCRVLRQYEEEEIFDYLKLAELL  
Dme1(B) S-YRHNNCRTHRQLKEALYFEIMEYFDKGMWECAIDMCRVLRQYEEEEIFDYLKLAELL  
Poli(A) S-FRSHCQTHRHLKEELYKEIRFFDDGKMWESAIEICKELAHQYEDEIFDYMSLSLLH  
Poli(B) S-FRSHCQTHRHLKEELYKEIRFFDDGKMWESAIEICKELAHQYEDEIFDYMSLSLLH  
Agam(A) S-KRHYCCPTHRTLKVQLYRSMIDLFDKGMWECAIDLCKELAQYENEYDYLSLELL  
Cqui(A) S-SRHLSCSTHWALKEKLYRDIIDLFDKGMWESAIDMCKELSQYENEYDYLSLAELY  
Dpux(B) T-SRHPHITSHRQLKEALYLDVDFDRGKMWECALSLCKELARQYEEETFDYGRGALL  
Apim(A) SPLRYPTCDTHRQLKEALYHDIIDYFNKGMWECAVCMCKELVRQCESETYDYIQLSSLL  
Apim(B) SPLRYPTCDTHRQLKEALYHDIIDYFNKGMWECAVCMCKELVRQCESETYDYIQLSSLL  
Phum(A) S-HKHPSQCTHLELKEALYNDISIKYFDKGMWECALTLNCELKEQYEEYLFDYRQLSILH  
Tcas(A) T-NRHPKAHTRQLKEALYNNIENYDRGKLWECAIKKQELASQFESETYDYHRLSQLH  
Tcas(B) T-NRHPKAHTRQLKEALYNNIENYDRGKLWECAIKKQELASQFESETYDYHRLSQLH  
: \*\* \* : . : \* : \*\* \* : . \* : \*\* \* :

ced-5 QKIAQLYTSISRTERAYFYVYLVAFYGGQFPAYLNGHKFVFRSEKLEMHGEFMRIMKMY  
DOCK2 IQQAKFYESIMKILRPKPDYFAVGYGGQFPFLRNKVFYRGKEYERRERDFQMLMTQF  
DOCK1 KQQAQFYENIVKIRPKPDYFAVGYGGQFPFLRNKVFYRGKEYERRERDFQMLMTQF  
DOCK5 KKRASFYENI IKAMRPQPEYFAVGYGGQFPFLRNKVFYRGKEYERRERDFSLRLTTQF  
Dme1(A) NRMALFYEKI IKELRHNSEYFRVCFYGRGFPFLRNKVFYRGKEYERRERDFSLRLTTQF  
Dme1(B) NRMALFYEKI IKELRHNSEYFRVCFYGRGFPFLRNKVFYRGKEYERRERDFSLRLTTQF  
Poli(A) KQISTFYEKILKEMRHESEYFRVTFYGMGFPDLLRNRTFIYRGKEYEQLPFCTRILNQH  
Poli(B) KQISTFYEKILKEMRHESEYFRVTFYGMGFPDLLRNRTFIYRGKEYEQLPFCTRILNQH  
Agam(A) KKMSQFYENILRTTRYESIYRVTFYGMGFPFLRNKVFYRGKEYERRERDFSNRILSQH  
Cqui(A) KKMSQFYEKILREKRYESNYRVAFYGYGFPFLRNKVFYRGKEYERRERDFSNRILSQH  
Dpux(B) NRMATLYDHIHQVRHEPEYFRVAFYGRGFPFLRNKVFYRGKEYERRERDFSNRILSQH  
Apim(A) QRMSNFYDNIMKQLRPEPEYFRVAYYGGQFPFLRNKVFYRGKEYERRERDFSNRILNQF  
Apim(B) QRMSNFYDNIMKQLRPEPEYFRVAYYGGQFPFLRNKVFYRGKEYERRERDFSNRILNQF  
Phum(A) TTIARFYNCIMNQIRPEPEYFRVAFYGRGFPFLRNKVFYRGKEYERRERDFSGRMMNHL  
Tcas(A) KRMSTFYDDIMKKGRAKPEYFRVGYFGKGFPPFLRNKVFYRGKEYERRERDFSNRILNEF  
Tcas(B) KRMSTFYDDIMKKGRAKPEYFRVGYFGKGFPPFLRNKVFYRGKEYERRERDFSNRILNEF  
: : \* . \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \* :

ced-5 DNPEKIMKT-DPCPHLVDSPGRYIQVFNIDPIGT---GCSFENN---PEVKPVIKIKYFRY  
DOCK2 PNAEKMNNTSAPGDDVKNAPGQYIQCFVQPVLDL---HPRF---KKNPVPDQIINFYKS  
DOCK1 PNAEKMTTSPPGDDIKNSPGQYIQCFVQPKLDL---PPKF---H-RPVSEQIVSFYRV  
DOCK5 PNAEKMTSTTPPGEDIKSSPKQYMQCFVQPVMSL---PPSY---KDKPVPEQILNYYRA  
Dme1(A) PQAELMQTLEAPGDDITNSDGQYIQVNKVEPIMG-QAFNKF---NDKIINNEIVKYFTA  
Dme1(B) PQAELMQTLEAPGDDITNSDGQYIQVNKVEPIMG-QAFNKF---NDKIINNEIVKYFTA  
Poli(A) PRAELMQKLEAPGPEIVNSEGQYIQINKVDPIVS-DRNSRFRNMSGTKSIAQPIAKYYS  
Poli(B) PRAELMQKLEAPGPEIVNSEGQYIQINKVDPIVS-DRNSRFRNMSGTKSIAQPIAKYYS  
Agam(A) PRAELLTTL-TPGPEIRECEGQYIQINKVDPIVSQ-DIRFG---GKNTQIASNIVKFKYS  
Cqui(A) PRAELVPTL-NPGPEIRQSDGQYIQINKVDPIVSR-DIRIG---K-DRKNIAANIVKFKYS  
Dpux(B) PNAETMNRLTPPDQEIIMSDPQYQLQMNKVDPMLSAEDQERF---ASKPVSEQILRFYRV  
Apim(A) PNATLMQTLSPGSEITESSNQYIQINNVEPVMD-ERKEHL---LRKPISQILRHYRV  
Apim(B) PNATLMQTLSPGSEITESSNQYIQINNVEPVMD-ERKEHL---LRKPISQILRHYRV  
Phum(A) PNAELMNKLEPPGHEILESSGQYVQINKVDPIVMD-ERKSKF---VGKRVPEQILNYYRV  
Tcas(A) PKAELLNKLTTPPGEDITESSDKQYVQINKVDPIVMD-EKKHRF---SGKPVSEQILNYYKV  
Tcas(B) PKAELLNKLTTPPGEDITESSDKQYVQINKVDPIVMD-EKKHRF---SGKPVSEQILNYYKV  
. : \* . : . : : \* . : . : \* . : . : \* . : . : \* . : . : \*

ced-5 YNIQTFEYSKVEERKDTKWTSIDPSSEFMRNWLVRRIKTADSLPTDLRFTEIVELSDPI  
DOCK2 NYVQRFHYSRPVRRGTV-----DPENEFASMWIERTSFVTAYKLPGILRWFEVH--MSQT  
DOCK1 NEVQRFHYSRPVRRGTV-----DPENEFASMWIERTSFVTAYKLPGILRWFEVH--MSQT  
DOCK5 NEVQRFHYSRPVRRGTV-----DPENEFASMWIERTSFVTAYKLPGILRWFEVH--MSQT  
Dme1(A) NNVQKFQFSRPF RDSTNG----GDRDDVRNLWLERTEL RISYPLPGILRWFPVVE--TNTF  
Dme1(B) NNVQKFQFSRPF RDSTNG----GDRDDVRNLWLERTEL RISYPLPGILRWFPVVE--TNTF  
Poli(A) NNVDFEFKFSRPF RDSSKNWISTIDADNVGNLWLERTEL RMEFPLPGILKWFVPVEQ--SEAF  
Poli(B) NNVDFEFKFSRPF RDSSKNWISTIDADNVGNLWLERTEL RMEFPLPGILKWFVPVEQ--SEAF  
Agam(A) NNVNEFQFSRPIRESGV-----SGDDIAGTSYERTIMRRTDPLPGILRWFPVKS--TETI  
Cqui(A) NIVSEFQFSRPIRDSG-----SGDDIANTSYERTIMRRTDPLPGILRWFPVKS--SETV  
Dpux(B) NRVQRFHYSRPFHRRGQR-----DSDNAFSTTWLERTILTTSHQPLPGILRWFPVVE--SHVF  
Apim(A) NDVQRFHYSRPFYRVDP--KVNSNDDNEFANLWIERTVLDTTYSLPGILRWFPVKH--FDTY  
Apim(B) NDVQRFHYSRPFYRVDP--KVNSNDDNEFANLWIERTVLDTTYSLPGILRWFPVKH--FDTY  
Phum(A) NDVQKFQFSRPIYPNGN----EKDNEFGNLWLERTEL VMVTSYPLPGILMCFPVTT--SNTF  
Tcas(A) NDIQKFTFSRPFIRKDP--YI--DDKNEFGHLWLERTEL TTTYPLPGILRWFPVSS--STVH  
Tcas(B) NDIQKFTFSRPFIRKDP--YI--DDKNEFGHLWLERTEL TTTYPLPGILRWFPVSS--STVH  
: . \* : \* : . . \* : \* \* :

ced-5 YVTPLQNAVEQMRKKNKELNETAASAE S NPNFDLKL LSRDILGVVSAAVMGGVKNYEVFF  
DOCK2 TISPLENAIETMSTANEKILMMINQYQSDETLPINPLSMLLNGIVDPAVMGGFAKYEKAF  
DOCK1 TISPLENAIETMQLTNDKINSVQQHLDPSLPINPLSMLLNGIVDPAVMGGFAKYEKAF  
DOCK5 TISPLENAIETMELTNERISNCVQHAWDRSLSVHPLSMLLNGIVDPAVMGGFSNYEKAF  
Dme1(A) KISPLERAVEIMKDTNRDIRQLVILHKSDETLHINPLSMKLNIGVDPAVMGGFAKYEKAF  
Dme1(B) KISPLERAVEIMKDTNRDIRQLVILHKSDETLHINPLSMKLNIGVDPAVMGGFAKYEKAF  
Poli(A) KISPIECAIESMDTINKTLRDLLIEHQNDHTLAITTLTKMIQGVVDAAVNGGTSKYEDAF  
Poli(B) KISPIECAIESMDTINKTLRDLLIEHQNDHTLAITTLTKMIQGVVDAAVNGGTSKYEDAF  
Agam(A) MISPIEMAIETVDAKNRAIRELVLEHQNDPRIPVHSLSAIKGVVDAAVNGGPIYEEAF  
Cqui(A) MISPIEMAIETVEAKNRAIRELVLEHQNDPNIPVHSLSAVINGVVDAAVNGGPIYEEAF  
Dpux(B) ELNPIQFAIETMEKSNKSLTELILSHRSDPKLTLHPLTMKLQGVVDAAVNGGISNYEKAF  
Apim(A) EISPLKNAIETMQETNKYLRELI AHRNDSTLPLNPLTMKLNIGLDAAVMGGVTKYEKAF  
Apim(B) EISPLKNAIETMQETNKYLRELI AHRNDSTLPLNPLTMKLNIGLDAAVMGGVTKYEKAF  
Phum(A) RMSPIETAIETMKSTNGSLRELIISYDADHTLPLHPLSMKLNIGVDAAVMGGIANYEKAF  
Tcas(A) EISPLRNAIETMEKANKTLKNYVVLFNNDKDMQINPLSLLTLNGILDAAVMGGIKNYEEAF  
Tcas(B) EISPLRNAIETMEKANKTLKNYVVLFNNDKDMQINPLSLLTLNGILDAAVMGGIKNYEEAF  
: . \* : \* : : \* : : : \* : : \* : \* \* \* \*

ced-5 TEACRNICCEGQSVIMELSSLIIEQVEILEYCCYVHASRCQGEARINTMLADSFDSHR  
DOCK2 FTEEYVRDHPEDQDKLTHLKDLIAWQIPFLGAGIKIHEKRVSDNLRPFHDMEECFKNLK  
DOCK1 FTDRYLQEHPEAHEKIEKLDLIAWQIPFLAEGIRIHGDKVTEALRPFHERMEACFKQLK  
DOCK5 FTEKYLQEHPEDEKVELLKRLLIADQIPLLTEGIRIHGEKLTEQLKPLHERLSSCFRELK  
Dme1(A) LTDDYLEQNPDDKELVEELKELIANQIPLLDLAIQLHRLRAPDSLKALQEHLERCFADMQ  
Dme1(B) LTDDYLEQNPDDKELVEELKELIANQIPLLDLAIQLHRLRAPDSLKALQEHLERCFADMQ  
Poli(A) LTDEYLEKNPEDAPLVDKLNLIADQIPILEVALSVHRMKVANDLMLPHERLEECFGKMQ  
Poli(B) LTDEYLEKNPEDAPLVDKLNLIADQIPILEVALSVHRMKVANDLMLPHERLEECFGKMQ  
Agam(A) LTPEYLERHPGDDRLVARLKDLIASQIPLLEVALLVHMKMTPAILLPFHQLEKCFATIQ  
Cqui(A) LTPEYLLKCPNDDHLVARLKDLIASQIPLLEVALLVHMKMTPAILLPFHDLREKCFAGIQ  
Dpux(B) FTDRYLLEHPEDADSVSELQELFALQIPLVEAALVVHRSRVNQAQLPQQRIEECFQEMR  
Apim(A) FTSEYSVNHEEDEHLIEKLDLVASQIPLLDIGVKVHSARAPPSLTPLQSRFEDCFEKMK  
Apim(B) FTSEYSVNHEEDEHLIEKLDLVASQIPLLDIGVKVHSARAPPSLTPLQSRFEDCFEKMK  
Phum(A) FTPEYETGHPDDVKL IATLKRVIADQIPLKIGIKIHKERAPPSLLPFHTRLEECYADME  
Tcas(A) FTEKYETHHQEDDVLQLKDLIADQIPLLELCVRIHKENAPENLQPLQKRFEDCFAKMQ  
Tcas(B) FTEKYETHHQEDDVLQLKDLIADQIPLLELCVRIHKENAPENLQPLQKRFEDCFAKMQ  
: \* . : . \* : : : \* . : : : :

ced-5 RYVEENFGKTRSRLPTHAN--IRLS-----SFD----SDSINDGMMTM-----K--SGK  
DOCK2 MKVEKEYGVREMPD-FDDRRVGRPRSMR--SYRQMSIISL-----AS-----  
DOCK1 EKVEKEYGVREMPD-FDDRRVGRPRSMR--SYRQMSIISL-----AS-----  
DOCK5 EKVEKEYGVREMPD-FDDRRVGRPRSMR--SYRQMSIISL-----AS-----  
Dme1(A) QHVEQRYGRKSCDLKIERDSVVMRRPNS-FLPSLFDGNSNRHSETSMGS-----SD-----  
Dme1(B) QHVEQRYGRKSCDLKIERDSVVMRRPNS-FLPSLFDGNSNRHSETSMGS-----SD-----  
Poli(A) THVESKYGKRTT DIKFERDSMVVLRKGILS-TPHISSDNRLSETSMGS-----SD-----  
Poli(B) THVESKYGKRTT DIKFERDSMVVLRKGILS-TPHISSDNRLSETSMGS-----SD-----  
Agam(A) ANVEAKYGKRTT DIKIDRDAEVTLRRHISANQPQMSMDSRRLSETSIGS-----SD-----  
Cqui(A) SSVEAKYGKRTT DLKIDRDNEVTLRRQISA-LPQVSDSSRRLSETSIGS-----SD-----  
Dpux(B) VHIESKYGRRDVPQLERQMEQLTRNQRQ--STHSSGGGGGLGVGAYSLYNRLSTNSTGD  
Apim(A) VHIEENYGGKKTCDIKFDVVKM--RRHTT-----A--GSRFNEKRYSGSSIGSTEG---  
Apim(B) VHIEENYGGKKTCDIKFDVVKM--RRHTT-----A--GSRFNEKRYSGSSIGSTEG---  
Phum(A) THVETKYGKQECDIRLDLNSPVRKRT-----STP-----LNYSFHSRNS---  
Tcas(A) ESVEEKYGKGTCDIKLDSQVTMRHHF-----VLPDPRLSDMSMLSDSVDSRSR---  
Tcas(B) ESVEEKYGKGTCDIKLDSQVTMRHHF-----VLPDPRLSDMSMLSDSVDSRSR---  
: \* : \* :

ced-5 AAVLGNAPANLIYSNKRSSGPGTPVNLSSRSAPSFNIISSKLRSS---LAI-----  
DOCK2 -----MN-----SDCSTPSKPTSESF-----  
DOCK1 -----SL-----SSDSTPSRPGSDGF-----  
DOCK5 -----SN-----SSDNAPSRPGSDGS-----  
Dme1(A) ---SGLSK-----STFLPRPQTN--SIKN-----  
Dme1(B) ---SGLSK-----STFLPRPQTN--SIKN-----  
Poli(A) ---SGISR-----APGPSRHLTAISK-----V-----  
Poli(B) ---SGISR-----APGPSRHLTAISK-----V-----  
Agam(A) ---SGISK-----NQNSRPTTTSSGGFKNTIANL-----  
Cqui(A) ---GISK-----SHNSRPTTTSSGGFKSTFTNFA-----  
Dpux(B) ASHPDSAHAH-----HHLSSPAN-----LTSSVNIAASRLSSVTLQSPGGS  
Apim(A) --QNGITK-----QSLMSTTS-----LSSSLAIFA-----  
Apim(B) --QNGITK-----QSLMSTTS-----LSSSLAIFA-----  
Phum(A) --VVSLAP-----SD-----  
Tcas(A) --VSSLTK-----SQVASLKQ-----FTSSFNFAT-----  
Tcas(B) --VSSLTK-----SQVASLKQ-----FTSSFNFAT-----

ced-5 -----SKLAPPPRPPNPI  
DOCK2 -----DLELASPK  
DOCK1 -----ALEPLLPK  
DOCK5 -----ILEPLLER  
Dme1(A) -----PF-----SGLSFNTRPSLGH  
Dme1(B) -----PF-----SGLSFNTRPSLGH  
Poli(A) -----LNF-----NSPASFTRQTMGP  
Poli(B) -----LNF-----NSPASFTRQTMGP  
Agam(A) -----ANF-----N-TVNLARTSLGT  
Cqui(A) -----TNF-----N-TSNLTRTSLGS  
Dpux(B) SGGSLHNPSITRHQSSLFSRTSSQAVLSSLSFSLPSSSSSSANPSSSGSSISPVKMLTT  
Apim(A) -----GPVLVSGSNKFGT  
Apim(B) -----GPVLVSGSNKFGT  
Phum(A) -----SSVG--SSSLKTLINIKTPSLPT  
Tcas(A) -----SPSISKSSISSNTKSLLVSPSKLTT  
Tcas(B) -----SPSISKSSISSNTKSLLVSPSKLTT

ced-5 SPINRGPSNYE-----GIRM-----R--  
DOCK2 TPRVEQEEPISPGST-LPEVKLRRSKKRT-KRSSVV-----FAD-----EKA--AAESDLK  
DOCK1 KMHRSRQDKLDKDDL-EKEKKDKKKEKRN-SKHQEI-----FEK-----EFK--PTDISLQ  
DOCK5 RASSGARV--EDLSL-REENSEN-----IS-----KFK--RKDWSLS  
Dme1(A) SPSIKSNKSKDKT--P-----SKRR-TKDGKVK-----EREAHSL  
Dme1(B) SPSIKSNKSKDKT--P-----SKRR-TKDGKVK-----EREAHSL  
Poli(A) STMIRKSKDKITP-----QKRR-KSMKVR\*-----  
Poli(B) STMIRKSKDKITP-----QKRR-KSMKVR\*-----  
Agam(A) SPGSKAKKDKTLT-----KRR-SSRKMDR-----ESLSLSVS  
Cqui(A) SPSSKNKKDKTLT-----KRR-SSRKMDR-----ESLTLVPS  
Dpux(B) GHRFRSNKSGTDKCLRDKENKQHRDSFRRLSSSSIGGRGSHFPSLSLAGFGLGGSSNSVP  
Apim(A) IGALTRKDKKEKK-----RRNRTVSKMATTNDRDLS--ISNS-----SSS  
Apim(B) IGALTRKDKKEKK-----RRNRTVSKMATTNDRDLS--ISNS-----SSS  
Phum(A) A-TLRTKEKGEK-----RKSNSNKE--SSSLGSN--HVSK-----EYS  
Tcas(A) TPALNHKKSFKIT-----RE-----KRR--SSKSDHT--PSPS-----LLP  
Tcas(B) TPALNHKKSFKIT-----RE-----KRR--SSKSDHT--PSPS-----LLP

ced-5 -----AH-----SHQASTVSLNHMS--VAPPLPPRPDRPDM  
DOCK2 RL-----S-----RKHEFMSDTNLSEH  
DOCK1 QSEAVIL-----SETISPLR-PQR  
DOCK5 KSQVIAEKA-----PEPDLMSPTRKAQR  
Dme1(A) SSQWYTPPLSTITSTPEKEINTSIAS-----LASTSNS---SLSGPKTPDPHVLTEELT  
Dme1(B) SSQWYTPPLSTITSTPEKEINTSIAS-----LASTSNS---SLSGPKTPDPHVLTEELT  
Poli(A) -----  
Poli(B) -----  
Agam(A) NSQFYTSPIPTASEHNSSIGQ---SD-----RDSGGGP---LSLLS-----PTGATTTLLH  
Cqui(A) NSLFYTSPIITASEVGSISSC---SD-----RDSAISQ---VNCQPNKTQRLPFPFQLH  
Dpux(B) SSPAVVVNSSGNSNSGSTSALGSSAHLDASSSSSETVGQLALSESTSSPTVVIELTQQLT  
Apim(A) NSQWYALPD-----ADNMSLSS---I---NSNLSVFSSPTPIELRQELT  
Apim(B) NSQWYALPD-----ADNMSLSS---I---NSNLSVFSSPTPIELRQELT  
Phum(A) NSQWYTVAP-----DISMVHS-----PGNVTPVFELRQELT  
Tcas(A) ATQWYTTDE-----NTNGSPIFELTEELT  
Tcas(B) ATQWYTTDE-----NTNGSPIFELTEELT



ced-5 PNRTLKRKN\*-----  
DOCK2 AAIPLKASVLS-QMSF-----ASQSMP-----TI-----P-----  
DOCK1 PK-SQVMNVIGSERRFS----VSPSSPSSQQTPPPVT-----PRAKLSF  
DOCK5 PK-SLQLM-DNRLSPFH----GSSPPQSTPLSPPPLT-----PKATRRL  
Dmel(A) PKRPLRSEMEK-ERLSRPASIAATPTASIKNFPDTRSL-----SES  
Dmel(B) PKRPLRSEMEK-ERLSRPASIAATPTASIKNFPDTRSL-----SES  
Poli(A) -----  
Poli(B) -----  
Agam(A) PKRPLRSEVEK-EKRLSRPPSIATPTMGSRSLPGGGGAAPNSSTMAGGDSNSIG-SGDSS  
Cqui(A) PKRPLRSEVEK-EKRLSRPPSVVTPTLSVKTL-----TGADTNSIG-SADGS  
Dpux(B) AKRPLRSEARR-SSTVNRPSYNGDGLGGVC-----SS  
Apim(A) PKRPLRSEVEK-ERLSRPNSGQYQFSKLP-----MNN  
Apim(B) PKRPLRSEVEK-ERLSRPNSGQYQFSKLP-----MNN  
Phum(A) PKRPLRSEVEK-EKRLSRPTSGQFSVGKLTQA---LS-----ITSRLSQASLQS  
Tcas(A) PKRPLRSEVEK-EKRLSRPPSGQFSSRSSIS---VT-----LR---GTGSSSS  
Tcas(B) PKRPLRSEVEK-EKRLSRPPSGQFSSRSSIS---VT-----LR---GTGSSSS

ced-5 -----  
DOCK2 --ALALSVAGIPLGDEANTSPRLSQTFLQLSDGDKKTLTRKKVNQFFKTMLASK-----  
DOCK1 SMQSSLELNGMTGADVAVPPPLPLKGSVADYGN---LMEN---QDLLGSPTPPP-----  
DOCK5 SSP-SLQTDGI-----AATPVPPP-----  
Dmel(A) SNRNSVETT-DSTSEEDIRPPPLPAKARDSTDF--TSLSQNMDWT-----  
Dmel(B) SNRNSVETT-DSTSEEDIRPPPLPAKARDSTDF--TSLSQNMDWT-----  
Poli(A) -----  
Poli(B) -----  
Agam(A) SNRNSIITNGSTTSEEDSVPPPLPLKTRT--DGDYSMMPSGKASADQRLSSPAAANIQQQ  
Cqui(A) SNRNSIITNDSTTSEEDLVPPPLPVKTATSRDSDYSNLPLNDSALHRRLT-----  
Dpux(B) PSQNSVASTL-SSSSGEDLPPPLPAKQGC---ATSVGGCG---DVPPEK-----  
Apim(A) LNRDSLATD--STASDDTTPPPLPAKTRE---ADYCNLSDKDSLGLPDYCSPPIVN----  
Apim(B) LNRDSL GK\*-----  
Phum(A) SNRDSTGTTESTTSEEDQMPPPLPVKQRE---ADYCNLPDNYDRIVKSASVPST-----  
Tcas(A) SNRDSVGTDDSSVSEEDAVPPPLPLKTRE---VDYCNLPNNENTSFLYSQRNSV-----  
Tcas(B) SNRDSVGTDDSSVSEEDAVPPPLPLKTRE---VDYCNLPNNENTSFLYSQRNSV-----

ced-5 -----  
DOCK2 ----S-----AEEG-----K  
DOCK1 ----PPPHQR-----  
DOCK5 ----PPPKSKPYEG-----S---Q-----RNST  
Dmel(A) ----PNGYAMLSTISNTSSMSTTSTLTKTSITNTTYEYLETTNFSL-----  
Dmel(B) ----PNGYAMLSTISNTSSMSTTSTLTKTSITNTTYEYLETTNFSL-----  
Poli(A) -----  
Poli(B) -----  
Agam(A) QQPSNASHYITFKPLM---GTTAAAGTTTAVVAVNASYDVVETRNVHSVIVINSSSSTITGC  
Cqui(A) ---GPGSHYVTFKPLP---PVPTN---NNNSVVINSAYDVVETRNVHSVIVIG-----  
Dpux(B) -----PPLP-----VVNL  
Apim(A) -----NIMPEQP-----LQ-L  
Apim(B) -----  
Phum(A) -----P-----LA-W  
Tcas(A) -----RTSLK-----IQ-V  
Tcas(B) -----RTSLK-----IQ-V

ced-5 -----  
DOCK2 QIPDSLSTDL\*-----  
DOCK1 HLPPLP---SKTPPP---PPPKTTRKQASVDSGIVQ\*  
DOCK5 ELAPPLPVRREAKAPPP---PPPKARKSGIPTSEPGSQ\*  
Dmel(A) ----VGAIDGNKPRPPT---PPPK-PSRHSKHIP\*----  
Dmel(B) ----VGAIDGNKPRPPT---PPPK-PSRHSKHIP\*----  
Poli(A) -----  
Poli(B) -----  
Agam(A) SSPTPGGGYDDRKRPPPT----PPPK-PARNSKV\*-----  
Cqui(A) ----PAGSYDDRKRPPPT---PPPK-PARNSKV\*-----  
Dpux(B) SEIKEGGENG---GAPP---PPPKPARPLPI\*-----  
Apim(A) INSQ---ENN---RPPT---PPPKPPMKAPV\*-----  
Apim(B) -----  
Phum(A) NKSSHGFDT---MRPDSRTCTTPT-PNKN\*-----  
Tcas(A) QAADPISFDD---VPPT---PPPK-PPKNKISISNL\*---  
Tcas(B) QAADPISFDD---VPPT---PPPK-PPKNKISISNL\*---

**Anhang 10: CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment (vorherige Seite)**

Alignment folgender Sequenzen: *ced-5* aus *Caenorhabditis elegans*; DOCK2, DOCK1 und DOCK5 aus *Homo sapiens*; *mbc-RA* (Dmel (A)), *mbc-RB* (Dmel(B)) aus *D. melanogaster*; die zu *mbc* orthologen Gene Isoform-RA (Poli(A)) und Isoform.RB (Poli(B)) aus *Prodiamesa olivacea*; AGAP004320-RA (Agam(A)) aus *Anopheles gambiae*; CPIJ002759-RA (Cqui(A)) aus *Culex quinquefasciatus*; ARP2\_G366-RB (Dpux(B)) aus *Daphnia pulex*; LOC100168224-RA (Apim(A)) und LOC100168224-RB (Apim(B)) aus *Acyrtosiphon pisum*; PHUM252200-RA (Phum(A)) aus *Pediculus humanus*; TC12454-RA (Tcas(A)) und TC12454-RB (Tcas(B)) aus *Tribolium castaneum*. Die SH3-Domäne ist in violett markiert; die DHR-1-Domäne in gelb, die DHR-2-Domäne in cyan und das alternativ gespleißte Exon in grün.

	905 ESKEEGDSKTDIWQQ		907 KEEGDSKTDIWQQEK	
Software	Kinase	Score	Kinase	Score
GPS2.1.2	CK1	1,571	STE/STE7/MAP2K1	5
	AGC/DMPK	1,564	<b>TKL/MLK/MLK/MAP3K11</b>	<b>5,667</b>
	CK1/CK1	1,945		
	Other/CK2	5,509		
	Other/IKK	0,959		
	Other/PEK	2		
	AGC/DMPK/ROCK	1,947		
	AGC/GRK/BARK	1,515		
	CMGC/GSK/GSK3A	3		
	Other/CK2/CK2a	3,715		
	<b>Other/IKK/IKKa</b>	<b>7,222</b>		
	Other/PEK/PKR	2,188		
GPS	CK1	2,462	<b>MAP3K</b>	<b>8,000</b>
	CK2	4,230		
	GRK	2,113		
	IKK	3,160		
	<b>PKR</b>	<b>11,000</b>		
NetPhosK 1.0	CKII	0,40	<b>CKII</b>	<b>0,56</b>
	RSK	0,29	RSK	0,23
	<b>CKI</b>	<b>0,46</b>	CKI	0,42
	DNAPK	0,34	DNAPK	0,34
	ATM	0,43	ATM	0,26
	p38MAPK	0,29	p38MAPK	0,28
	PKB	0,10	PKB	0,09
	PKC	0,08	PKC	0,39
	CaM-II	0,43	CaM-II	0,42
	PKA	0,27	PKA	0,11

	PKG	0,28	PKG	0,31
	cdc2	0,43	cdc2	0,45
	GSK3	0,45	GSK3	0,42
	cdk5	0,14	cdk5	0,16
NetPhos 2.0	-	0,993	-	0,006
	917 WQQEKNLSKAAKVLG		928 KVLGQKKSQLHTCDT	
Software	Kinase	Score	Kinase	Score
GPS2.1.2	CAMK/MLCK	4,667	CAMK	1,656
	CAMK/PHK	2,143	AGC/DMPK	1,385
	CAMK/PKD	5	AGC/PKG	6,071
	STE/STE20	2,441	CAMK/CAMK1	2,353
	AGC/DMPK/ROCK	1,605	Atypical/PIKK	4,447
	AGC/PKG/PKG1	4,625	Other/AUR	3,527
	CAMK/DAPK/DAPK3	3,056	AGC/DMPK/ROCK	1,684
	CMGC/CDK/CDK7	1,833	AGC/GRK/BARK	1,394
	CMGC/DYRK/Dyrk1	2,714	AGC/PKG/PKG1	2,938
	STE/STE7/MAP2K1	6	<b>CAMK/CAMK1/CAMK4</b>	<b>8,7</b>
	STE/STE20/PAKA	3,276	CAMK/CAMKL/CHK1	4,5
	Other/AUR/AUR-A	3,929	CAMK/PKD/PKD1	4,667
	<b>Other/NEK/NEK2</b>	<b>7,667</b>	Atypical/PIKK/ATM	4,526
	Other/Other-Unique/KIS	4,4	Atypical/PIKK/ATR	7,9
	CMGC/MAPK/p38/MAPK 13	7,333	AGC/GRK/BARK/GRK-2	1,241
	STE/STE20/PAKA/PAK2	3,235	AGC/RSK/RSK/RSK1	3,9
			AGC/RSK/RSK/RSK2	3,889
			TKL/MLK/MLK/MAP3K11	4,667
GPS	<b>AMPK</b>	<b>4,893</b>	AMPK	2,357
	ATM	2,727	<b>MLCK</b>	<b>5,200</b>
	CaM-II	3,703	PKA	3,056
	CK1	2,000	PKC	1,988
	GSK3	2,000		
	IKK	2,378		
	PAK	3,500		
	PHK	3,765		
	PKA	3,678		

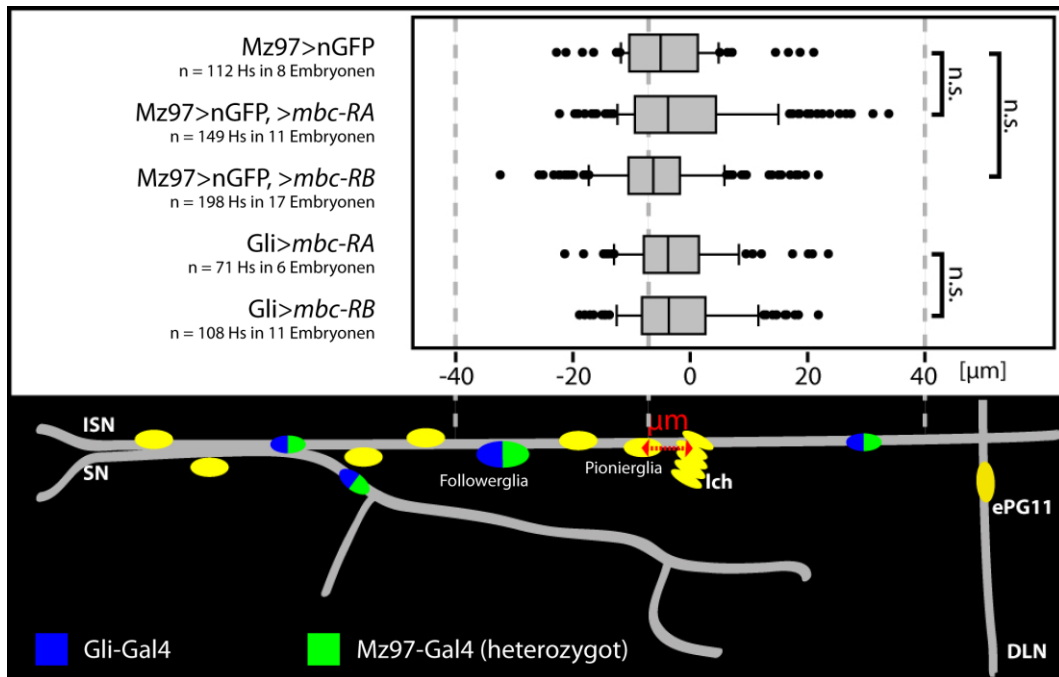
	PKC	2,286		
	PKL	2,500		
	ROCK	3,375		
NetPhosK 1.0	CKII	0,31	CKII	0,28
	RSK	0,28	RSK	0,36
	CKI	0,36	CKI	0,37
	DNAPK	0,39	DNAPK	0,39
	ATM	0,29	ATM	0,38
	p38MAPK	0,36	p38MAPK	0,36
	PKB	0,10	PKB	0,09
	<b>PKC</b>	<b>0,60</b>	PKC	0,22
	CaM-II	0,42	<b>CaM-II</b>	<b>0,46</b>
	PKA	0,24	PKA	0,26
	PKG	0,28	PKG	0,37
	cdc2	0,36	cdc2	0,43
	GSK3	0,44	GSK3	0,44
	cdk5	0,13	cdk5	0,18
NetPhos 2.0	-	0,092	-	0,053

	932 QKKSQ LHTCDTTANK		935 SQLHTCDTTANKKIA	
Software	Kinase	Score	Kinase	Score
GPS2.1.2	AGC/DMPK	2,026	STE/STE7	1,05
	Other/IKK	1,347	STE/STE11	2,3
	AGC/DMPK/ROCK	2,079	Other/IKK	0,571
	<b>CAMK/CAMKL/LKB</b>	<b>4,706</b>	STE/STE7/MAP2K3	3
	STE/STE7/MAP2K3	2	<b>STE/STE-Unique/NIK</b>	<b>7</b>
	AGC/DMPK/ROCK/ROCK1	2,467	Other/IKK/IKKb	1,375
			AGC/RSK/RSK/RSK2	2,556
			TKL/MLK/MLK/MAP3K11	4
GPS	<b>S6K</b>	<b>7,000</b>	<b>MAP3K</b>	<b>7,000</b>
NetPhosK 1.0	CKII	0,43	CKII	0,30
	RSK	0,24	RSK	0,28
	CKI	0,36	CKI	0,38
	DNAPK	0,34	DNAPK	0,34

	ATM	0,25	ATM	0,27
	p38MAPK	0,34	p38MAPK	0,30
	PKB	0,08	PKB	0,09
	PKC	0,25	<b>PKC</b>	<b>0,86</b>
	CaM-II	0,44	CaM-II	0,45
	PKA	0,18	PKA	0,10
	PKG	0,30	PKG	0,32
	cdc2	0,37	cdc2	0,37
	<b>GSK3</b>	<b>0,45</b>	GSK3	0,45
	cdk5	0,17	cdk5	0,14
NetPhos 2.0	-	0,021	-	0,284

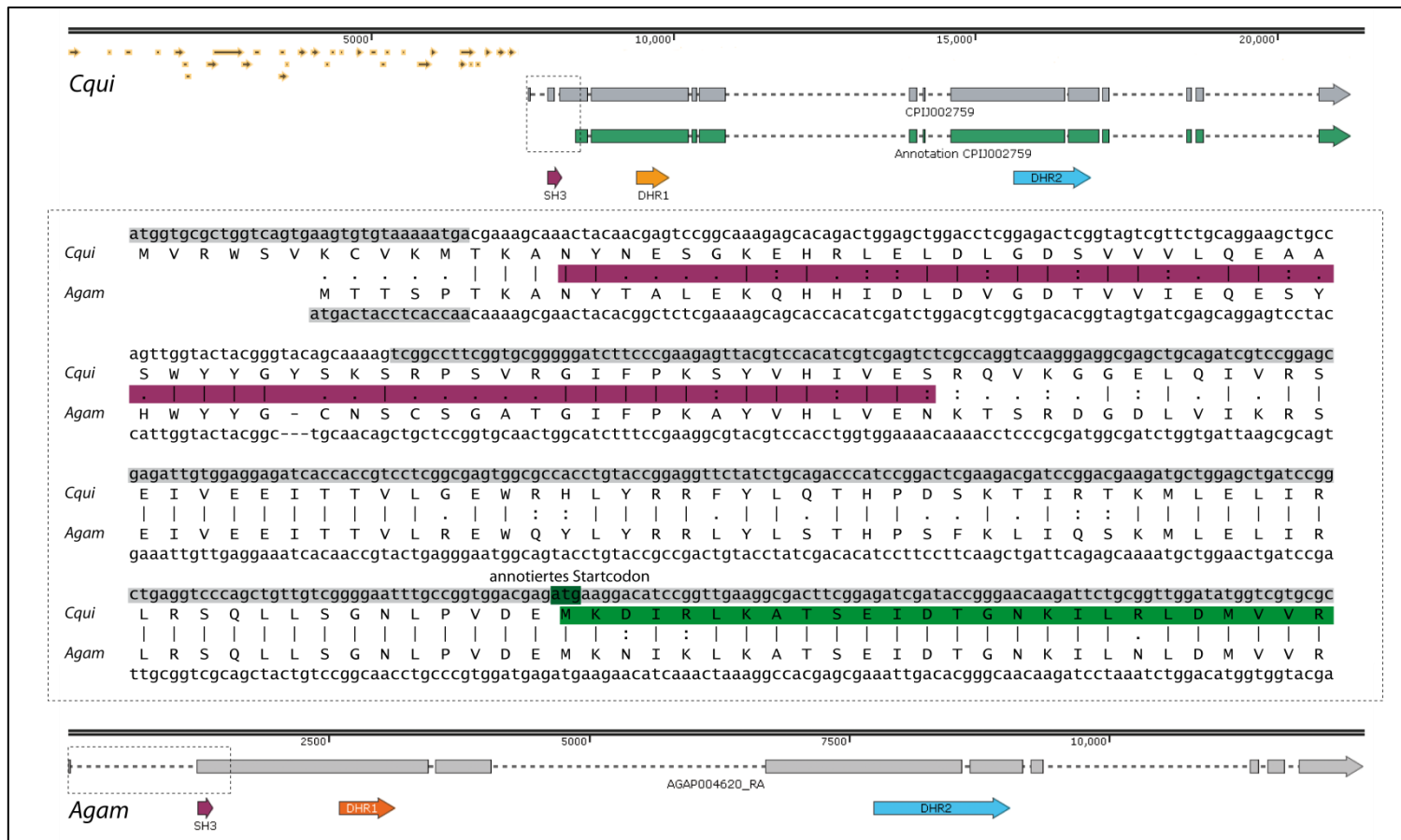
936 QLHTCDDTTANKKIAE		
Software	Kinase	Score
GPS2.1.2	<b>TKL/MLK/MLK/MAP3K11</b>	<b>4</b>
GPS	<b>MAP3K</b>	<b>11,000</b>
NetPhosK 1.0	CKII	0,29
	RSK	0,22
	CKI	0,36
	DNAPK	0,35
	ATM	0,25
	p38MAPK	0,32
	PKB	0,08
	PKC	0,33
	<b>CaM-II</b>	<b>0,43</b>
	PKA	0,08
	PKG	0,34
	cdc2	0,42
	<b>GSK3</b>	<b>0,43</b>
	cdk5	0,21
NetPhos 2.0	-	0,043

Anhang 11: Übersicht über alle berechneten Scores für alle phosphorylierbare Aminosäuren in Exon 9



#### Anhang 12: Überexpression der einzelnen Isoformen in ePG7

Um die Migration der ePG quantitativ zu analysieren, wurde der Abstand zwischen dem Zellkern von ePG9 und dem Ich gemessen. Die Messwerte für Mz97>nGFP (Median = -5,2 μm), Mz97>nGFP, >mbc-RA (Median = -3,81 μm), Mz97>nGFP, >mbc-RB (Median = -6,32 μm), Gli>mbc-RA (Median = -3,82 μm) und Gli>mbc-RB (Median = -3,67 μm) sind als Boxplot dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit einem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test überprüft. n.s.: nicht signifikant.



### Anhang 13: Annotierter und vermuteter Translationsstart von *Cqui*\CPIJ002759

Exon-Intron-Struktur von *Cqui*\CPIJ002759, das annotierte Transkript ist in grün dargestellt. Außerdem sind Bereiche, die für Domänen kodieren (SH3 in magenta, DHR1 in orange und DHR2 in blau) markiert. Die Sequenz im 5' Bereich des annotierten Startcodons kodiert für eine SH3-Domäne, das längere Transkript, das die SH3-Domäne enthält ist in grau dargestellt. In gelb sind Sequenzabschnitte markiert, die über ein Startcodon verfügen und alternativ zum gezeigte Exon 1 *in frame* an das zweite Exon gespleißt werden könnten. Vergleich der 5' Region von *Cqui*\CPIJ002759 und *Agam*\AGAP004620. Benachbarte Exons sind abwechselnd in grau und weiß dargestellt, die SH3-Domäne in magenta. Bei *Cqui* ist das annotierte Startcodon, sowie die vom annotierten Transkript kodierte Aminosäuresequenz grün markiert. Die kodierte Aminosäuresequenz im *upstream* Bereich des annotierten Startcodons zeigt große Homologie zu *Agam* und enthält eine SH3-Domäne. Exon-Intron-Struktur von *Agam*\AGAP004620.

## 7.1. Abkürzungsverzeichnis

### 7.1.1. Allgemeine Abkürzungen

As	Aminosäure
bZIP	<i>Basic Leucine Zipper</i>
DHR1	<i>DOCK homology region 1 (CZH1 oder Docker1)</i>
DHR2	<i>DOCK homology region 21 (CZH2 oder Docker2)</i>
DLK	<i>double leucine-zipper domain kinases</i>
EMS	Ethylmethansulfonat
ePG	embryonale periphere Gliazelle ( <i>engl. embryonic peripheral glia</i> )
GAP	<i>GTPase-activating proteins</i>
GEF	GTP-Austauschfaktor ( <i>engl. guanine nucleotide exchange factor</i> )
GDI	<i>guanine nucleotide dissociation inhibitor</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
Hs	Hemisegment
ISN	Intersegmentalnerv
MAP2K	MAP-Kinase-Kinasen ( <i>engl. mitogen-activated protein kinase kinase</i> )
MAP3K	MAP-Kinase-Kinasen-Kinase ( <i>engl. mitogen-activated protein kinase kinase kinase</i> )
MLKs	<i>mixed-lineage kinases</i>
NMII	nicht-muskuläres Myosin II
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>engl. polymerase chain reaction</i> )
Pi3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat



PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PNS	peripheres Nervensystem
SBM	<i>segmental border muscle</i>
SFK	<i>Scr family kinases</i>
SH3	<i>Src homology 3</i>
SN	Segmentalnerv
TN	Transversalnerv
UTR	untranslatierter Bereich ( <i>engl. untranslated region</i> )
ZNS	Zentralnervensystem

### 7.1.2. Namen und Abkürzungen der Gene

β-Gal	β-Galactosidase
<i>Ced-12</i>	
<i>Ckla</i>	<i>Casein kinase Ia</i>
<i>Crk</i>	
<i>EGF</i>	<i>epidermal growth factor</i>
<i>Egfr</i>	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
<i>for</i>	<i>foraging</i>
<i>gcm</i>	<i>glial cells missing</i>
<i>grp</i>	<i>grapes</i>
<i>Ilk</i>	<i>Integrin linked kinase</i>
<i>JIL-1</i>	

<i>Klp64D</i>	<i>Kinesin-like protein at 64D</i>
<i>Lk6</i>	
<i>mbc</i>	<i>myoblast city</i>
<i>Mocs1</i>	<i>Molybdenum cofactor synthesis 1 ortholog</i>
<i>Oaz</i>	<i>O/E-associated zinc finger protein</i>
<i>par-1</i>	
<i>Pka-C1</i>	<i>cAMP-dependent protein kinase</i>
<i>pnt</i>	<i>pointed</i>
<i>Pvr</i>	<i>PDGF- and VEGF-receptor related</i>
<i>Rac1</i>	
<i>repo</i>	<i>reversed polarity</i>
<i>Rho1</i>	
<i>SNF4λ</i>	<i>SNF4/AMP-activated protein kinase gamma subunit</i>
<i>ttk</i>	<i>tramtrack</i>
<i>wnd</i>	<i>wallenda</i>

## 7.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Transkriptionelle Regulation der Gliogenese .....	4
Abb. 1.2: Nervensystem des Embryos .....	7
Abb. 1.3: Migration der ePG .....	10
Abb. 2.1: Klonierungsstrategie für UAS- <i>mbc</i> - <i>RB</i> (Teil 1).....	16
Abb. 2.2: Klonierungsstrategie für UAS- <i>mbc</i> - <i>RB</i> (Teil 2).....	17
Abb. 2.3: Kreuzungsschema für die Rekombination von UAS- <i>mbc</i> und <i>mbc</i> <sup>D11.2</sup> .....	23
Abb. 2.4: Kreuzungsschema für die Kombination von <i>gcm</i> >nGFP und <i>mbc</i> <sup>C1</sup> .....	24
Abb. 3.1: Gliale, axonale und muskuläre Phänotypen der <i>mbc</i> Mutante .....	35
Abb. 3.2: In <i>mbc</i> Mutanten ist die Anzahl der Mz97 positiven ePG wildtypisch .....	37
Abb. 3.3: Signifikante Unterschiede bei der Positionierung von ePG9 zwischen WT und <i>mbc</i> Mutante.....	39
Abb. 3.4: Expression von Mbc im embryonalen ZNS.....	40
Abb. 3.5 Mbc Expression in den ePG .....	41
Abb. 3.6: Der Verlust von <i>mbc</i> in allen ePG führt zu Migrationsdefekten bei ePG9 .....	43
Abb. 3.7: Ced-12 spielt eine Rolle bei der Migration der ePG .....	46
Abb. 3.8: Der Einfluss von PIP3 auf die Migration der ePG .....	48
Abb. 3.9: Rolle von Rac1, Egfr, Pvr und Crk bei der Migration der ePG .....	50
Abb. 3.10: Alternatives Spleißen von <i>mbc</i> und Expression der beiden Isoformen im Embryo.....	52
Abb. 3.11: Beide Isoformen von Mbc können den Muskelphänotyp retten.....	54
Abb. 3.12: Durch die Rettung der Muskeln werden auch axonale und gliale Phänotypen gerettet .....	55
Abb. 3.13: Nur Mbc-PB kann die zellautonome Funktion während der Migration der ePG übernehmen .....	57
Abb. 3.14: Expression von Mbc-PB in den ePG rettet die glialen Migrationsdefekte .....	59
Abb. 3.15: Gliale Überexpression von <i>mbc</i> - <i>RB</i> führt zur Übermigration von ePG9 .....	61
Abb. 3.16: Unterschied zwischen den beiden Isoformen von <i>mbc</i> .....	62
Abb. 3.17: <i>in silico</i> Analyse der phosphorylierbaren Aminosäuren des von Exon 9 kodierten Bereichs .....	63
Abb. 3.18: Verschiedene Kinasen beeinflussen die Migration von ePG9 auf unterschiedliche Weise .....	65
Abb. 3.19 <i>wnd</i> ist zellautonom an der Migration der ePG beteiligt .....	67
Abb. 3.20: Expression der phosphomutanten Konstrukte verstärkt die Übermigration von ePG9.....	69
Abb. 3.21: Die Morphologie von ePG7 und ePG9 im WT und in <i>mbc</i> Mutanten .....	72
Abb. 3.22: Ektopische Expression von Rho1.V14 in ePG7 oder ePG9 .....	74
Abb. 3.23: Ektopische Expression von Rho1.V14 .....	75
Abb. 3.24: Der Verlust von <i>mbc</i> in ePG7 beeinflusst die Migration von ePG9.....	77
Abb. 3.25: Expression von Mbc-PB in ePG7 im <i>mbc</i> Mutanten Hintergrund rettet die Migration von ePG9 ...	79
Abb. 3.26: Expression von Mbc-PB in ePG7 im <i>mbc</i> Mutanten Hintergrund rettet die Migration von ePG9 ...	80
Abb. 3.27: Ektopische Expression von Rac1.N17 in ePG7 beeinflusst die Migration von ePG9 .....	81
Abb. 3.28: <i>mbc</i> orthologe Gene in Drosophiliden .....	84
Abb. 3.29: Konservierte Bereiche in <i>mbc</i> - <i>RA</i> /Intron 8 .....	85
Abb. 3.30: <i>mbc</i> orthologe Gene in Dipteren (Legende siehe vorherige Seite) .....	88

<b>Abb. 3.31: <i>mbc</i> orthologe Gene in Arthropoden.....</b>	<b>91</b>
<b>Abb. 3.32: <i>mbc</i> orthologe Gene in Nematoden und Vertebraten .....</b>	<b>93</b>
<b>Abb. 3.33: Drei Aminosäuren des von Mbc-PB/Exon 9 kodierten Bereichs sind in allen Arthropoden konserviert .....</b>	<b>94</b>
<b>Abb. 3.34: Phosphorylierungsstellen innerhalb der von alternativ gespleißten Exons kodierten Bereiche .....</b>	<b>95</b>
<b>Abb. 3.35: Strukturvorhersagen von Mbc und verschiedenen orthologen Proteinen .....</b>	<b>98</b>
<b>Abb. 3.36: Berechnete 3D-Struktur des von den alternativ gespleißten Exons kodierten Bereichs von Mbc und ARP2_G366 .....</b>	<b>100</b>
<b>Abb. 4.1: Phosphorylierungsstellen von DOCK1 .....</b>	<b>106</b>
<b>Abb. 4.2: <i>par-1</i> Genlokus.....</b>	<b>111</b>
<b>Abb. 4.3: Modell für den Signalweg zwischen ePG9 und ePG7 .....</b>	<b>116</b>
<b>Abb. 4.4: Rac1 ist vermutlich Teil eines reziproken Signalwegs zwischen ePG7 und ePG9.....</b>	<b>117</b>
<b>Abb. 4.5: Modell für die Inaktivierung von Mbc-PB .....</b>	<b>118</b>

### 7.3. Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Liste der verwendeten Sequenzierprimer .....	13
Tab. 2.2: Liste der verwendeten Primer zur Klonierung von UAS- <i>mbc-RB</i> .....	15
Tab. 2.3: Liste der verwendeten Primer für die Mutagenese von UAS- <i>mbc-RB</i> .....	18
Tab. 2.4: Sequenzen der Megaprimer.....	19
Tab. 2.5: Liste der verwendeten Fliegenstämme ( <i>Drosophila melanogaster</i> ) .....	24
Tab. 2.6: Liste der verwendeten primären Antikörper .....	28
Tab. 2.7: Liste der verwendeten Geräte .....	31
Tab. 2.8: Liste der verwendeten Software.....	32
Tab. 3.1: Vergleich der Region zwischen der DHR1- und der DHR2-Domäne von Mbc-PA und verschiedenen orthologen Proteinen.....	97

## 7.4. Eidesstattliche Erklärung

Versicherung gemäß §11, Abs.3d der Promotionsordnung

1. Ich habe die als Dissertation vorgelegte Arbeit selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel (Literatur, Apparaturen, Material) in der Arbeit angegeben.
2. Ich habe und hatte die als vorgelegte Dissertation vorgelegte Arbeit nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.
3. Ich hatte weder die als Dissertation vorgelegte Arbeit noch Teile einer Abhandlung davon bei einer anderen Fakultät bzw. einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

Mainz, den

---

Jan Dietrich